

**Untersuchungen zur Auswirkung von Zigarettenrauch auf  
die Atemwege der Taufliege *Drosophila melanogaster*  
während vulnerabler Entwicklungsphasen**



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Karolina-Theresa Sirocko**

Kiel, April 2020

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Holger Heine

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 2020

*Erfolg ist nichts endgültiges, Misserfolg nichts fatales. Was zählt, ist der Mut weiterzumachen.*

Winston Churchill

## Summary

For several years, the fruit fly *Drosophila melanogaster* has been a well-established model system for fundamental research questions of the pathogenesis of bronchial asthma and other chronic inflammatory respiratory diseases. The main focus is set on the two central aspects of disease development, the innate immune response and the role of the airway epithelium. Chronic inflammatory respiratory diseases have a wide variety of causes which can influence each other or even be interdependent. On the one hand, endogenous, and thus genetic or epigenetic, factors can promote disease development, but on the other hand an entire spectrum of exogenous causes is also well known. In addition to exogenous factors such as air pollution, allergens, or respiratory infections, the consumption of tobacco products in particular exerts a strong and direct impact on the pathogenesis and course of disease, especially in asthma and COPD. However, there is also evidence that the inhalation of tobacco smoke has even more far-reaching effects, since it is not only consumers themselves who have an increased risk to develop a respiratory disease, but also their offspring. Further studies even suggest that this increased susceptibility occurs across generations. To answer this question in future, the primary aim of this work was to establish the fruit fly as a model system for the analysis of cigarette smoke-induced respiratory changes. For this purpose, animals were exposed to cigarette smoke during vulnerable phases of the larval development as well as in adulthood. The immediate consequences, but also the effects of confrontation with tobacco smoke later in life, were analysed using different molecular and behavioural parameters. A first indication that *Drosophila* may be a useful model for studying the effects of cigarette smoke was obtained by detecting cotinine. This confirms that fruit flies are able to metabolise nicotine, which is present in cigarette smoke. The decisive proof that cigarette smoke enters the respiratory system of larvae and interacts with airway epithelial cells was obtained by detecting the activated expression of different genes in smoke-exposed larvae. Therefore, the expression of the cytochrome P<sub>450</sub> monooxygenase-encoding gene *Cyp18a1* and the chaperone-encoding gene *hsp70* was crucial. *Cyp18a1* is a gene homologous to human *Cyp1a1* and responsible for the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, which are an essential component of tobacco smoke. On the other hand, *hsp70* is an evolutionary very primordial and conserved gene that is expressed in particular in response to oxidative stress. In this way, it could be shown that both larvae and imagoes take up cigarette smoke despite the lack of active breathing, react physiologically to it and even show a sexual dimorphism in their response to the confrontation with tobacco smoke.

But the exposure to cigarette smoke had not only direct effects, but also impact on the fly's behaviour. Although smoke did not directly lead to morphological changes in the respiratory epithelium, animals showed reduced activity and reduced survival rate, especially males. Effects

manifested during the juvenile developmental phase persisted and could be detected in adult animals. Whether this is a first indication of an epigenetic and thus intergenerational manifestation remains subject to further investigations.

Extensive analysis of the airway transcriptome of cigarette smoke-exposed larvae showed that numerous genes and signaling cascades were modulated. Among them, there was a large set of genes that are characteristic for exposure to cigarette smoke. But also, genes which have human orthologues that are relevant in respiratory diseases such as asthma and COPD like genes of innate immunity and genes associated with respiratory organogenesis or restructuring processes were strongly regulated.

In summary, the fruit fly *Drosophila melanogaster* is an ideal model for the investigation of fundamental questions of the direct effects of cigarette smoke on the respiratory system and the entire organism. Now, this model opens the unique opportunity to investigate epigenetic effects as well as consequences in inter- and transgenerations in future.

## Zusammenfassung

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* ist seit Jahren ein etabliertes Modell bei der Erforschung grundlegender Fragestellungen bezüglich der Pathogenese von *Asthma bronchiale* und anderer chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf zwei zentralen Aspekten der Krankheitsentstehung, zum einen der Beteiligung der angeborenen Immunantwort und zum anderen der Rolle, die das Atemwegsepithel dabei spielt. Von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen ist bekannt, dass ihre Ursachen sehr vielseitig sein können und sich dabei gegenseitig beeinflussen oder sogar interdependent sein können. Zum einen können endogene - also genetische oder epigenetische - Faktoren die Krankheitsentstehung begünstigen, zum anderen ist inzwischen auch ein ganzes Spektrum exogener Ursachen wohl bekannt. Neben äußeren Faktoren wie Luftverschmutzung, Allergene oder Atemwegsinfektionen übt besonders der Konsum von Tabakwaren einen starken und direkten Einfluss auf die Pathogenese und den Krankheitsverlauf insbesondere von Asthma und COPD aus. Inzwischen gibt es aber auch Hinweise darauf, dass die Inhalation von Tabakrauch noch weitreichender ist, denn es sind nicht nur die Konsumenten selbst, die ein erhöhtes Risiko haben zu erkranken, sondern auch ihre Nachkommen. Und erste Studien deuten sogar darauf hin, dass diese erhöhte Krankheitssuszeptibilität generationsübergreifend ist. Um dieser Frage zukünftig auf den Grund gehen zu können, war das primäre Ziel dieser Arbeit, die Taufliege als Modellsystem für Analysen Zigarettenrauch-induzierter Atemwegsveränderungen zu etablieren. Hierzu wurden Tiere sowohl während vulnerabler Phasen ihrer larvalen Entwicklung, also während der juvenilen Lebensphase, als auch im Erwachsenenalter Zigarettenrauch ausgesetzt. Welche unmittelbaren Folgen, aber auch welche Auswirkungen die Konfrontation mit Tabakrauch auf den späteren Verlauf des Lebens hat, wurde mit unterschiedlichen molekularbiologischen und verhaltensbiologischen Parametern analysiert. Ein erster Hinweis darauf, dass *Drosophila* ein für die Erforschung der Auswirkungen von Zigarettenrauch dienliches Modell sein kann, gelang durch den Nachweis von Cotinin, das bestätigt, dass die Taufliege in der Lage ist, das im Zigarettenrauch enthaltene Nikotin zu metabolisieren. Der entscheidende Nachweis, dass Zigarettenrauch in die Atemwege der Larven gelangt und mit den Zellen des respiratorischen Epithels interagiert, gelang durch die Detektion der Expressionsaktivierung unterschiedlicher Gene im Atemwegsepithel der mit Rauch konfrontierten Larven. Dabei war die Expression des Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase-kodierenden Gens *Cyp18a1* und des Chaperon-kodierenden Gens *hsp70* maßgeblich. Denn *Cyp18a1* ist ein dem humanen *Cyp1a1* homologes und für den Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, die ein wesentlicher Bestandteil von Tabakrauch sind, verantwortliches Gen. *Hsp70* hingegen ist ein evolutionär sehr ursprüngliches und konserviertes Gen, welches insbesondere als Reaktion auf oxidativen Stress exprimiert wird. Auf diese Weise

konnte gezeigt werden, dass Larven, aber auch Imagines, trotz fehlender aktiver Atmung Zigarettenrauch aufnehmen, physiologisch darauf reagieren und sogar einen sexuellen Dimorphismus in ihrer Antwort auf die Konfrontation mit Tabakrauch aufweisen.

Aber die Exposition mit Zigarettenrauch hatte nicht nur direkte Effekte, sondern auch verhaltensbiologische Auswirkungen. Obwohl Zigarettenrauch nicht unmittelbar zu morphologischen Veränderungen des Atemwegsepithels führte, reagierten Tiere mit verminderter Aktivität und einer reduzierten Überlebensrate, insbesondere männliche Individuen. Während der juvenilen Entwicklungsphase manifestierten Effekte waren persistent und konnten nach der Metamorphose der Larve zur Imago auch im erwachsenen Tier nachgewiesen werden. Ob dies ein erster Hinweis auf eine epigenetische und somit eine generationsübergreifende Manifestation ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Umfassende Analysen des Transkriptoms des Atemwegsepithels Zigarettenrauch-exponierter Larven zeigten, dass zahlreiche Gene und Kaskaden moduliert wurden. Darunter waren eine Vielzahl an Genen, die charakteristisch für eine Konfrontation mit Zigarettenrauch sind, aber auch Gene, deren humane Orthologe Relevanz bei Atemwegserkrankungen wie Asthma und COPD haben. Beispielsweise wurden Gene des angeborenen Immunsystems und Gene, die im Zusammenhang mit der Atemwegsorganogenese oder Umstrukturierungsprozessen stehen, stark reguliert.

Zusammengefasst ist es mit dieser Arbeit gelungen mit der Taufliege *Drosophila melanogaster* ein ideales Modell für die Erforschung grundlegender Fragestellungen der unmittelbaren Auswirkungen von Tabakrauch auf die Atemwege und den ganzen Organismus zu etablieren. Dieses Modell eröffnet nun die einzigartige Möglichkeit, zukünftig epigenetische Effekte sowie inter- und transgenerationale Auswirkungen zu erforschen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Summary .....</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VII</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XXIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das gesunde Atemwegsepithel .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Das Atemwegsepithel als Barriere zwischen Organismus und Umwelt.....	1
1.1.2 Xenobiotikametabolismus.....	3
1.1.3 Oxidative Stressantwort .....	5
<b>1.2 Die Auswirkungen des Tabakkonsums auf das Atemwegsepithel .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Chronisch-entzündliche Lungenerkrankungen und Tabakkonsum .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Das Atemwegssystem von <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 <i>Drosophila</i> bei der Erforschung von Atemwegserkrankungen .....</b>	<b>15</b>
<b>1.7 Zielsetzung.....</b>	<b>16</b>
<b>2 Material &amp; Methoden.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Materialien .....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Antikörper und Farbstoffe.....	18
2.1.2 Chemikalien .....	19
2.1.3 Kits.....	20
2.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.5 Wiederverwendbare Materialien.....	23
2.1.6 Geräte.....	24
2.1.7 Verwendete Programme .....	26
<b>2.2 Puffer, Lösungen und weitere Arbeitsagenzien.....</b>	<b>26</b>



---

<b>2.3</b>	<b>Fliegenhaltung .....</b>	<b>28</b>
2.3.1	Fliegenmedien .....	28
2.3.1.1	Fliegenstandardmedium .....	28
2.3.1.2	Nikotin-Medium .....	29
2.3.1.3	Grapefruit-Agar-Medium .....	29
2.3.1.4	Glucose-Agar-Medium .....	29
2.3.2	Fliegenstockhaltung .....	30
<b>2.4</b>	<b>Rauchexpositionsmaschine .....</b>	<b>31</b>
2.4.1	Zigarettenaufbewahrung .....	31
2.4.2	Nutzung der Rauchexpositionsmaschine .....	31
<b>2.5</b>	<b>Grundlegende Maßnahmen zur Vorbereitung von <i>Drosophila</i>-Larven und -Imagines für weitere Versuche .....</b>	<b>33</b>
2.5.1	Synchronisierte Eiablage .....	33
2.5.2	Geschlechtsselektion von <i>Drosophila</i> -Larven .....	34
2.5.3	Präparation von Larven für die Zigarettenrauchexposition .....	35
2.5.4	Präparation von Imagines für die Zigarettenrauchexposition .....	35
<b>2.6</b>	<b>Zigarettenrauchexposition von <i>Drosophila</i>-Larven und -Imagines .....</b>	<b>36</b>
2.6.1	Wildtyp-Larven .....	36
2.6.2	<i>hsp70</i> -GFP-Larven .....	36
2.6.3	Imagines .....	36
2.6.4	Zweifache Zigarettenrauchexposition von <i>Drosophila</i> .....	37
<b>2.7</b>	<b>Nikotinverfütterung an <i>Drosophila</i>-Wildtyp-Larven .....</b>	<b>37</b>
<b>2.8</b>	<b>Probenpräparation zur anschließenden Isolation von RNA .....</b>	<b>38</b>
2.8.1	Ganze Wildtyp-Larven .....	38
2.8.2	Ganze Tracheen aus Wildtyp-Larven .....	38
2.8.3	Geteilte Tracheen aus Wildtyp-Larven .....	38
2.8.4	Imagines .....	39
<b>2.9</b>	<b>Probenpräparation zur anschließenden Detektion von Cotinin .....</b>	<b>39</b>
<b>2.10</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.10.1	RNA-Isolation .....	39
2.10.2	DNA-Verdau .....	41
2.10.3	Messung der RNA-Konzentration .....	41
2.10.4	cDNA-Einstrang-Synthese .....	42

---

2.10.5	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) .....	44
2.10.5.1	Analyse der Genexpression .....	45
2.10.5.2	Kalibrator .....	47
2.10.5.3	Standardkurven .....	47
2.10.5.4	Statistische Auswertung von Genexpressionsdaten .....	47
2.10.6	RNA-Sequenzierung.....	48
2.10.6.1	Bestimmung der RNA-Integrität über den Bioanalyzer .....	48
2.10.6.2	Prozessierung der Proben für die RNA-Sequenzierung .....	50
2.10.6.3	Auswertung der Daten resultierend aus der RNA-Sequenzierung .....	50
2.10.7	Detektion von Cotinin.....	51
2.10.7.1	Proteinbestimmung mittels des BCA-Verfahrens .....	51
2.10.7.2	Cotinin-ELISA.....	52
<b>2.11</b>	<b>Weitere Methoden.....</b>	<b>53</b>
2.11.1	<i>hsp70</i> -GFP-Larven.....	53
2.11.1.1	ganze Larven .....	53
2.11.1.2	ganze Tracheen.....	53
2.11.2	Immunfluoreszenzfärbung von Larventracheen .....	54
2.11.3	Bestimmung der Aktivität nach Zigarettenrauchexposition.....	55
2.11.3.1	Lokomotorische Aktivität von Larven .....	55
2.11.3.2	Geotaxis-Assay .....	55
2.11.3.2.1	Einfache Zigarettenrauchexposition.....	56
2.11.3.2.2	Zweifache Zigarettenrauchexposition.....	56
2.11.4	Bestimmung der Überlebensrate nach Rauchexposition .....	57
2.11.4.1	Zigarettenrauchexposition während des Larvalstadiums .....	57
2.11.4.2	Zigarettenrauchexposition während des Imaginalstadiums.....	57
2.11.4.3	Zigarettenrauchexposition während des Larval- und Imaginalstadiums.....	57
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Das Rauchmodell für die <i>Drosophila</i>-Larve .....</b>	<b>58</b>
3.1.1	Vorangehende Untersuchungen: Cotinin kann infolge einer oralen Aufnahme von Nikotin bei ganzen Wildtyp-Larven detektiert werden.....	58
3.1.2	Design eines <i>Drosophila</i> -Modells zur Exposition von Zigarettenrauch während juveniler Entwicklungsphasen .....	59

<b>3.2</b>	<b>Auswirkungen einer Zigarettenrauchexposition auf die Physiologie der <i>Drosophila</i>-Larve.....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Cotinin kann bei <i>Drosophila</i> -Wildtyp-Larven infolge einer Zigarettenrauchexposition detektiert werden .....	62
3.2.2	Eine Zigarettenrauchexposition induziert die Expression der Gene <i>Cyp18a1</i> und <i>hsp70</i> bei ganzen Wildtyp-Larven .....	63
3.2.3	Zigarettenrauch erhöht die Expression der Gene <i>Cyp18a1</i> und <i>hsp70</i> im larvalen Atemwegsepithel.....	66
3.2.4	<i>Cyp18a1</i> und <i>hsp70</i> werden im gesamten Atemwegssystem von Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauchexposition exprimiert.....	68
3.2.5	GFP wird nach Zigarettenrauchexposition <i>in vivo</i> im posterioren Tracheensystem der transgenen Reporterlinie <i>hsp70</i> -GFP synthetisiert.....	70
3.2.6	Zigarettenrauch führt zu einer Erhöhung des GFP-Signals in den Atemwegen der transgenen Reporterlinie <i>hsp70</i> -GFP.....	72
3.2.7	Die Zellintegrität der Atemwege wird durch eine Zigarettenrauchexposition bei Wildtyp-Larven nicht beeinflusst .....	74
3.2.8	Transkriptomanalyse .....	76
3.2.8.1	Die Transkriptomprofile sind zwischen den einzelnen biologischen Replikaten miteinander vergleichbar .....	76
3.2.8.2	Mittels der Transkriptomanalyse werden mit dem Xenobiotikametabolismus, der Entwicklung und der Immunantwort assoziierte Gene nach Zigarettenrauchexposition reguliert vorgefunden.....	79
<b>3.3</b>	<b>Auswirkungen des Zigarettenrauchs auf die Fitness der Larve.....</b>	<b>86</b>
3.3.1	Zigarettenrauch vermindert die lokomotorische Aktivität bei Wildtyp-Larven .....	86
3.3.2	Die Verpuppungsrate ist bei Zigarettenrauch-exponierten, männlichen Wildtyp-Larven reduziert .....	87
<b>3.4</b>	<b>Das Rauchmodell für die adulte <i>Drosophila</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>3.5</b>	<b>Auswirkungen einer Zigarettenrauchexposition auf die Genexpression von adulten Taufliegen.....</b>	<b>90</b>
3.5.1	Eine Exposition mit Zigarettenrauch induziert <i>Cyp18a1</i> bei adulten Taufliegen .....	90
3.5.2	Eine Exposition mit Zigarettenrauch induziert <i>hsp70</i> bei adulten Taufliegen .....	92
<b>3.6</b>	<b>Auswirkungen des Tabakrauchs die Fitness der adulten Taufliege.....</b>	<b>94</b>
3.6.1	Eine Zigarettenrauchexposition während des adulten Entwicklungsstadiums wirkt sich auf das Überleben von männlichen Taufliegen aus .....	94
3.6.2	Eine Zigarettenrauchexposition von adulten Taufliegen reduziert die negative Geotaxis .....	95

<b>3.7</b>	<b>Design eines zweifachen Rauchexpositionsmodells einer <i>Drosophila</i>-Generation.....</b>	<b>97</b>
<b>3.8</b>	<b>Auswirkungen einer wiederholten Zigarettenrauchexposition auf die Fitness von <i>Drosophila</i> .....</b>	<b>98</b>
3.8.1	Eine Zigarettenrauchexposition im Larval- und Adultstadium wirkt sich auf das Überleben von männlichen Taufliegen aus .....	98
3.8.2	Eine zweifache Zigarettenrauchexposition während des Larval- und Imaginalstadiums hat keinen Einfluss auf die negative Geotaxis .....	99
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>102</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss des Zigarettenrauchs auf die Physiologie .....</b>	<b>103</b>
4.1.1	Nikotinmetabolismus .....	103
4.1.2	<i>Cyp18a1</i> -Expression .....	106
4.1.2.1	<i>Cyp18a1</i> als Komponente des Xenobiotikametabolismus bei <i>Drosophila</i> .....	107
4.1.2.2	<i>Cyp18a1</i> bei ganzen Larven .....	107
4.1.2.3	<i>Cyp18a1</i> bei <i>Drosophila</i> -Imagines .....	108
4.1.2.4	Sexueller Dimorphismus bei der <i>Cyp18a1</i> -Expression .....	109
4.1.3	<i>hsp70</i> -Expression .....	110
4.1.3.1	<i>hsp70</i> bei ganzen Larven .....	110
4.1.3.2	<i>hsp70</i> bei <i>Drosophila</i> -Imagines.....	110
4.1.3.3	Sexueller Dimorphismus bei der <i>hsp70</i> -Expression.....	112
4.1.4	Der Atemwegstrakt als Eintrittspforte für Zigarettenrauch .....	114
4.1.4.1	Die Integrität des Atemwegsepithels.....	114
4.1.4.2	<i>Cyp18a1</i> und <i>hsp70</i> im Atemwegsepithel .....	114
<b>4.2</b>	<b>Auswirkungen auf die Fitness .....</b>	<b>118</b>
4.2.1	Fitness bei einmaliger Zigarettenrauchexposition .....	119
4.2.1.1	Überlebensrate von Larven und Imagines.....	119
4.2.1.2	Lokomotorische Aktivität von Larven und Imagines.....	121
4.2.2	Fitness bei zweimaliger Zigarettenrauchexposition .....	123
4.2.2.1	Überlebensrate .....	124
4.2.2.2	Negative Geotaxis .....	124
4.2.2.3	Epigenetik als potentieller Mechanismus? .....	125
<b>4.3</b>	<b>Relevanz regulierter Signalwege bei der Entwicklung chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen und eines morphologisch veränderten Atemwegsepithels bei <i>Drosophila</i> .....</b>	<b>127</b>
4.3.1	Xenobiotikametabolismus und oxidative Stressantwort .....	128
4.3.2	Angeborene Immunantwort: Die Jak/STAT-Signalgebung .....	130
4.3.3	Entwicklungs-assoziierte Prozesse: Der kanonische Wnt-Signalweg .....	132

---

4.3.4	GPCR-vermittelte Signalgebung .....	133
4.3.5	Apoptose .....	134
4.3.6	Telomererhaltung.....	136
4.3.7	Ist <i>Drosophila</i> potentiell dazu in der Lage, Zigarettenrauch-induzierte Effekte über mehrere Generationen hinweg zu vermitteln?.....	137
<b>4.4</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>139</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>140</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>.....</b>	<b>164</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>.....</b>	<b>192</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>.....</b>	<b>193</b>

## Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
°C	Grad Celsius
♂	Männchen
%	Prozent
(v/v) %	Volumenprozent
♀	Weibchen
20E	20-Hydroxyecdyson
α	Signifikanzniveau / Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art
A <sub>230</sub>	Absorption bei 230 nm
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom
Adrb2	Adrenorezeptor β2
AhR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AMP	antimikrobielles Peptid
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variances</i> )
AhR	<i>Ahr nuclear translocator</i>
B[a]p	Benzo[a]pyren
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein ( <i>bone morphogenetic protein</i> )
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C <sub>p</sub>	<i>crossing point</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cora	Coracle
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung ( <i>chronic obstructive pulmonary disease</i> )

---

Cu <sup>+</sup>	einwertiges Kupferion
Cyp	Cytochrom P <sub>450</sub> Monooxygenase
d	Tag(e)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DKFZ	Deutsches Zentrum für Krebsforschung
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleid acid</i> )
Dnmt	<i>de novo</i> -Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	lateinisch: <i>et alii</i>
f <sub>3</sub>	dritte Filialgeneration
FDR	<i>false discovery rate</i>
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GO	Genontologie
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor ( <i>G protein-coupled receptor</i> )
Gst	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAT	Histonacetylase
hCAP-18	<i>human cathelicidin antimicrobial peptide 18</i>
HCl	Salzsäure

---

HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horsereddish peroxidase</i> )
HSE	<i>heat shock response element</i>
HSF	<i>heat shock transcription factor</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
IL	Interleukin
IMD	<i>immune deficiency</i>
ISO	Internationale Organisation für Normung
Jak	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
l	Liter
L3	drittes Larvenstadium / Häutungsstadium
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	Molarität
Max.	Maximum
min	Minute(n)
Min.	Minimum
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
n	biologisches Replikat
N <sub>2</sub>	molekularer Stickstoff
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
nt	Nukleotid(e)
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>nuclear factor κ light chain enhancer in B cells</i>
NGS (Chemikalie)	<i>normal goat serum</i>
NGS (Methode)	Sequenzierung der nächsten Generation ( <i>next generation sequencing</i> )
ns	nicht significant
Octβ2R	Octopamin-β2-Rezeptor



ORMDL	<i>orosomuroid 1-like</i>
p	Signifikanzwert
PAH	polyzyklische(r) aromatische(r) Kohlenwasserstoff(e) ( <i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCA	Hauptkomponentenanalyse ( <i>principal component analysis</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pH	lateinisch: <i>potentia hydrogenii</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion ( <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )
Rad50	<i>radiation sensitive 50</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
Rpl32	ribosomales Protein L32
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
RT+	mit Reverser Transkriptase
RT-	ohne Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of the mean</i> )
Sgs3	<i>salivary gland secretion 3</i>
SI	Internationales Einheitensystem (französisch: <i>Système International d'Unités</i> )
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
spp.	lateinisch: <i>species pluralis</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor ( <i>Toll-like receptor</i> )
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
Upd	<i>unpaired</i>
w	Woche(n)
x	-mal / -fach
XRE	<i>xenobiotic response element</i>

Es wurden gängige mathematische Symbole sowie die nach dem SI-System festgelegten Präfixe verwendet.

Die Bezeichnung von Genen wurde der *flybase*-Datenbank ([www.flybase.org](http://www.flybase.org))<sup>1</sup> entnommen. Die Schreibweise von Protein- und Gennamen wurde unabhängig vom im Kontext genannten Organismus jeweils auf die für *Drosophila melanogaster* empfohlene Schreibweise bezogen ([www.biosciencewriters.com/Guidelines-for-Formatting-Gene-and-Protein-Names.aspx](http://www.biosciencewriters.com/Guidelines-for-Formatting-Gene-and-Protein-Names.aspx)).

In dieser Arbeit wurde sich bei Verwendung des Ausdrucks *Drosophila* auf die Art *Drosophila melanogaster* bezogen. Wurde hingegen auf eine andere Art der Gattung *Drosophila* Bezug genommen, so wurde diese explizit genannt.

Aminosäuren wurden nach dem Ein- oder Dreibuchstabencode genannt.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Prinzip des Fremdstoffmetabolismus.....	3
Abb. 1.2: PAH-induzierte Synthese von Cyp1a1 .....	4
Abb. 1.3: Synthese von Hitzeschockproteinen .....	6
Abb. 1.4: Vereinfachte, schematische Darstellung eines gesunden und eines mit Zigarettenrauch exponierten Atemwegsepithels .....	8
Abb. 1.5: Vergleich von gesunden Bronchien und entzündeten Atemwegen .....	9
Abb. 1.6: Metamorphosezyklus von <i>Drosophila melanogaster</i> bei 25 °C.....	12
Abb. 1.7: Das Tracheensystem der <i>Drosophila</i> -L3-Larve.....	14
Abb. 2.1: Umsetzungsschema für die Stammerhaltung von <i>Drosophila</i> .....	30
Abb. 2.2: <i>InExpose</i> -Rauchmaschine der Firma SCIREQ® .....	31
Abb. 2.3: Männliche und weibliche Larven .....	34
Abb. 2.4: Schematische Darstellung eines Rauchkäfigs für die Exposition von <i>Drosophila</i> -Larven mit Zigarettenrauch und Ansicht von oben auf einen geöffneten Rauchkäfig.....	35
Abb. 2.5: Visuelle Darstellung des C <sub>p</sub> -Wertes im Zuge einer Amplifikation .....	45
Abb. 2.6: Bestimmung der RNA-Integrität am Agilent Bioanalyzer .....	49
Abb. 2.7: Schematische Darstellung eines Geotaxisröhrchens .....	55
Abb. 3.1: Cotininkonzentration bei ganzen Wildtyp-Larven nach oraler Aufnahme von Nikotin.....	59
Abb. 3.2: Experimenteller Ablauf der Exposition von Zigarettenrauch während juveniler Entwicklungsphasen von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	61
Abb. 3.3: Cotininkonzentration in ganzen Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition .....	63
Abb. 3.4: Expression der Gene <i>Cyp18a1</i> und <i>hsp70</i> im zeitlichen Verlauf nach Zigarettenrauch bzw. Luftexposition.....	65
Abb. 3.5: Expressionen der <i>Cyp18a1</i> - und <i>hsp70</i> -Transkripte in isolierten Tracheen und dem verbleibenden Homogenat von Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition .....	67
Abb. 3.6: <i>Cyp18a1</i> - sowie <i>hsp70</i> -Expression in anterioren und posterioren Tracheen von Wildtyp- Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.....	69
Abb. 3.7: <i>In vivo</i> -fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transgenen <i>hsp70</i> -GFP-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.....	71
Abb. 3.8: <i>Ex vivo</i> -fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen isolierter Atemwegsstränge von transgenen <i>hsp70</i> -GFP-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.....	72

Abb. 3.9: Fluoreszenzquantifizierung der isolierten Tracheen von Larven der transgenen Reporterlinie <i>hsp70</i> -GFP nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.....	73
Abb. 3.10: Immunfluoreszenzfärbung der Atemwege von Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponierten Wildtyp-Larven .....	75
Abb. 3.11: Grafische Darstellung der hierarchischen Clusteranalyse in Form einer <i>Heatmap</i> von regulierten Genen männlicher bzw. weiblicher Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.....	77
Abb. 3.12: PCA-Diagramm des Tracheentranskriptoms männlicher und weiblicher Tracheen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition .....	78
Abb. 3.13: Kreisdiagramme von verallgemeinerten biologischen Prozessen, die infolge einer Zigarettenrauch- bzw. Luft-exposition in männlichen bzw. weiblichen Tracheen reguliert sind .....	80
Abb. 3.14: Ausgewählte, regulierte biologische Prozesse im Atemwegsepithel von männlichen und weiblichen <i>Drosophila</i> -Larven infolge einer Zigarettenrauchexposition im Vergleich zu Luft-exponierten Tieren, die im potentiellen Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen oder einer Konfrontation mit Zigarettenrauch stehen.....	82
Abb. 3.15: Expression von Genen, die mit Hitzeschockproteinen, Glutathion-S-Transferasen, Notch- oder kanonischem Wnt-Signalweg assoziiert werden, in Tracheen männlicher und weiblicher Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch-exposition in Relation zur Luftkontrolle .....	84
Abb. 3.16: Expression von Genen, die mit Cyp oder der GPCR-Signalkaskade assoziiert werden, in Tracheen männlicher und weiblicher Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauchexposition in Relation zur Luftkontrolle .....	85
Abb. 3.17: Lokomotorische Aktivität von Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition	86
Abb. 3.18: Überlebensrate während der einzelnen Entwicklungsstadien Larve, Puppe und Imago nach vorheriger Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition von Wildtyp-Larven.....	88
Abb. 3.19: Experimenteller Ablauf für die Zigarettenrauchexposition während des adulten Entwicklungsstadiums.....	89
Abb. 3.20: Expression von <i>Cyp18a1</i> im Kopf- sowie im Thorax-Abdomen-Homogenat von adulten Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponierten Taufliegen .....	91
Abb. 3.21: Expression von <i>hsp70</i> im Kopf- sowie im Thorax-Abdomen-Homogenat von adulten Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponierten Taufliegen .....	93
Abb. 3.22: Überlebensrate von männlichen und weiblichen Taufliegen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.....	94
Abb. 3.23: Negativer Geotaxis-Assay von adulten Taufliegen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.....	96

---

Abb. 3.24: Experimenteller Ablauf der zweifachen Zigarettenrauchexposition während des larvalen und adulten Entwicklungsstadiums.....	97
Abb. 3.25: Überlebensrate von Taufliegen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition, die bereits im Juvenilstadium Rauch bzw. Luft exponiert worden waren.....	99
Abb. 3.26: Negativer Geotaxis-Assay von adulten Taufliegen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition, die zuvor im Larvalstadium Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponiert worden waren.....	101

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Antikörper und Farbstoffe .....	18
Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien .....	19
Tab. 2.3: Während der Arbeit genutzte Kits.....	20
Tab. 2.4: Benötigte Verbrauchsmaterialien .....	21
Tab. 2.5: Wiederverwendbare Materialien, die im Zuge der Arbeit Anwendung fanden.....	23
Tab. 2.6: Programm zum Autoklavieren von Milbenstopfen.....	23
Tab. 2.7: Während der Arbeit genutzte Geräte.....	24
Tab. 2.8: Genutzte Software .....	26
Tab. 2.9: Sterilisationsprogramm.....	28
Tab. 2.10: Programm zum Autoklavieren von Fliegenstandardmedium .....	28
Tab. 2.11: Verwendete Taufiegenstämme .....	30
Tab. 2.12: Exemplarische Zigarettenrauchparameter für einen einstündigen Lauf mit vier Zügen/min .....	32
Tab. 2.13: rDNase-Reaktionsmischung pro Probe für den DNA-Verdau während der RNA-Isolation..	40
Tab. 2.14: TURBO DNase-Reaktionsmischung pro Probe für einen zusätzlichen DNA-Verdau von aus ganzen Larven isolierter RNA .....	41
Tab. 2.15: Zusammensetzung des 100 µM Oligo-dT-Mix.....	42
Tab. 2.16: dNTP-Lösung.....	43
Tab. 2.17: Pro Probe anzusetzender Oligo-dNTP-Mix für die cDNA-Synthese.....	43
Tab. 2.18: Pro Probe anzusetzender Mastermix für RT+ - und RT- -Proben bei der cDNA-Einstrang-Synthese .....	43
Tab. 2.19: cDNA-Umschreibeprozess durch den Thermocycler.....	44
Tab. 2.20: Mastermix für eine qRT-PCR am LightCycler .....	46
Tab. 2.21: Verwendetes qRT-PCR-Programm am LightCycler .....	46
Tab. 2.22: Verwendete qRT-PCR-Primer.....	47
Tab. I: Hochregulierte Gene in Tracheen männlicher Larven nach Tabakrauchexposition im Vergleich zur Luftexposition.....	164
Tab. II: Deregulierte Gene in Tracheen männlicher Larven nach Tabakrauchexposition im Vergleich zur Luftexposition.....	169
Tab. III: Hochregulierte Gene in Tracheen weiblicher Larven nach Tabakrauchexposition im Vergleich zur Luftexposition.....	169
Tab. IV: Hochregulierte Gene in Tracheen weiblicher Larven nach Tabakrauchexposition im Vergleich zur Luftexposition.....	186

# 1 Einleitung

Bei unserer Lunge handelt es sich metaphorisch gesehen um ein atemberaubendes Organ. Mit jedem einzelnen Atemzug werden pro Tag tausende Liter an Luft inhaliert. Der darin enthaltene Sauerstoff wird in die Lunge aufgenommen und gelangt bis in den höchsten Verzweigungsgrad des Atemwegssystems, den Alveolen. Von hier aus geht der Sauerstoff durch das Atemwegsepithel in den Blutkreislauf über und wird von den Sauerstoff verbrauchenden Geweben und Organen aufgenommen. Jedoch gelangen auch eine Vielzahl an Mikroorganismen und Fremdpartikel mit der eingeatmeten Luft in unsere Lunge. Aufgrund dessen nimmt das Atemwegsepithel der Lunge auch eine tragende Rolle als Tor zwischen Körper und Umwelt ein. Kann das Atemwegsepithel der Barrierefunktion nicht mehr in vollem Umfang gerecht werden, kommt es zu einer erhöhten Belastung mit exogenen Substanzen und Mikroorganismen. Dies kann wiederum zur Entwicklung chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen wie *Asthma bronchiale* (kurz: Asthma) oder der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease, COPD*) beitragen. Bei diesen Erkrankungen kann das aberrante Atemwegsepithel seine Funktion als Sauerstofflieferant nicht vollständig wahrnehmen und die Betroffenen werden wortwörtlich ihres Atems beraubt. Dabei besitzen besonders Tabakkonsumenten ein erhöhtes Risiko *Asthma bronchiale* oder eine COPD zu entwickeln. Neueste Studien weisen sogar darauf hin, dass durch das Rauchen nicht nur das eigene Gefährdungspotential erhöht ist, sondern dass dieses Risiko auch auf spätere Generationen übertragen werden kann. Dies verdeutlicht nicht nur die Tragweite des eigenen Handelns, sondern auch wie wichtig es ist, im Sinne nachfolgender Generationen der „Tabakepidemie Einhalt [zu] gebieten“ (DKFZ 2003<sup>2</sup>).

## 1.1 Das gesunde Atemwegsepithel

### 1.1.1 Das Atemwegsepithel als Barriere zwischen Organismus und Umwelt

Das Atemwegsepithel nimmt als Tor zwischen Körper und Umwelt eine entscheidende Position ein, da es als erste Verteidigungslinie gegenüber der durch den Luftweg eingetragene Noxen und Mikroorganismen die Homöostase im Lungengewebe aufrechterhalten muss. Dabei trägt vor allem der wenig permeable Zellverbund, der Mikroorganismen und exogene Partikel an der Invasion in das proximale Gewebe hindert, zur Lungengesundheit bei. Dieser Aufgabe wird das Atemwegsepithel in seiner Funktion als physikalische, chemische und immunologische Barriere gerecht.<sup>3,4</sup>

Als Grenzepithel zwischen Organismus und Umwelt wird das Atemwegsepithel zunächst klassischerweise als physikalische Barriere betrachtet. Mit jedem Atemzug gelangen unzählige

Fremdpartikel und Mikroorganismen in die Lunge, deren Abwehr bereits im Lumen der Atemwege stattfindet. Ein Eintritt in das Lungengewebe wird durch die im konduktiven Atemwegsbereich befindliche Gelschicht des Mukus verhindert. Dabei adhären die Fremdkörper an diese viskose Mukusschicht. Der Transport in kranialer Richtung über den mukoziliären Apparat eliminiert ebene Partikel aus dem Lungensystem. Zwischen Gelschicht und der Oberfläche des Atemwegsepithels befindet sich ein dünner, weniger viskoser Film, die periziliäre Flüssigkeit oder Solschicht, die die mechanische Barriere des Mukus komplettiert. Die Solschicht stellt aber auch eine chemische Barriere dar, da innerhalb dieses Films sich diverse antimikrobielle Peptide (AMP) befinden, die von sekretorischen Zellen des Atemwegsepithels wie Clara- oder Becherzellen stammen. AMP sind kleine, kationische Peptide, die Bakterien und Viren destruieren können. Zu den größeren AMP gehören Enzyme wie beispielsweise Lysozyme, Proteaseinhibitoren wie Elafin sowie Bindungsproteine wie Mukine oder Eisen-bindendes Lactoferrin. Zu den kleineren AMP, die konstitutiv in der Solschicht zu finden sind, zählen unter anderem  $\beta$ -Defensin 1 sowie das einzige humane Cathelicidin, *human cathelicidin antimicrobial peptide 18* (hCAP-18)/LL-37. Sowohl  $\beta$ -Defensine als auch hCAP-18/LL-37 können jedoch auch zusätzlich aufgrund ihrer Chemotaxis auslösenden Eigenschaften eine Immunreaktion einleiten, sodass die Solschicht neben der chemischen Barriere auch eine immunologische Funktion wahrnimmt.<sup>5</sup> Als letzte physikalische Instanz, die das Lungengewebe vor der Invasion von Mikroorganismen bewahrt, dienen Adhäsionsverbindungen wie *Adherens Junctions*, die Zell-Zell-Kontakte vermitteln.<sup>6, 7</sup> Aber auch *Tight Junctions*, die als Diffusionsbarriere agieren und die Zellpolarität bewahren, bedingen die Integrität des Atemwegsepithels.<sup>6, 7</sup>

Auch intrazellulär erweist sich das Atemwegsepithel beim Eindringen von Mikroorganismen als eine hochdynamische Einheit, die eine Inflammationsantwort initiieren, aufrechterhalten und regulieren kann. Auf diese Weise kann eine Kolonisation von Pathogenen abgewehrt werden. Dafür ist jedoch die Erkennung von Pathogen-spezifischen, sezernierten Molekülen (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) von Gram-negativen Bakterien oder von Pilzen stammendes  $\beta$ -Glukan für eine funktionelle Immunantwort unabdingbar. Die Erkennung geschieht über Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR) der Atemwegsepithelzellen. Zu diesen gehören unter anderem die Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren (*Toll-like receptor*, TLR), von denen elf Vertreter (TLR-1 - TLR-11) beim Menschen zu finden sind. Jeder Rezeptor kann spezifisch verschiedene Pathogenstrukturen erkennen und somit eine maßgeschneiderte Antwort für die Immunabwehr einleiten. So handelt es sich beispielsweise bei TLR-3 um einen intrazellulären Rezeptor, der vor allem für die Erkennung von Viren stammender, doppelsträngiger Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA)<sup>8</sup> zuständig ist, während TLR-4 ein membrangebundener Rezeptor ist, der eine hohe Affinität gegenüber LPS aufweist.<sup>9</sup> Bei der



Aktivierung der TLR durch Bindung eines Liganden wird eine Signalkaskade der angeborenen Immunantwort ausgelöst, die in der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$  light chain enhancer in B cells*) in den Zellkern mündet, wo er Expression verschiedener AMP, Interferone, proinflammatorischer Zytokine und Chemokine auslöst.<sup>10</sup> Dies führt zu einer Rekrutierung von Makrophagen und Granulozyten, die zur Elimination der Mikroorganismen auf der luminalen Seite des Lungengewebes beitragen sowie Reparaturprozesse induzieren. Final kommt es zum Einstrom von dendritischen Zellen sowie T- und B-Lymphozyten und damit der Ausweitung der Immunantwort im Atemwegsepithel auf das adaptive Immunsystem.<sup>10</sup>

### 1.1.2 Xenobiotikametabolismus

Mit dem Tabakrauch werden etwa 4 000 Verbindungen inhaliert<sup>11</sup>, die Stressoren für den Organismus darstellen. Können aus dem Rauch stammende Partikel nicht über den mukoziliären Apparat aus der Lunge hinausgefördert werden und dringen in das Atemwegsepithel ein, müssen sie anderweitig aus dem Körper entfernt werden. Die Elimination von exogenen, resorbierten Substanzen ohne physiologische Funktion, den Xenobiotika, erfolgt über den Xenobiotikametabolismus (Fremdstoffmetabolismus). Dabei ist vor allem die Leber zuständig für die metabolische Umwandlung von exogenen Komponenten. Aber auch andere Organe wie die Lunge oder die Nieren können eine Biotransformation einleiten.<sup>12</sup>

Der Fremdstoffmetabolismus teilt sich in zwei Phasen auf (s. Abb. 1.1). Nach Resorption eines Xenobiotikums erfolgt zunächst Phase I des Fremdstoffmetabolismus. Hierunter wird eine Funktionalisierung der zunächst lipophilen und apolaren Verbindung verstanden. Dabei werden unter anderem Oxidierungen, Reduktionen und Hydrolysen katalysiert, wodurch ein polarer Phase I-Metabolit generiert wird. Oft sind innerhalb dieser Phase Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase (Cyp)-Enzyme der Familien 1 - 3 beim Menschen involviert. Dieser Phase I-Metabolit wird dann in der Phase II des Xenobiotikametabolismus durch die enzymatische Konjugation von hydrophilen Verbindungen wie reduziertem Glutathion (GSH) über Glutathion-S-Transferasen (Gst) gallengängig und damit ausscheidbar gemacht.<sup>12</sup>

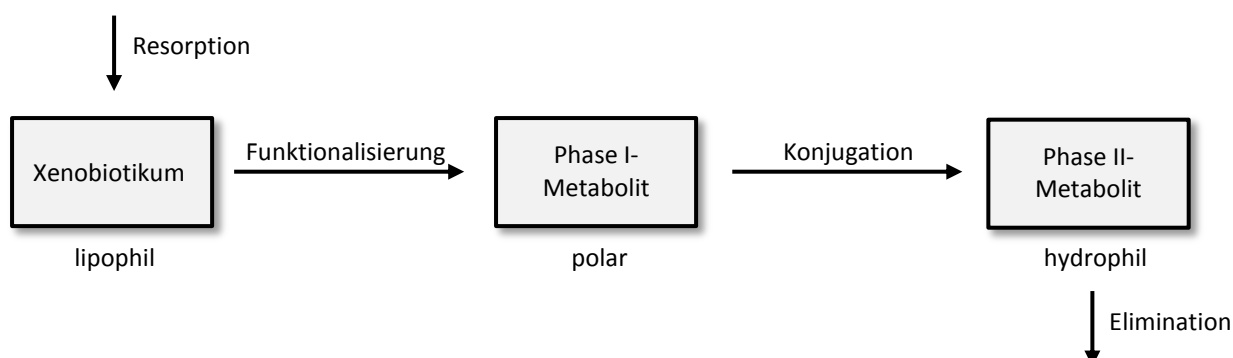


Abb. 1.1: Prinzip des Fremdstoffmetabolismus.

Zu den Xenobiotika, die im Tabakrauch zu finden sind, gehören auch polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH). PAH entstehen infolge der unvollständigen Verbrennung organischer Substanzen und sind in einer Vielzahl struktureller Verbindungen im Zigarettenrauch vertreten. Benzo[*a*]pyren (B[*a*]p) wird dabei stellvertretend für die PAH als Leitsubstanz verwendet. Kommt es zu einer Resorption von PAH wie B[*a*]p im Atemwegsepithel, werden diese Verbindungen intrazellulär vom Transkriptionsfaktor *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) gebunden. Der dimere Komplex transloziert daraufhin in den Nukleus, wo zusätzlich das Protein *AhR nuclear translocator* (ARNT) an das Komplexdimer bindet. Final kann der daraufhin entstandene, trimere Komplex an die *xenobiotic response element* (XRE)-Konsensussequenz des Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA)-Strangs binden und induziert damit unter anderem die Expression von *Cyp1a1* (s. Abb. 1.2).<sup>12</sup> Das Gen kodiert für das Enzym Cyp1a1, welches den Abbau von PAH innerhalb des Xenobiotikametabolismus über eine Oxidation einleitet.<sup>12</sup> Folglich induziert die Anwesenheit von PAH ihren eigenen Abbau. Im Falle der Verstoffwechslung der an sich inerten PAH erfolgt eine metabolische Aktivierung der ursprünglichen Verbindungen, da im Laufe der Biotransformation intermediär radikale Strukturen entstehen<sup>13</sup>, die den Organismus mit oxidativem Stress konfrontieren.

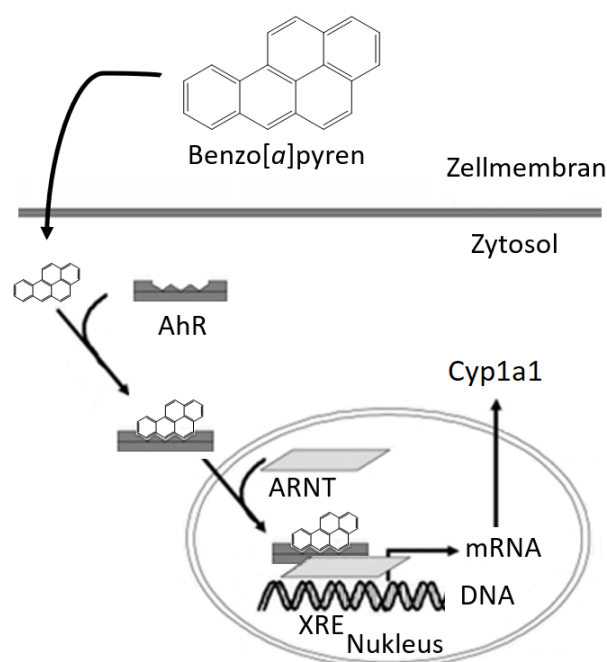
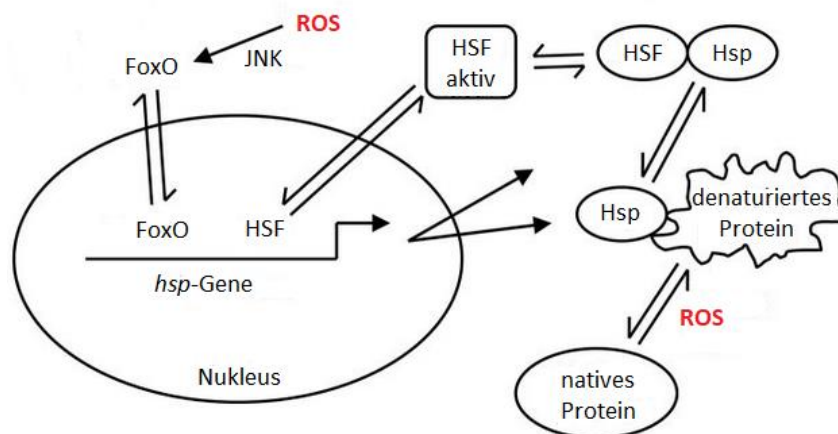


Abb. 1.2: PAH-induzierte Synthese von Cyp1a1 (modifiziert nach VOHR<sup>14</sup>).

### 1.1.3 Oxidative Stressantwort

Neben dem oxidativen Stress, den ein Organismus im Zuge des Fremdstoffmetabolismus erfahren kann, bedeutet auch die Exposition mit Zigarettenrauch an sich eine Konfrontation mit reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Dabei wird geschätzt, dass ein Zug an einer Zigarette bis zu  $10^{15}$  Radikalmoleküle mit sich führt.<sup>15</sup> Dazu gehören sowohl kurzlebige Verbindungen wie Hydroxylradikale als auch langlebige Semichinonradikale.<sup>15</sup> Radikale, die aufgrund ihres ungepaarten Elektrons zumeist sehr reaktiv sind, haben diverse Effekte auf einen Organismus und wirken unter anderem proteotoxisch. So kann die Anwesenheit von Radikalen zu Modifikationen an der Proteinsequenz führen, die ihrerseits zur Konformationsänderung, Destabilisierung und Entfaltung des betroffenen Proteins führen kann. Dadurch kann wiederum die Funktion des betroffenen Proteins aufgehoben oder verändert werden oder hat gar adverse Wirkungen auf den Organismus inne.<sup>16-18</sup> Die Chaperonmaschinerie wirkt diesem entgegen und ist verantwortlich für die Reparatur derartiger Schäden. So kann die Proteinfamilie der Chaperone bestehende Proteinaggregate denaturierter Proteine auflösen, deren Bildung inhibieren und die Refaltung von entfaltenen Proteinen koordinieren.<sup>16, 19</sup> Zu den Chaperonen gehören unter anderem *heat shock cognates*, die konstitutiv im Gewebe synthetisiert werden und eine erste Verteidigungslinie auch gegenüber den im Zuge des Metabolismus generierten ROS bilden.<sup>20, 21</sup> Dahingegen werden Hitzeschockproteine (Hsp) durch die Anwesenheit exogener, denaturierend wirkender Stressoren wie beispielsweise Zigarettenrauch verstärkt gebildet.<sup>16, 19</sup> Dies geschieht unter anderem durch die ROS-vermittelte Aktivierung der C-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalkaskade, woraufhin der Transkriptionsfaktor *forkhead Box, subfamily O* (FoxO) an die *heat shock response element* (HSE)-Konsensussequenz der DNA bindet und die Synthese von Hsp initiiert.<sup>19, 22</sup> Aber auch infolge der Bindung von Hsp an denaturierte Proteine kann der an Hsp assoziierte Transkriptionsfaktor *heat shock transcription factor* (HSF) freigesetzt und damit aktiviert werden.<sup>19</sup> Nach Translokation von HSF in den Nukleus und Bindung an das HSE-Motiv der DNA wird die Expression von *hsp*-Genen eingeleitet.<sup>19</sup> Nachdem das denaturierte Protein allseits von Hsp gebunden wurde, können nicht assoziierte Chaperone HSF binden und somit über eine negative Rückkopplung die Stressantwort beenden<sup>19</sup> (s. Abb. 1.3). Von allen Hsp zählt das kleine, ubiquitär vorkommende, hochkonservierte Hitzeschockprotein 70 kDa (Hsp70)<sup>16, 19</sup> zu den am besten untersuchten Chaperonen.



**Abb. 1.3: Synthese von Hitzeschockproteinen (modifiziert nach TOWER<sup>19</sup>).**

Im Zuge einer Konfrontation mit Zigarettenrauch werden der Xenobiotikametabolismus und die oxidative Stressantwort im Atemwegsepithel der Lunge aktiviert<sup>23-29</sup>, um den Organismus vor den adversen Auswirkungen von Fremdstoffen und ROS zu schützen. Jedoch können Alterungsprozesse<sup>30-33</sup> oder exogene Faktoren wie Nahrung<sup>34</sup> diese Prozesse verändern und auch zur Pathogenese von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen beitragen<sup>35-37</sup>. Dabei haben das Atemwegsepithel, oxidativer Stress und der Fremdstoffmetabolismus eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen inne. Besonders Polymorphismen in Genen, die mit diesen drei Faktoren assoziiert werden, schlagen sich in einem erhöhten Risiko für Atemwegserkrankungen nieder.<sup>38-42</sup> Dies unterlegt sowohl die Bedeutung der Atemwegsepithelintegrität, eines funktionsfähigen Xenobiotikametabolismus als auch einer adäquaten oxidativen Stressantwort für den Erhalt der Lungengesundheit.

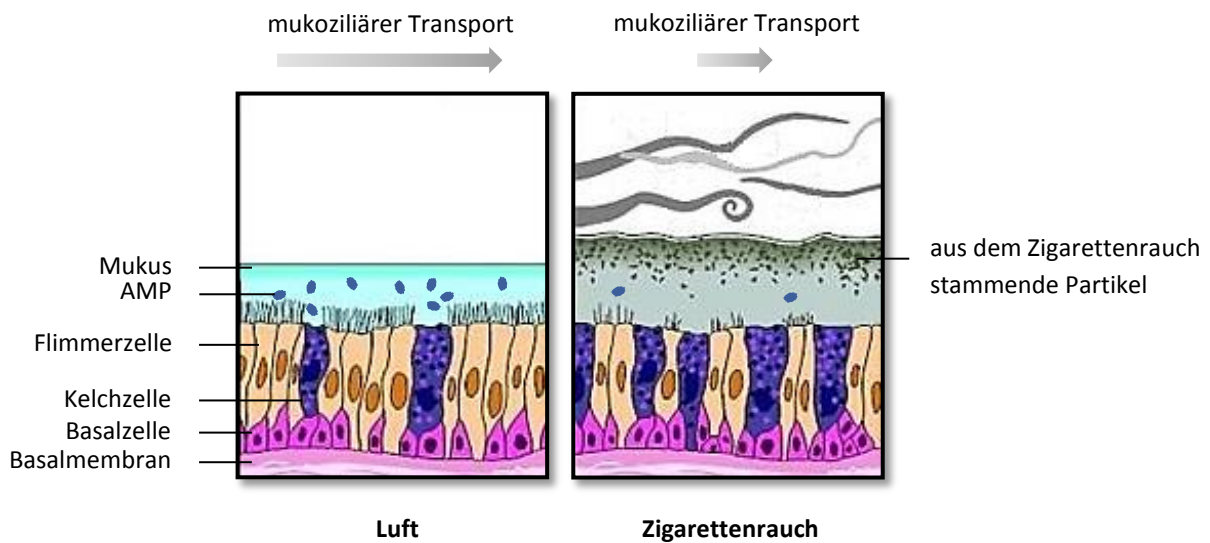
## 1.2 Die Auswirkungen des Tabakkonsums auf das Atemwegsepithel

Ein intaktes Epithel ist unabdinglich für den Erhalt der Lungenhomöostase. Infolge einer akuten Zigarettenrauchexposition kommt es jedoch durch den begleitenden oxidativen Stress zu adversen Auswirkungen auf das Lungenepithel. Durch die ROS-induzierte Apoptose der Epithelzellen kommt es zum Einstrom von Makrophagen in das Lungengewebe, um apoptotische Zellen zu eliminieren. Infolge der von Makrophagen und Epithelzellen ausgehenden Sekretion des Zytokins Interleukin (IL)-8 werden zusätzlich chemotaktisch neutrophile Granulozyten in das betroffene Gewebe rekrutiert, um Zellschäden zu reparieren.<sup>43,44</sup> Jedoch wird keine Ausschüttung proinflammatorischer

Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) durch die Makrophagen induziert.<sup>43</sup> Und auch ein Einstrom von Eosinophilen wird nicht beobachtet<sup>43</sup>, welcher charakteristisch für eine Entzündungsreaktion ist. Vermutlich wird dies durch die antiinflammatorischen Eigenschaften von im Zigarettenrauch befindlichem Kohlenstoffmonoxid (CO) bedingt.<sup>43</sup>

Die aufgeführten Reaktionen infolge des Eindringens von Fremdstoffen wirken sich bei einer akuten Konfrontation mit Zigarettenrauch protektiv aus. Die ROS-vermittelten Gewebeschäden werden repariert und eine Rückkehr zum physiologisch gesunden Zustand ist möglich. Dahingegen kann es bei chronischer Belastung zu pathophysiologischen Veränderungen kommen (s. auch Abb. 1.4). Eine permanente Tabakrauchexposition führt zu einer veränderten physikalischen und chemischen Barrierefunktion des Atemwegsepithels. Eine andauernde Konfrontation mit Zigarettenrauch hat die vermehrte Synthese von Becherzellen auch in den peripheren Atemwegen zur Folge, die mit einer verstärkten Mukusproduktion einhergeht.<sup>45</sup> Gleichzeitig schädigt Zigarettenrauch die Zilien-tragenden Flimmerzellen, indem die Zilienlänge durch veränderte Wachstumsprozesse reduziert wird, sich der Zilienschlag verlangsamt oder die Zellen an sich morphologisch aberrant sind.<sup>46, 47</sup> Die erhöhte Menge an Mukus kann durch die beeinträchtigte Funktion der Flimmerzellen nicht mehr aus der Lunge eliminiert werden. Die Anreicherung von Mukus kann wiederum zu einer Destabilisierung oder einem Verschluss der peripheren Atemwege führen.<sup>45</sup> Auch bedingt Zigarettenrauch eine verminderte Expression von AMP kodierenden Genen wie  *$\beta$ -Defensinen*.<sup>48</sup> Die somit beeinträchtigte Immunantwort führt zu einer Akkumulation von Mikroorganismen und aus dem Rauch stammender Partikel in der Lunge.

Eine chronische Tabakrauchbelastung vermindert die physikalische Barrierefunktion des Gewebes und erhöht somit auch die epitheliale Permeabilität. Zum einen kann die Integrität der Zellmembran, die zu einem Großteil aus einer zweilagigen Schicht aus Lipiden besteht, nicht mehr aufrechterhalten werden. Dabei beeinträchtigen die durch ROS gebildeten Lipidperoxidationsprodukte die Permeabilität der Zellmembran.<sup>49</sup> Zum anderen kommt es bei Konfrontation mit Zigarettenrauch zu einer verminderten Expression von für Adhäsionsverbindungskomponenten kodierenden Genen, die für die Integrität des Atemwegsepithels verantwortlich sind. Hierbei werden Komponenten der *Adherens Junctions* wie *E-Cadherin* im Zigarettenrauch-konfrontierten Epithel dysreguliert.<sup>50-52</sup> Aber auch eine verminderte Expression von Bestandteilen der *Tight Junctions* wie  *$\beta$ -Catenin* führt zu einer veränderten, epithelialen Barriere.<sup>52, 53</sup> Durch ebenjenes, partiellen Funktionsverlust erhöht sich die Zellpermeabilität und auch die Atemwegsintegrität wird vermindert.<sup>50, 51, 54, 55</sup> Infolge der beeinträchtigten epithelialen Barriere kommt es zu einer verstärkten Invasion von Fremdpartikeln und Mikroorganismen in das Lungengewebe.



**Abb. 1.4: Vereinfachte, schematische Darstellung eines gesunden und eines mit Zigarettenrauch exponierten Atemwegsepithels.** Links: Das pseudostratifizierte Epithel der Bronchien besteht aus Basalzellen, Zilien tragenden Flimmerzellen und Mukus produzierenden Kelch-Zellen. Ein luminal gelegener Mukusfilm schützt das Atemwegsepithel. Rechts: Durch chronische Konfrontation mit Zigarettenrauch verändert sich das Atemwegsepithel. Infolge einer Kelchzellenhyperplasie kommt es zur verstärkten Produktion von Mukus. Die Zilien der Flimmerzellen sind verkürzt und können den mukoziliären Transport nur wenig gewährleisten. Dies führt zu einer Akkumulation von exogenen Partikeln und Mikroorganismen in den Bronchien. Ebenfalls wird die epitheliale Barriere beeinträchtigt, sodass es zu einer verstärkten Invasion aus dem Rauch stammender Partikel in das Atemwegsepithel und das darunter liegende Gewebe kommen kann (in Grafik nicht dargestellt) (modifiziert nach <sup>56</sup>).

Die Reparaturmaschinerie wird durch eine Deregulation der Notch-Signalkaskade sowie des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin (kurz: Wnt)-Signalwegs eingeleitet.<sup>53, 57</sup> Jedoch erscheint das Reparaturvermögen verzögert<sup>58</sup>, möglicherweise aufgrund eines verminderten Vorliegens des Wachstumsfaktors *fibroblast growth factor-2* (FGF-2)<sup>59</sup>. Dies führt zu einem zusätzlichen Eindringen von exogenen Partikeln und aktiviert weiter die Immunantwort. Infolge einer chronischen Zigarettenrauchexposition infiltrieren nun auch Eosinophile die Submukosa der peripheren Atemwege<sup>60</sup>, welche die Immunantwort weiter fördern. Daher äußert sich der Tabakkonsum neben einer verminderten Lungenfunktion<sup>61, 62</sup> auch in einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Infektionen des Respirationssystems<sup>63</sup>.

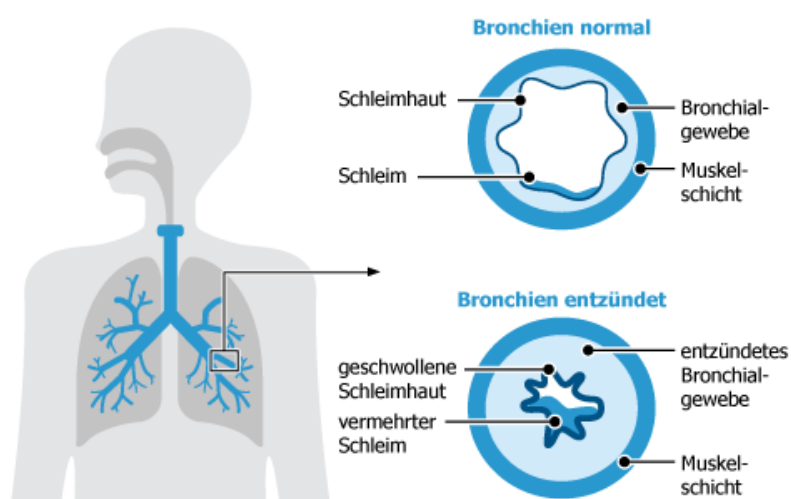
Aufgrund der Vielzahl an Xenobiotika und ROS, die der Zigarettenrauch mit sich bringt, kommt es zu einer Aktivierung des Fremdstoffmetabolismus und der oxidativen Stressantwort. Aber auch auf transkriptioneller Ebene reagiert der Organismus auf die Zigarettenrauchexposition. Dabei erfolgt besonders die Aktivierung des proinflammatorisch wirkenden Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der auch als Rauchsensor betrachtet wird.<sup>64, 65</sup> Ebenso wird die Synthese des redoxsensitiven Transkriptions-

faktors Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2*) sowie die Expression von *transcription factor 7-like 1 (Tcf7l1)*, einem Transkriptionsfaktor des kanonischen Wnt-Signalwegs, durch eine Konfrontation mit Zigarettenrauch moduliert.<sup>53, 65</sup> Diese dirigieren die nachfolgenden Reaktionskaskaden der Inflammation, der oxidativen Stressantwort sowie die Regeneration des geschädigten Gewebes.

### 1.3 Chronisch-entzündliche Lungenerkrankungen und Tabakkonsum

Ein physikalisch, chemisch, immunologisch und metabolisch intaktes Atemwegsepithel ist unverzichtbar für die optimale Versorgung mit Sauerstoff bei gleichzeitiger Abwehr von Fremdkörpern und Mikroorganismen. Es gibt jedoch zahlreiche Erkrankungen der Lunge, die durch eine beeinträchtigte Barrierefunktion gekennzeichnet sind. Dazu gehören unter anderem chronisch-entzündliche Erkrankungen der Atemwege wie *Asthma bronchiale* und COPD.

Klinisch äußern sich diese Erkrankungen durch pfeifende Atemgeräusche (Giemen), Husten, einem Engegefühl in der Brust sowie Kurzatmigkeit. Weiterhin treten immer wieder Fälle akuter Atemnot (Dyspnoe) auf. Pathophysiologisch werden die Symptome durch eine chronische Entzündung der Atemwege, unter Beteiligung der angeborenen und adaptiven Immunantwort, bedingt. Dies führt neben einer Hypertrophie der glatten Atemwegsmuskulatur auch zu einem Anschwellen der bronchialen Mukosa, einer erhöhten Mukusproduktion und der Obstruktion der Bronchien (s. Abb. 1.5). Auch wird eine Umstrukturierung der Atemwege (*airway remodelling*) beobachtet.



**Abb. 1.5: Vergleich von gesunden Bronchien (oben rechts) und entzündeten Atemwegen (unten rechts).**<sup>66</sup> Aufgrund der durch die Entzündungsreaktion verstärkten Durchblutung kommt es zu einem Anschwellen der in den Bronchialwänden befindlichen Schleimhäute. Weiterhin tritt eine erhöhte Mukusproduktion auf. Dadurch verringert sich der Atemwegsdurchmesser, wodurch sich die klinischen Symptome bedingen.

Sowohl Asthma also auch COPD werden bereits aufgrund ihrer hohen Prävalenzrate als Volkskrankheiten bezeichnet. In Deutschland leiden bundesweit 5 % der Erwachsenen an *Asthma bronchiale*, Kinder erkranken etwa doppelt so häufig.<sup>66</sup> Etwa 10 - 12 % der über 40-jährigen Bundesbürger sind an einer COPD erkrankt.<sup>66</sup> Auch von einem Geschlechtsunterschied wird berichtet, wobei Jungen im Kindesalter suszeptibler gegenüber der Entwicklung von Asthma als Mädchen sind.<sup>66, 67</sup> Dieses Verhältnis kehrt sich jedoch mit zunehmendem Alter um, sodass erwachsene Frauen häufiger an Asthma erkranken als Männer.<sup>66, 67</sup> Auch von COPD sind mehr Frauen als Männer betroffen.<sup>68</sup>

Die Pathogenese von *Asthma bronchiale* und COPD wird zum einen durch genetische Faktoren begünstigt. Dabei werden unter anderem Polymorphismen des Gens *α disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33)* mit einer erhöhten Suszeptibilität assoziiert, eine chronisch-entzündliche Atemwegserkrankung zu entwickeln.<sup>69, 70</sup> Als komplexe Erkrankungen bedingen zum anderen aber auch äußere Faktoren ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung dieser Atemwegserkrankungen. Hierbei stellt besonders Zigarettenrauch einen bekannten Suszeptibilitätsfaktor dar. Während etwa 25 % aller Asthmatiker zum Zeitpunkt der Erkrankung Raucher sind<sup>71</sup>, entwickeln etwa doppelt so viele Tabakkonsumenten im Laufe ihres Lebens eine COPD.<sup>72</sup> Dies wird vermutlich durch das hohe Maß an irritativen Substanzen und oxidativen Stress, der von dem Tabakrauch begleitet wird<sup>11</sup>, bedingt. Eine wiederholte bzw. dauerhafte Exposition mit einem Risikofaktor wie Zigarettenrauch führt neben der Entwicklung von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen auch zur Progression des Krankheitsbilds sowie zu Exazerbationen. Inzwischen häufen sich auch die Berichte, dass die Anfälligkeit für die Entwicklung von Asthma im Kindesalter bei den direkten Nachkommen und Kindeskindern beeinflusst wird, sofern die Mütter während der Schwangerschaft Zigaretten konsumiert haben.<sup>73-78</sup> Dabei weisen Mädchen durch das maternale Rauchen während der Gestation ein höheres Risiko an Asthma zu erkranken auf.<sup>75</sup> Aber auch Väter, die vor der Pubertät geraucht haben, zeugen Nachkommen, die ein höheres Risiko haben Asthma im Kindesalter zu entwickeln.<sup>79</sup> Dergleichen ist bisher nicht für COPD berichtet worden. Jedoch wird vermutet, dass der Tabakkonsum während der Schwangerschaft ebenfalls die Anfälligkeit für eine COPD bei den Nachkommen fördert.<sup>80</sup> Dies legt nahe, dass neben genetischen und Umweltfaktoren auch die Epigenetik zur Pathogenese beiträgt.

Da viele Mechanismen und Gene, die chronisch-entzündliche Atemwegserkrankungen wie *Asthma bronchiale* und COPD bedingen, noch nicht vollständig verstanden bzw. bekannt sind, ist die Grundlagenforschung unabdingbar. Für diese Untersuchungen müssen geeignete Modellorganismen gefunden werden, mit denen möglichst viele Aspekte der jeweiligen Erkrankung abgedeckt werden. Gleichzeitig muss das verwendete Modellsystem jedoch auch anderen Anforderungen wie



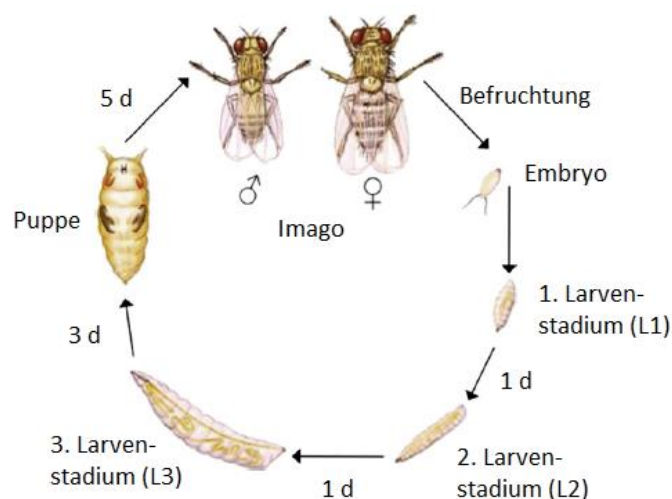
pekuniären Aspekten und die Möglichkeit der genetischen Manipulation gerecht werden. Hierbei hat sich der Invertebrat *Drosophila melanogaster* als hervorragendes Modell zur Untersuchung einer Vielzahl von Fragestellungen herauskristallisiert.

#### 1.4 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Die Schwarzbäuchige Taufliege *Drosophila melanogaster*, gemeinhin auch als Fruchtfliege bezeichnet, gehört mit zu den ältesten Modellorganismen und wurde erstmals 1830 von Johann Wilhelm Meigen beschrieben. Doch erst durch die genetischen Studien von Thomas Hunt Morgan an Taufliegen wurde das eigentliche Potential von *Drosophila* erkannt. Er erhielt dafür 1933 den Nobelpreis für Medizin.

Durch die Sequenzierung des Genoms von *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass das Genom eine Größe von etwa 13 600 Genen aufweist.<sup>81</sup> Dabei besitzen etwa 60 % aller im Menschen bekannten Krankheitsgene Homologe bei *Drosophila*.<sup>82</sup> Aufgrund dessen dient die Taufliege von jeher als populärer Modellorganismus zur Untersuchung von diversen Erkrankungen wie neurodegenerativen und kardiovaskulären Krankheiten sowie metabolischen Erkrankungen. Dies ist vor allem durch die Konservierung relevanter Signalwege bei gleichzeitig einfacherer Organisation des Genoms bedingt. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass weniger redundante Gene bei *Drosophila* vorhanden sind als beispielsweise beim Menschen.

Die Beliebtheit der Taufliege in der Forschung ist neben der Eignung als Modell für Humankrankheiten auf vielerlei weitere Faktoren zurückzuführen: Durch die geringe Größe des Insekts (etwa 3 mm) ist die Haltung kostengünstig und platzsparend. Außerdem gestaltet sich die Arbeit mit *Drosophila* als verhältnismäßig unkompliziert sowohl auf handhabungsbezogener als auch auf rechtlicher Ebene. Weiterhin sind für *Drosophila* die hohe Fertilität und die kurze Generationszeit charakteristisch. Als holometaboler Invertebrat durchläuft *Drosophila* einen temperaturabhängigen Metamorphosezyklus mit drei distinkten Stadien – Embryo, Larve und Imago. Bei 25 °C dauert dieser Zyklus vom Embryo bis zur adulten Fliege etwa zehn Tage (s. Abb. 1.6). Je nach Stamm und Haltungsbedingungen können die Imagines dann wenige Wochen bis Monate alt werden und weisen damit in Hinsicht auf die Untersuchung der Gesamtlebensdauer oder der Verwendung mehrerer Generationen einen deutlichen Vorteil gegenüber Vertebratenmodelle auf.



**Abb. 1.6: Metamorphosezyklus von *Drosophila melanogaster* bei 25 °C.** Nach etwa 24 h schlüpft aus einem befruchteten Ei eine Larve, die innerhalb von fünf Tagen drei Larvenstadien (L1, L2, L3) durchläuft. Nach Vollendung des dritten und letzten Larvenstadiums verpuppt sich die Larve und es schlüpft nach weiteren fünf Tagen die adulte Fliege (modifiziert nach WANGLER UND BELLEN<sup>83</sup>).

Vor allem aber hat das Vorhandensein einer Vielzahl von genetischen Werkzeugen wie beispielsweise dem GAL4/*upstream activating sequence* (UAS)-System, welches 1993 von BRAND und PERRIMON eingeführt wurde<sup>84</sup>, die Anwendung des Modellorganismus *Drosophila* revolutioniert. Mit Hilfe dieses binären Systems können einzelne Gene räumlich und zeitlich definiert vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Auf diese Weise kann der Einfluss eines einzelnen Gens auf das jeweilige Organ untersucht werden. Besonders durch das GAL4/UAS-System kann die Taufliege schnell, einfach und kostengünstig an eine Vielzahl an experimentelle Bedingungen und Fragestellungen adaptiert werden. Dies birgt einen weiteren, enormen Vorteil gegenüber Säugermodellssystemen. Doch selbst im Vergleich zu anderen Invertebratenmodellen ist dieses breite Anwendungsspektrum ein wahres Alleinstellungsmerkmal bei *Drosophila*. Auch das Atemwegssystem ist durch das GAL4/UAS-System genetisch manipulierbar. Die Taufliege verdankt es jedoch nicht nur diesem genetischen Werkzeug, dass es seit nunmehr zehn Jahren als Modell für Atemwegserkrankungen verwendet wird.<sup>38, 85, 86</sup> Auch der einzigartige Aufbau und die Eigenschaften des Atemwegsystems sind hierfür maßgeblich verantwortlich.

## 1.5 Das Atemwegssystem von *Drosophila melanogaster*

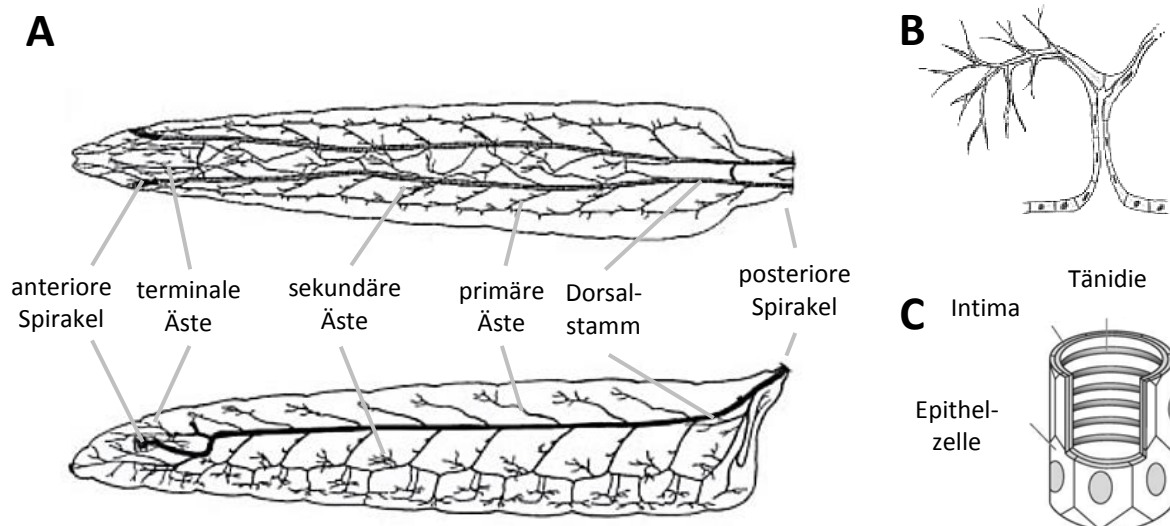
Die Versorgung mit Sauerstoff wird bei Vertebraten durch die Lunge wahrgenommen. Bei Invertebraten stellen die Tracheen das funktionelle Analogon zu diesem Organ dar und sind damit für den Gastransport und -austausch im gesamten Organismus verantwortlich.

Bei Larven gelangt die umgebende Luft über verschließbare Spirakel in das Atemwegssystem von *Drosophila*. Dabei besitzt die Larve je ein Spirakelpaar an der posterioren und anterioren Seite, wobei letzteres sich erst zum Ende des dritten Larvenstadiums (L3) hin öffnet. Der Transport der Umgebungsluft durch den Körper verläuft weitgehend passiv über Diffusion, jedoch unterstützt auch Bewegung der Larve sowie die Peristaltik die Verteilung innerhalb des Korpus. Während des Larvenstadiums sind die Tracheen hierarchisch organisiert. Die Atemwege besitzen eine bilateral symmetrische Struktur, die sich mit jedem Segment wiederholt: Von den zwei parallel zueinander verlaufenden Hauptästen des Tracheensystems, den Dorsalstämmen, die sich je vom anterioren zum posterioren Ende erstrecken, zweigen sich auf stereotypische Weise primäre Äste ab. Die inneren primären Äste sind kurz und verlaufen dorsal, wohingegen die äußeren primären Äste einen durchgängigen Längsstamm an den Seiten der Larve ausbilden. Aus den primären Ästen gehen, ebenfalls stereotypisch, sekundäre Äste hervor. Am Ende der sekundären Äste sind terminale Zellen zu finden, die mehrere dendritische Ausläufer ausbilden. Diese werden auch als terminale Äste bezeichnet (s. Abb. 1.7 - A). Die Anzahl der blind endenden Ausläufer sind im Gegensatz zu der der primären und sekundären Äste variabel und werden unter anderem durch den vorhandenen Sauerstoffgehalt determiniert. Die Entwicklung der Ausläufer führt zu einer Oberflächenvergrößerung und hat damit eine effiziente Versorgung des umliegenden Gewebes mit Sauerstoff zur Folge (s. Abb. 1.7 - B). Insgesamt bildet das larvale Tracheensystem auf diese Weise ein Netzwerk von etwa 10 000 miteinander verbundenen Röhren aus.<sup>87-91</sup>

Unabhängig vom Verzweigungsgrad besteht jeder Ast aus einem einschichtigen Epithel, welches den luftführenden Raum umgibt und die Grenze zwischen Umwelt und Organismus bildet. Über dieses Epithel gelangt Sauerstoff in die umliegenden Gewebe und Organe. Das Epithel ist lumenseitig zusätzlich von einer dünnen Kutikulaschicht bedeckt. Durch die spiralartig angeordneten Ausstülpungen der Kutikula, den Tänäidien, wird das Kollabieren der Trachealäste verhindert und die Stabilisierung der trachealen Äste gewährleistet (s. Abb. 1.7 - C).<sup>87-91</sup> Zusätzlich fungiert die Kutikulaschicht als eine physikalische Barriere und kann als wenig permeables System so das Eindringen von Mikroorganismen in das Trachealgewebe verhindern.<sup>92</sup> Sollten Mikroorganismen diese Barriere überwinden, kann das Epithel diese mit Hilfe seiner angeborenen Immunantwort unschädlich machen. Dazu gehören die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs *immune deficiency* (IMD) sowie die Initiierung der modulatorisch wirkenden und mit Reparaturmechanismen assoziierten

Signalkaskade Januskinase/*signal transducer and activator of transcription* (Jak/STAT) sowie des auf oxidativen Stress reagierenden Signalwegs JNK.<sup>93</sup>

Das Tracheensystem der Larven wird während der Metamorphose umstrukturiert, sodass sich das Atemwegsnetzwerk im adulten Entwicklungsstadium grundlegend von dem der Larve unterscheidet. Hierbei besitzen die adulten Taufliegen, die Imagines, neun paarweise an den gegenüberliegenden Seiten zu findende, verschließbare Tracheenöffnungen, die Spirakel, am Thorax und Abdomen, über die die Umgebungsluft in den Körper gelangt. Auch die Imagines können die Verteilung der Luft in den Atemwegen über Muskelkontraktionen unterstützen. Bei der adulten *Drosophila* bilden die Tracheen ein sich im gesamten Körper befindliches, weit verzweigtes, tubuläres Netzwerk aus feinen Ästen aus. Weiterhin sind sowohl im Kopf als auch im Abdomen Luftsäcke angesiedelt, die als dilatierte Tracheen, denen es an taenidialen Strukturen fehlt, für den Gasaustausch zuständig sind. Wie das der Larven ist auch das Tracheensystem der adulten *Drosophila* ein einschichtiges Epithel mit immunkompetenten Eigenschaften.<sup>87-90</sup>



**Abb. 1.7: Das Tracheensystem der *Drosophila*-L3-Larve.** A: Schematischer Aufbau des larvalen Tracheensystems aus dorsaler (oben) und lateraler Sicht (unten). Über anterior und posterior gelegene Spirakel kann die Umgebungsluft in den Organismus gelangen und wird größtenteils über Diffusion durch das weit verzweigte Netzwerk in den ganzen Körper geleitet (modifiziert nach GHABRIAL *et al.*<sup>88</sup>). B: Terminale Zellen bilden stark verzweigte Ausläufer, wodurch infolge der Oberflächenvergrößerung eine optimale Versorgung mit Sauerstoff gewährleistet wird (modifiziert nach GHABRIAL *et al.*<sup>88</sup>). C: Das Tracheenepithel ist luminal mit einer kutikulären Schicht überzogen, welche eine zirkuläre Faltenstruktur, die Tänäidien, ausbildet. Dadurch wird der Tracheentubus stabilisiert (modifiziert nach HARRISON<sup>94</sup>).

## 1.6 *Drosophila* bei der Erforschung von Atemwegserkrankungen

Es vermag zunächst etwas kurios erscheinen, eine Taufliege bei der Untersuchung von Atemwegserkrankungen wie *Asthma bronchiale* und COPD einzusetzen. *Drosophila* zeigt keine phänotypischen Symptome wie sie beim Menschen zu finden sind: Sie hustet und keucht nicht und auch sonst sind weitere Unterschiede auf der physiologischen Ebene zu finden. So findet beispielsweise kein mukoziliärer Transport statt, Sauerstoff wird durch die fehlende aktive Atmung vorwiegend passiv im Atemwegstrakt verteilt und die Taufliege besitzt kein klassisches adaptives Immunsystem, dem bis vor Kurzem eine zentrale Rolle bei der Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen zugeschrieben wurde.<sup>38</sup>

Neuere Studien zeigen jedoch, dass auch die angeborene Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von chronischen Atemwegserkrankungen spielt.<sup>38, 95-98</sup> Daher wird *Drosophila* seit über einem Jahrzehnt als ein etabliertes Modellsystem verwendet, um Dysfunktionen der angeborenen Immunantwort und epitheliale Veränderungen der Atemwege zu untersuchen.<sup>38, 85, 86</sup> *Drosophila* bietet die einmalige Möglichkeit Fragestellungen bezüglich der angeborenen Immunantwort unabhängig von der adaptiven Immunantwort *in vivo* zu untersuchen. Bei Vertebraten ist aufgrund der Kopplung dieser beiden Systeme eine separate Untersuchung nicht möglich. Auch besitzt die Taufliege ein immunogenes, einschichtiges Atemwegsepithel.<sup>88, 93</sup> Dahingegen ist das humane Atemwegsepithel weitaus komplexer und besteht als pseudostratifizierte Epithel aus Basalzellen, Becherzellen, Zilien-tragenden Flimmerzellen und Clara-Zellen. Weiterhin sind viele Gene und Mechanismen, die die Atemwegsentwicklung betreffen, stark konserviert, wie beispielsweise der kanonische Wnt-Signalweg und der mit der Immunantwort assoziierte NF- $\kappa$ B-Signalweg. Auf diese Weise sind Funktionen von Biomolekülen und Signalkaskaden bei der Taufliege mit denen bei Säugern wie Maus und Mensch miteinander vergleichbar. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber Zellkulturen, die zwar ein größeres Spektrum an Zelltypen und je nach Kulturursprung gleiche oder ähnliche Gene und Proteine wie der Mensch vorweisen, jedoch nicht immunreaktiv sind.<sup>38, 85</sup> Durch das Vorliegen nur eines Zelltyps in den Atemwegen von *Drosophila* sowie durch die geringere genetische Redundanz in diesem Organismus ist die Komplexität deutlich verringert. Es können auf diese Weise eher Aussagen über die Funktion eines bestimmten Gens oder Proteins im Organismus der Taufliege getroffen werden, welche auf diese Weise Rückschlüsse auf die jeweilige Funktion in einem komplexeren System zulassen. Unter anderem erlaubt die Taufliege als Modellorganismus die nähere Untersuchung molekularer Aspekte des *airway remodelling* zu. Aber auch phänotypisch lässt sich das *airway remodelling* gut bei *Drosophila* nachstellen: Infolge einer Infektion mit dem Gram-negativen Bakterium *Pectobacterium carotovorum* *Ecc15* kommt zur Aktivierung des IMD-Signalwegs (homolog zu humanem TNF- $\alpha$ ). Dies wiederum führt zu einer verstärkten Proliferation der Zellen im

Atemwegstrakt, welches sich wiederum in einer Epitheldickenverdickung äußert.<sup>99</sup> Diese morphologische Transformation führt zu einer Verengung der Atemwege und könnte die Sauerstoffversorgung in den Tieren vermindern.<sup>85</sup> Die Verdickung des Atemwegepithels könnte auch eine Metaplasievorstufe widerspiegeln – eine Situation, die auch in den Atemwegen von an *Asthma bronchiale* Erkrankten beschrieben wird.<sup>85, 99</sup> Dies unterstreicht weiter die Eignung von *Drosophila* als geeignetes *in vivo*-Modellsystem, um epitheliale Signalwege und Suszeptibilitätsgene zu untersuchen, von denen vermutet wird, eine Rolle bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen der Atemwege wie *Asthma bronchiale* oder COPD zu spielen.

Trotz der Eignung von *Drosophila* als Modellsystem zur Untersuchung von Atemwegserkrankungen stellt sich die Frage, ob die Taufliege auch durch exogene Einflüsse wie Zigarettenrauch ebenfalls als *in vivo*-System für die Untersuchung von *Asthma bronchiale* und COPD verwendet werden kann.

## 1.7 Zielsetzung

Der Konsum von Zigaretten ist einer der am besten belegten Risikofaktoren für die Entstehung chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen wie *Asthma bronchiale* oder COPD. Findet der Kontakt mit Zigarettenrauch wiederholt über einen längeren Zeitraum statt, kann dies zu einer Verschlechterung des Krankheitsbilds führen. Jedoch sind nicht nur die Tabakkonsumenten selbst betroffen, auch die Nachkommen haben ein erhöhtes Risiko an einer chronischen Atemwegsentszündung zu erkranken, insbesondere, wenn die Eltern während vulnerabler Zeitfester ihrer eigenen Entwicklung Zigarettenrauch exponiert waren. Dies suggeriert bei den komplexen Erkrankungen nicht nur genetische und durch die Umwelt bedingte Auslöser, sondern auch eine erhöhte Suszeptibilität vermittelt durch epigenetische Mechanismen.

Zur Untersuchung grundlegender, medizinischer Fragestellungen, wie die nach der Aufklärung von Mechanismen der Entstehung chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen, werden häufig Modellorganismen herangezogen. Besonders die Rolle der Atemwegsepithelzellen und ihrer angeborenen Immunantwort stellen zwei wesentliche Komponenten der Pathogenese sowohl von *Asthma bronchiale* als auch der COPD dar. Eine im Säugetier vorliegende funktionelle Redundanz möglicherweise an der Pathogenese beteiligter Gene und die unumgängliche Verknüpfung der angeborenen mit der adaptiven Immunantwort erschweren eindeutige Schlussfolgerungen. Ein Modellorganismus, welcher sich durch das Fehlen einer klassischen adaptiven Immunantwort und durch ein simpel aufgebautes Atemwegsepithel auszeichnet und bereits seit vielen Jahren zur Untersuchung von Fragestellungen chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen beiträgt, ist die Taufliege *Drosophila melanogaster*. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung der

Taufliege als *in vivo*-Modell für die Untersuchung der Rolle von Zigarettenrauch bei der Entstehung chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen. Dabei untergliedert sich die Arbeit in drei Schwerpunkte mit folgenden Fragestellungen:

- 1.) Ist die Taufliege *Drosophila melanogaster* insbesondere während ihrer larvalen Entwicklungsphase in der Lage Zigarettenrauch in ihre Atemwege aufzunehmen und folglich als Modell für die Untersuchung der Einwirkung von Tabakrauch auf das Atemwegsepithel einsetzbar?
- 2.) Welche unmittelbaren Auswirkungen hat eine einmalige Zigarettenrauchexposition während vulnerabler Entwicklungsphasen im juvenilen Alter, also während des Larvenstadiums, und welche Auswirkungen hat eine solche Zigarettenrauchexposition auf die adulte Taufliege? Welche Auswirkungen hat eine wiederholte Zigarettenrauchexposition sowohl während vulnerabler Entwicklungsphasen im juvenilen Alter, also während des Larvenstadiums, als auch erneut im Erwachsenenalter und wie unterscheiden sich die Auswirkungen zur einmaligen Exposition?
- 3.) Welche Relevanz haben die Signalkaskaden im Menschen bei der Entwicklung chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen? Werden im Atemwegsepithel der Larven Gene und Signalkaskaden durch Zigarettenrauch moduliert, die auch bei der Entwicklung morphologisch aberranter Atemwege bei der Taufliege sind? Kann daher die Taufliege als Modellorganismus für die Untersuchung der Auswirkungen von Zigarettenrauch auf die Entstehung und Entwicklung chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen in Zukunft dienen? Gibt es Hinweise, dass auch spätere Generationen von der Exposition mit Zigarettenrauch beeinflusst werden könnten?

## 2 Material & Methoden

In diesem Kapitel werden die benötigten Materialien, die Fliegenhaltung, die Rauchexpositionsmaschine sowie die Vorbereitung, Durchführung und Nachbereitung von Zigarettenrauchexpositionsversuchen, die molekularbiologischen und alle weiteren, angewendeten Methoden näher beschrieben. Sämtliche Chemikalien und Medien sowie weitere Materialien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur (RT) gebracht, soweit nicht anders beschrieben. Larven und adulte Fliegen wurden bei einer Temperatur von 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 - 65 % gehalten, sofern nicht anders vermerkt. Die statistische Auswertung erfolgte im Falle der im Kapitel 2.11.4.1 beschriebenen Larvenviabilität mit den frei zugänglichen Programmen R<sup>100</sup> und R Studio<sup>101</sup>. Alle anderen Assays wurden mit Hilfe der kommerziellen Software GraphPad Prism 6 ausgewertet. Es wurde jeweils ein Signifikanzniveau  $\alpha < 0,05$  verwendet.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Antikörper und Farbstoffe

Tab. 2.1: Verwendete Antikörper und Farbstoffe.

Antikörper oder Farbstoff	Hersteller
$\alpha$ -Coracle	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA
AlexaFluor® 488 goat anti-mouse IgG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DAPI-Dihydrochlorid (4',6-Diamidin-2-phenylindol-Dihydrochlorid)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim



## 2.1.2 Chemikalien

Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Hersteller
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bierhefe	AntiForte® Bierhefe Pulver, Görges Naturprodukte GmbH, Brügge
Dichlorvos (2,2-Dichlorvinyl-dimethyl-phosphat)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
dNTP-Set (je Nukleotid 10 mM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DTT (1,4-Dithiothreitol) (100 mM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ethanol (EtOH), reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
5x First Strand Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
D-(+)-Glukose, ≥ 99,5 %, CELLPURE® wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Grapefruit Direktsaft (pink Grapefruit)	Penny Paradiso, riha WeserGold, Rinteln
Halokarbonöl (Halocarbon oil 700)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Kohlenstoffdioxid (CO <sub>2</sub> )	Westfalen AG, Münster
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Maismehl	Huber-Mühle GmbH, Hohberg
Methylparaben (Methyl-4-hydroxybenzoat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
NGS ( <i>normal goat serum</i> )	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
(-)-Nikotin	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Oligo-dT 12 - 18 Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd (PFA), reinst	Merck KGaA, Darmstadt
10x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (CELLPURE®, steril)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Propionsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Substanz	Hersteller
qRT-PCR-Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
RNaseOUT™ (40 U/μL)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Rübenmelasse	Königshofer Futtermittel natürlich, Assmannmühlen GmbH, Ebergassing
Salzsäure (HCl) (2 M)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Stickstoff (N <sub>2</sub> )	Westfalen AG, Münster
SuperScript® III Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (Trizma® Base)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Triton® X-100	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Trockenbackhefe	Backfee, Netto Marken-Discount AG & Co. KG, Maxhütte-Haidhof
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zuckerrohrmelasse	Emiko Handelsgesellschaft GmbH, Meckenheim

### 2.1.3 Kits

Tab. 2.3: Während der Arbeit genutzte Kits.

Kit	Hersteller
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies Inc., Waldbronn
Cotinin-ELISA (für Humanproben)	Calbiotech Inc., Spring Valley, CA, USA
Nucleo Spin® RNA Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TURBO DNA-free™ Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.4: Benötigte Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Herstellerbezeichnung/ weitere Produktangaben	Hersteller
6 <i>well</i> -Mikrotiterplatte, transparent	6 well cell culture plate tissue culture treated, nonpyrogenic polystyrene	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
96 <i>well</i> -Mikrotiterplatte, transparent (BCA)	96 well cell culture plate nonpyrogenic, round bottom	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
96 <i>well</i> -Mikrotiterplatte (qRT-PCR)	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Aqua braun	Aqua B. Braun Ecotainer®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Deckgläschen	Deckgläschen 24 x 60 mm, Dicke 0,13 – 0,16	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
<i>Drosophila</i> -Kulturgefäß (groß)	175 ml, PS, transparent, Ø 45 x 96 mm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
<i>Drosophila</i> -Kulturgefäß (klein)	PS, 50 ml, Ø 29 x 95 mm, Flachboden, hochtransparent	nerbe plus GmbH, Winsen
<i>Drosophila</i> -Kulturgefäß (mittel)	68 ml, PS, Ø 36 x 82 mm, transparent	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Filterkatuschen (Millipore-Anlage)	Sartopore® 2 150 Capsule 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Homogenisatorspitzen	Kimble® Einmal Pellet Kolben, 1,5 ml	Scherf-Präzision Europa GmbH, Meiningen
<i>ibidi mounting medium</i>	IMM <i>ibidi mounting medium</i>	<i>ibidi GmbH</i> , Martinsried
Klebefolie (BCA)	Adhäs. PCR Folie, stark klebend, RNase-/DNase-frei	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Klebefolie (qRT-PCR)	Adhäs. PCR Folie, stark klebend, RNase-/DNase-frei	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Objektträger	Super Frost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Petrischalen (groß)	Ø 92 x 16 mm, ohne Nocken	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Herstellerbezeichnung/ weitere Produktangaben</b>	<b>Hersteller</b>
Petrischalen (klein)	PS, Ø 35 x 10 mm, mit Nocken, steril	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Petrischalen (mittel)	Ø 55 x 14,2 mm, ohne Nocken, transparent, steril	nerbe plus GmbH, Winsen
Pipetten (serologisch)	Corning® Costar® Stripette® 5/10/25 ml	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Pipettenspitzen ohne Filter (0,1 - 20 µl bzw. 10 - 100 µl bzw. 20 - 200 µl bzw. 100 - 1 000 µl)	PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen ohne Filter (30 - 300 µl)	epT.I.P.S. Standard 30 - 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter (0,1 - 20 µl bzw. 10 - 100 µl bzw. 20 - 200 µl)	Biosphere® Filter Tips	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (100 - 1 250 µl)	pipette tips premium surface	nerbe plus GmbH, Winsen
Pipettierhilfe	Hirschmann® pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
	accu-jet®	VWR International GmbH, Darmstadt
Reaktionsgefäß 0,5/1,5/2 ml	PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 15/50 ml	PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß RNAse/DNAse-frei, 0,5/1,5 ml	Safelock-Cap Reaktionsgefäß, PP	nerbe plus GmbH, Winsen
Reservoir	Reagenzreservoir, PS, 50 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Schraubdeckelröhrchen	Mikroröhre PCR-PT, 2 ml, DNA- /RNAse-/DNAse-frei	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Spülmittel	NUK® Spülmittel	MAPA GmbH, Zeven
Sterilfilter	Steritop® Receiver Flask, 45 mm neck size, Millipore Express ® PLUS, 0,22 µm, PES, 250 ml	Merck KGaA, Darmstadt
Zigaretten	University of Kentucky Reference Cigarette 3R4F	Kentucky Tobacco Research & Development Center, Lexington, KY, USA

### 2.1.5 Wiederverwendbare Materialien

Tab. 2.5: Wiederverwendbare Materialien, die im Zuge der Arbeit Anwendung fanden.

Bezeichnung	Anmerkung	Hersteller
Fliegenpistole		Gunther Tietsch, Kisker Biotech GmbH & Co. KG
FlyPad		Gunther Tietsch, Kisker Biotech GmbH & Co. KG
Mikropinzetten	Dumont-Pinzette Biologie No. 5	Jürgen Schmidl bioform, Nürnberg
Milbenstopfen klein (Ø 29 mm) bzw. mittel (Ø 36 mm) bzw. groß (Ø 45 mm)	Milbenstopfen MiPf	K-TK e. K., Retzstadt
Multikanalpipette 30 - 300 µl	Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multikanalpipette 20 - 200 µl	Transferpette® S-8	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette 20 - 200 µl (für Eiablage)	Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (alle weiteren Anwendungen)	Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Stahlnetz	Edelstahlgewebe V4A, 1.4401 Maschenweite 250 µm, Drahtstärke 100 µm	Pappert Direkt Vertrieb, Steinau

Eiablagekäfige und Rauchkäfige wurden nach Verwendung mindestens 24 h in Wasser (H<sub>2</sub>O) mit geruchsfreiem Spülmittel eingelegt. Rauchkäfige wurden nach zehn Zigarettenrauchexpositionen ausgetauscht. Milbenstopfen wurden von Fliegenexkrementen befreit und nach Tab. 2.6 autoklaviert. Die Mikropinzetten wurden mit 70 % Ethanol (EtOH) desinfiziert.

Tab. 2.6: Programm zum Autoklavieren von Milbenstopfen.

Sterilisationstemperatur	Sterilisationsdauer	Endtemperatur
121 °C	20 min	120 °C

## 2.1.6 Geräte

Tab. 2.7: Während der Arbeit genutzte Geräte.

Gerät	Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav (Fliegenstandardmedium)	Systemc DX-150	Schlumbohm Medizin-Labor- Technologie GmbH, Hamburg
Autoklav (Grapefruit- und Glucose-Agar-Medium)	Labstm 2150	Systemc GmbH, Bergheim-Glesse
Bioanalyser	Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies Inc., Waldbronn
Brutschrank	Lovibond Thermostatschrank ET 619-4 (140 L)	Tintometer GmbH, Dortmund
Fluoreszenzmikroskop	Olympus SZX16	Olympus Corporation, Tokyo, J
Fluoreszenzmikroskop GFP-Filter	SZX2-FGFA	Olympus Corporation, Tokyo, J
Fluoreszenzmikroskop Kamera	DP72	Olympus Corporation, Tokyo, J
Fluoreszenzmikroskop Objektiv	SDF Plapo 1XPF SDF Plapo 2XPFC	Olympus Corporation, Tokyo, J
Fluoreszenzmikroskop UV-Filter	SZX2-FUV	Olympus Corporation, Tokyo, J
Homogenisator	Kimble™ Kontes™ Pellet Pestle™ and Cordless Motor	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Millipore-Anlage	arium® pro VF	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan Sunrise	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
Nanophotometer (RNA-Sequenzierungsproben)	P330	Implen GmbH, München
Nanophotometer (verbleibende Proben)	DeNovix® DS-11+	DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA
Partikelkonzentrations- messgerät	MicroDust Pro™	Casella, Buffalo, NY, USA

<b>Gerät</b>	<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Rauchmaschine	Scireq® <i>InExpose</i> ™	SCIREQ Inc., Montreal, CA, USA
<i>real-time</i> PCR Instrument	Light-Cycler 480 II	F. Hoffmann-La Roche AG, Mannheim
Thermoblock (0,5 ml Reaktionsgefäß)	Biometra TS1 ThermoShaker	Analytik Jena, Jena
Thermoblock (1,5 ml Reaktionsgefäß)	Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
TissueLyzer	TissueLyzer LT	Qiagen N. V., Venlo, NL
Schüttler	KM-2	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen
Sterilwerkbank (Fliegenstandardmedium)	HA 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Sterilwerkbank (Glucose- und Grapefruit-Agar-Medium)	ScanLaf Mars Safety Class 2	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal
Stereomikroskop	Leica M80	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Ultraschallbad	Bransonic 12	Branson Ultrasonics, Dansbury, CT, USA
UV-Lampe	X-Cite® Series 120	EXFO Photonic Solutions Inc., Mississauga, CA
Waage	Typ 1507, B, MP8-1 BP-61	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen
Zentrifuge (Reaktionsgefäß)	Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge (96- <i>well</i> -Mikrotiterplatte, qRT-PCR)	Heraeus Instruments Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

## 2.1.7 Verwendete Programme

Tab. 2.8: Genutzte Software.

Programm	Version	Hersteller oder Referenz
Agilent Bioanalyzer 2100 Expert	2.6	Agilent Technologies, Inc., Waldbronn
DAVID	6.8	<sup>102</sup> <sup>103</sup>
flexiWare	6.1	SCIREQ Inc., Montreal, CA, USA
GraphPad Prism 6	6.01	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image J	1.52a	<sup>104</sup>
LightCycler <sup>®</sup> 480 Software release 1.5.0 SP3	1.5.0.39	F. Hoffmann-La Roche AG, Mannheim
Magellan <sup>™</sup>	7.0	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
MS PowerPoint	2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
MS Word	2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
Olympus cellSens Standard	1.16	Olympus Corporation, Tokyo, J
R	3.4.3	<sup>100</sup>
R Studio	1.1.383	<sup>101</sup>

## 2.2 Puffer, Lösungen und weitere Arbeitsagenzien

Sämtliche in diesem Kapitel erwähnten Puffer, Lösungen und Arbeitsreagenzien wurden mit Aqua braun angesetzt und bei 4 °C gelagert.

### 0,1 M Natriumphosphat (pH = 7,2)

180 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (sterilfiltriert)

70 ml 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (sterilfiltriert)

250 ml H<sub>2</sub>O

Der pH-Wert wurde durch Zusammengeben der angegebenen Volumina der 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O- und der 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung erhalten. Der Puffer wurde im Anschluss sterilfiltriert.



**20 % PFA (pH = 7,0)**

200 mg PFA/ml H<sub>2</sub>O

NaOH (maximal 1 ml pro 100 mL H<sub>2</sub>O)

Zur Lösung von PFA wurde 1 ml NaOH pro 100 ml angesetztem Puffer zugefügt. Die Lösung wurde unter Rühren auf 60 °C erhitzt, bis eine klare Lösung entstanden ist.

**Antikörperlösung**

0,1 M Natriumphosphat (pH = 7,2)

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

5 % NGS, Hitze-inaktiviert (30 min, 56 °C)

**Blockierungspuffer**

3 % BSA in Waschpuffer

**DAPI-Dihydrochlorid-Stammlösung**

2,5 mg/ml 1x PBS

**ELISA-Homogenisierungspuffer (pH = 7,4) (nach GREEN *et al.*<sup>105</sup>)**

20 mM TRIS

500 mM NaCl

0,05 % (v/v) Tween 20

0,2 % (v/v) Triton X-100

Der pH-Wert wurde mit NaOH und HCl eingestellt und mittels des in Tab. 2.9 angegebenen Programms autoklaviert.

**Hefepaste**

1,5 g Trockenbackhefe wurden mit 3,0 ml Aqua braun zu einer homogenen Paste verrührt.

**Waschpuffer**

0,1 M Natriumphosphat (pH = 7,2)

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

Tab. 2.9: Sterilisationsprogramm.

Sterilisations- temperatur	Sterilisationsdauer	Druck	Endtemperatur
121 °C	15 min	2 bar	≤ 80 °C

**2.3 Fliegenhaltung****2.3.1 Fliegenmedien****2.3.1.1 Fliegenstandardmedium**

Für die Herstellung des Fliegenstandardmediums wurden 45 g Zuckerrohrmelasse und 45 g Zuckerrübenmelasse in 300 ml Leitungswasser mit einer Temperatur von etwa 30 °C gelöst und zu weiteren 1200 ml Leitungswasser mit derselben Temperatur zugegeben. Diese Lösung wurde unter Rühren auf 40 °C erwärmt. Bei Erreichen der Temperatur wurde ein Gemenge bestehend aus 30 g D-(+)-Glukose, 16,5 g Agar, 93,75 g Maismehl und 93,75 g Bierhefe unter Rühren langsam, unter Vermeidung von Aggregation, hinzugegeben. Die Suspension wurde für 30 min bei 40 °C weiter gerührt. Anschließend wurde diese nach dem in Tab. 2.10 angegebenen Programm autoklaviert.

Tab. 2.10: Programm zum Autoklavieren von Fliegenstandardmedium.

Sterilisations- temperatur	Sterilisationsdauer	Druck	Endtemperatur
105 °C	10 min	2 bar	≤ 90 °C

Nach dem Autoklaviervorgang wurde die Suspension unter Rühren auf 60 - 65 °C abgekühlt. Anschließend wurden 45 ml sterilfiltriertes Methylparaben (10 %ig, in 70 % EtOH) und 15 ml Propionsäure (10 %ig, in Aqua braun) als Konservierungsmittel hinzugefügt und das Medium konnte unter sterilen Bedingungen in die vorgesehenen Kulturröhrchen oder Petrischalen gegossen werden. Nachdem das Medium abgekühlt war und sich verfestigt hatte, wurden die Röhrchen bzw. die Petrischalen mit Milbenstopfen verschlossen bzw. mit dem korrespondierenden Deckel versehen. Bis zum Verdampfen des Kondensationswassers wurden die Röhrchen bei RT gelagert. Die Lagerung bis zum Gebrauch erfolgte bei 4 °C.

#### **2.3.1.2 Nikotin-Medium**

Zur Herstellung von Nikotin-Medium wurde bereits autoklaviertes, noch flüssiges und mit Konservierungsmittel versetztes Fliegenstandardmedium (Herstellung s. Kapitel 2.3.1.1) in kleine Petrischalen transferiert. Es wurde die entsprechende Menge (-)-Nikotin hinzugegeben und verrührt, sodass Konzentrationen von 5/20/50 mM erhalten wurden (finales Mediumvolumen: 4,0 ml). Nach Aushärtung des Mediums wurde dieses dunkel bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

#### **2.3.1.3 Grapefruit-Agar-Medium**

Zur Herstellung von Grapefruit-Agar-Medium wurde 15 g Agar in 350 ml Leitungswasser gegeben und für etwa 5 min bei RT gerührt. Die Suspension wurde anschließend unter Verwendung des in Tab. 2.9 beschriebenen Programms autoklaviert.

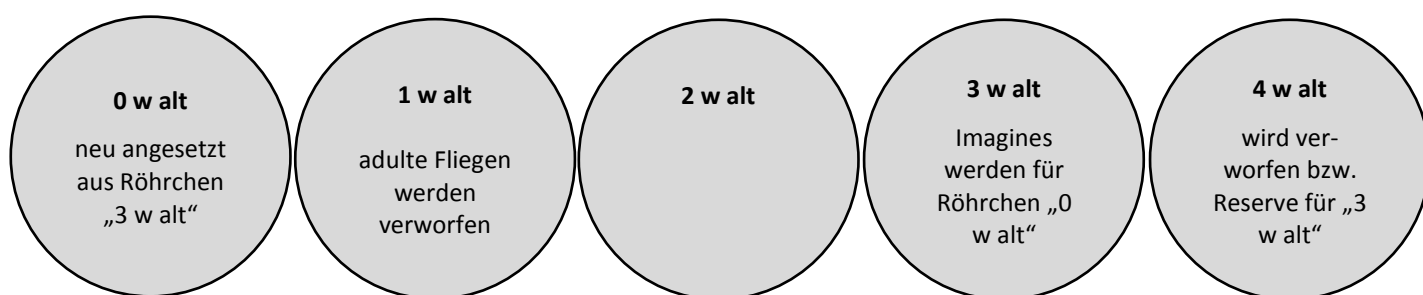
Der autoklavierten, etwas abgekühlten Lösung wurden 5 mL Methylparaben (10 %ig, in 70 % EtOH) und 150 ml Grapefruitsaft hinzugefügt. Die Lösung wurde unter einer Sterilwerkbank in große Petrischalen überführt. Nach Aushärtung des Mediums wurden die Schalen mittels Parafilm versiegelt und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

#### **2.3.1.4 Glucose-Agar-Medium**

Zur Herstellung des Glucose-Agar-Mediums wurde 5 g D-(+)-Glukose und 1 g Agar in 94 ml Leitungswasser gegeben und für etwa 5 min bei RT gerührt. Die Suspension wurde anschließend unter Verwendung des in Tab. 2.9 beschriebenen Programms autoklaviert. Nach kurzem Abkühlen wurde die Lösung unter einer Sterilwerkbank in große Petrischalen gegossen. Nach Aushärtung des Mediums wurden die Schalen mittels Parafilm versiegelt und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

### 2.3.2 Fliegenstockhaltung

Die Haltung von Fliegenstocks erfolgte bei 21 °C und einem 12 h/12 h Tag-Nacht-Rhythmus auf Fliegenstandardmedium. Die Fliegen wurden entweder in kleinen oder in großen *Drosophila*-Kulturgefäßen mit maximal 30 bzw. 60 Tieren pro Röhrchen gehalten. Eine Umsetzung erfolgte wöchentlich unter kurzer Sedierung mittels Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) nach dem in Abb. 2.1 gezeigten Schema. Dabei wurde ein neues Röhrchen („0 Wochen (w) alt“) mit Fliegen aus dem Röhrchen „3 w alt“ angesetzt. Fliegen aus dem Röhrchen „1 w alt“ wurden verworfen. Das *Drosophila*-Gefäß „4 w alt“ wurde verworfen oder diente, beispielsweise bei sich schlecht vermehrenden Stämmen, als Reserve für das Röhrchen „3 w alt“.



**Abb. 2.1:** Umsetzungsschema für die Stammerhaltung von *Drosophila*. Eine Umsetzung von *Drosophila*-Stämmen erfolgte wöchentlich.

### 3.3.3 Taufiegenstämme

**Tab. 2.11:** Verwendete Taufiegenstämme.

Stammbezeichnung	Genotyp	Bezug
Canton-S	Wildtyp	Thomas Roeder, Institut für Molekulare Physiologie, Universität zu Kiel
<i>hsp70</i> -GFP	$\gamma^1 ac^1 w^* P^{106}2MI4/TM3, Sb^1$	John Tower Department of Biological Sciences, University of Southern California, CA, USA

## 2.4 Rauchexpositionsmaschine

### 2.4.1 Zigarettenaufbewahrung

Tabakreferenzzigaretten 3R4F wurden verschweißt bei 4 °C aufbewahrt. Vor Verwendung wurden diese mindestens 24 h zuvor auf RT äquilibriert und bei etwa 50 % relativer Luftfeuchtigkeit präkonditioniert (ISO 3402:1999).

### 2.4.2 Nutzung der Rauchexpositionsmaschine

Für die Zigarettenrauchexposition wurde das *InExpose*<sup>TM</sup>-Rauchmaschinensystem der Firma SCIREQ<sup>®</sup> verwendet. Dieses besteht aus einem Rauchroboter, der den Raucher imitiert, mit integriertem Zigarettenkarussell, welches eine Aufnahmekapazität von maximal 24 Zigaretten hat. Außerdem gehören drei Pumpen, eine runde Rauchexpositions-kammer und eine runde Luftkammer, je mit einem Kammervolumen von 10 l, zum Aufbau (s. Abb. 2.2). Pro Zigarette wurden neun Züge getätigt, wobei jeder einem Standard-Zug nach ISO-Norm 3308 entsprach (35 ml Rauch/min über eine Dauer von 2 s). Es können verschiedene Konzentrationen am System eingestellt werden, wobei zwei Züge/min einem Verbrauch von zwölf Zigaretten/56 min entsprechen (simultanes Abrauchen von zwei Zigaretten). Drei Züge/min entspricht einem Verbrauch von 18 Zigaretten/56 min (simultanes Abrauchen von drei Zigaretten). Vier Züge/56 min (simultanes Abrauchen von vier Zigaretten) stellen einen Verbrauch von 24 Zigaretten/56 min dar.

Pumpe 1 saugt mit 1,5 l/min Zigarettenhauptstromrauch an. Der Rauch wird mit Umgebungsluft homogenisiert und in die korrespondierende Kammer gepumpt. In die Luftkammer wird ausschließlich Umgebungsluft mit der gleichen Flussrate durch Pumpe 3 transportiert. Pumpe 2 befördert Luft bzw. Rauch mit 2 l/min wieder aus den Kammern hinaus.



**Abb. 2.2:** *InExpose*-Rauchmaschine der Firma SCIREQ<sup>®</sup>. Links befindet sich das Zigarettenkarussell, rechts eine Expositions-kammer. Erhöht in der Mitte ist ein *nose-only-tower* zu finden, der bei Versuchen mit *Mus musculus* Anwendung findet, jedoch im Fall von Versuchen mit *Drosophila* durch eine weitere Expositions-kammer ersetzt wird.<sup>107</sup>

Die Inbetriebnahme, Kontrolle und Überwachung sämtlicher Vorgänge an der Maschine erfolgte durch die vom Hersteller bereitgestellte Software flexiWare. Die Partikelkonzentrationsüberwachung wurde mittels des Partikelkonzentrationsmessgerätes MicroDust Pro™ durchgeführt. Dokumentierte Parameter während eines Rauchversuchs mit Wildtyp-Larven sind exemplarisch in Tab. 2.12 zusammengefasst.

**Tab. 2.12: Exemplarische Zigarettenrauchparameter für einen einstündigen Lauf mit vier Zügen/min.**

	Luft	Zigarettenrauch
<i>BiasFlow Volume In</i> / (l/min)	0	1,5
<i>BiasFlow Volume Out</i> / (l/min)	2	2
Zugdauer / s	-	2,5
Konzentration / (Züge/min)	-	4
Gesamtmenge an Zigaretten	-	24
Dauer des Laufes / min	60	60
Tiere je Exposition	65 männliche Larven 65 weibliche Larven	65 männliche Larven 65 weibliche Larven
Microdust Mittelwert / (mg/m <sup>3</sup> )	-	8,05
Microdust Maximalwert / (g/m <sup>3</sup> )	-	9,64
Filtermasse vorher / g	-	2,88245
Filtermasse nachher / g	-	2,98475
<i>Mass Density</i> Maximalwert / (g/m <sup>3</sup> )		0,25397
<i>Mass Density</i> Minimalwert / (g/m <sup>3</sup> )		- 0,0086116
<i>Mass Density</i> Varianz / (g/m <sup>3</sup> )		0,26258

## 2.5 Grundlegende Maßnahmen zur Vorbereitung von *Drosophila*-Larven und -Imagines für weitere Versuche

### 2.5.1 Synchronisierte Eiablage

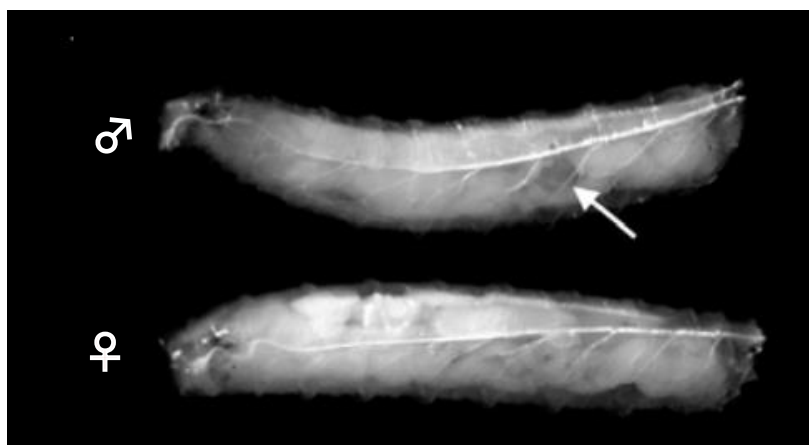
Für eine Eiablage wurden 0 - 6 d alte Wildtyp-Taufliegen (Canton-S) bzw. 0 - 5 d alte *hsp70*-GFP-Taufliegen aus dem Stock unter CO<sub>2</sub>-Sedierung nach Geschlechtern selektiert. Pro Geschlecht wurden 50 Tiere in ein mittleres *Drosophila*-Kulturgefäß mit wenig Fliegenstandardmedium bzw. 100 Tiere in einen großen Kulturbehälter mit wenig Fliegenstandardmedium (jeweilige Füllhöhe im Röhrchen: etwa 1 cm) überführt. Insgesamt wurden 500 Weibchen und 500 Männchen gesammelt. Für 2 d wurden die Taufliegen in diesen Röhrchen bei 21 °C gehalten. Die 500 Paare wurden unter Betäubung mit CO<sub>2</sub> in einen Eiablagekäfig mit Grapefruit-Agar als Nährmedium transferiert. In der Mitte des Nährbodens wurde etwas Hefepaste innerhalb eines Durchmessers von etwa 2 cm umfassender Größe aufgetragen. Die Taufliegen wurden ab diesem Zeitpunkt stets bei einer Temperatur von 25 °C gehalten. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gegen eine neue, mit Hefepaste (Ø 2 cm) bestrichene Grapefruit-Agar-Platte unter Betäubung der Taufliegen mit CO<sub>2</sub> ausgetauscht. Am darauffolgenden Tag wurde die vorige Eiablage verworfen und die finale Eiablage mit 4 - 10 d (Canton-S) bzw. 4 - 9 d (*hsp70*-GFP) alten Imagines durchgeführt. Dafür wurde abermals morgens (zwischen 08:00 - 09:00 h) nach Betäubung der Taufliegen mit CO<sub>2</sub> die Grapefruit-Agar-Platte gegen eine neue ausgetauscht, die wiederum mit Hefepaste (Ø 2 cm) versehen war. Nach 5 min der Akklimatisierung wurde der Eiablagekäfig horizontal in den Brutschrank gestellt und die Eiablage erfolgte für 2 h bei Canton-S-Larven und 4 h je bei *hsp70*-GFP-Larven, bei Taufliegen im Imaginalstadium und bei den für die zweifache Zigarettenrauchexposition angedachten Larven. Auf diese Art ließ sich das Alter der im Experiment verwendeten Tiere eingrenzen. So konnte gewährleistet werden, dass sich die Tiere zum Zeitpunkt der Berauchung nicht in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befanden. Nach Ablauf der Zeit wurde die Agarplatte entfernt und 2 ml 1x Phosphat-gepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) wurden darauf pipettiert. Die Eier wurden vorsichtig mit Hilfe eines Wattestäbchens von der Oberfläche gelöst. Die Eier wurden zusammen mit PBS in ein autoklaviertes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Absinken der Eier konnte der Überstand abgenommen werden. Dieses Vorgehen wurde so lange mit 1 ml 1x PBS wiederholt, bis sämtliche Eier in das Reaktionsgefäß überführt worden waren. Anschließend wurden die Eier im Gefäß so lange mit etwa 2 ml 1x PBS gewaschen, bis der Überstand klar war (etwa fünfmaliges Waschen). Beim letzten Entfernen des Überstandes wurden etwa 250 µl PBS zurückbehalten. Um eine vergleichbare Anzahl an Eiern in kleine Röhrchen mit Fliegenstandardmedium überführen zu können, wurde zunächst eine 20 - 200 µl Pipettenspitze an

der 50 µl-Markierung abgeschnitten. Dies verhinderte ein Verstopfen der Spitze bei Aufnahme der Eier. Mit der 20 - 200 µl-Pipette, die auf 20 µl eingestellt war, wurde die Spitze tief in das Eipellet getaucht, der Kolben der Pipette heruntergedrückt und dann schnell losgelassen.<sup>108</sup> So wurden die Eier in die Pipettenspitze gesaugt, ohne dass viel Flüssigkeit mit in die Spitze geriet. Auf diese Weise befanden sich etwa 200 - 300 Eier in der Pipettenspitze. Die Eier wurden in ein kleines Röhrchen mit Fliegenstandardmedium überführt. Das Vorgehen wurde wiederholt, bisweilen sämtliche Eier in kleine Röhrchen transferiert worden waren. Dabei wurden mit der Pipette aufgezogenen Eier jeweils in ein separates Röhrchen überführt.

### 2.5.2 Geschlechtsselektion von *Drosophila*-Larven

4 d nach der synchronisierten Eiablage wurden Wildtyp-Larven nach Geschlechtern sortiert. Hierfür wurden etwa 40 Larven mit homogener Größe aus den Röhrchen mit einem Spatel entnommen und vorsichtig auf Zellulosepapier ausgestrichen. Anschließend wurden Larven entnommen und gewaschen (zweimal in 1x PBS) und wurden in ein Blockschälchen aus Glas mit 150 µl 1x PBS überführt. Dorsal gesehen konnten Männchen anhand des deutlich sichtbaren, parallel zueinander angeordneten Gonadenpaares im fünften Abdominalsegment identifiziert werden. Weibliche Larven besitzen sehr kleine, kaum sichtbare Gonaden und wurden daher anhand der „Abwesenheit“ ihrer Gonaden bestimmt (s. Abb. 2.3). Die geschlechterselektierten Larven wurden je in ein kleines Röhrchen mit Fliegenstandardmedium überführt. Pro Röhrchen wurden etwa 150 Larven gesammelt. *hsp70*-GFP-Larven wurden etwa 24 h nach Exposition nach Geschlechtern selektiert.

Bei Versuchen mit adulten Taufliegen wurde auf eine Geschlechtertrennung im Larvenstadium verzichtet.

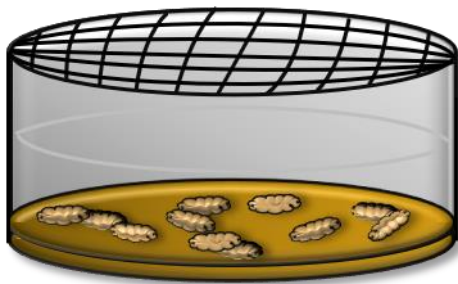


**Abb. 2.3: Männliche und weibliche Larven.** Während bei Männchen die Gonaden deutlich im Durchlicht zu erkennen sind (Pfeil, oben), sind diese bei den Weibchen kaum sichtbar (unten) (modifiziert nach CALLEJO *et al.*<sup>109</sup>).



### 2.5.3 Präparation von Larven für die Zigarettenrauchexposition

5 d nach der synchronisierten Eiablage wurden Larven im dritten Larvenstadium (L3) mindestens 3 h vor Expositionsbeginn in die Rauchkäfige überführt. Ein Rauchkäfig bestand aus einer kleinen Petrischale, an der ein Kunststoffzylinder (Höhe: etwa 0,9 cm) mit Parafilm befestigt wurde, der wiederum aus einem mittleren Kulturröhrchen erhalten wurde. Der Zylinder wurde mit einem Stahlnetz (Maschenweite: 250  $\mu\text{m}$ ) abgeschlossen (s. Abb. 2.4 - links). Der Boden der Petrischale wurde marginal mit etwas Fliegenstandardmedium benetzt (s. Abb. 2.4 - rechts). Dem Medium wurde 400  $\mu\text{l}$  Aqua braun zugefügt und mit einem Spatel homogenisiert. Anschließend wurden 65 Larven in die Petrischale transferiert, welche dann mit dem Kunststoffzylinder und dem daran befindlichen Netz verschlossen wurde. Etwa 30 - 60 min vor der Zigarettenrauchexposition wurden den Tieren abermals mit 100 - 200  $\mu\text{l}$  Aqua braun versetzt, um eine Austrocknung der Larven während der Exposition zu verhindern. Überschüssiges Medium wurde sofern nötig entfernt.



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung eines Rauchkäfigs für die Exposition von *Drosophila*-Larven mit Zigarettenrauch (links) und Ansicht von oben auf einen geöffneten Rauchkäfig (rechts). Links: In einer kleinen Petrischale, deren Boden marginal mit Fliegenstandardmedium bedeckt war, wurden Larven positioniert. Die Petrischale wurde mit einem Zylinder erhalten aus einem mittleren *Drosophila*-Kulturröhrchen erhöht. Die Konstruktion wurde mittels eines Stahlnetzes verschlossen. Rechts: Dargestellt ist ein geöffneter Rauchkäfig von oben, bei dem die verwendete Mediummenge zu erkennen ist.

### 2.5.4 Präparation von Imagines für die Zigarettenrauchexposition

Die aus einer synchronisierten Eiablage (s. Kapitel 2.5.1, Eiablagedauer: 4 h) hervorgehenden, adulten Taufiegen wurden am Tag des Schlüpfens (Tag 11 nach Eiablage) jungfräulich abgesammelt. Die Tiere wurden in ein kleines bzw. großes Kulturröhrchen mit wenig Fliegenstandardmedium (Füllhöhe im Röhrchen: etwa 1 cm) überführt. Das Medium wurde nach 2 - 3 d unter möglichst kurzer  $\text{CO}_2$ -Betäubung der Taufiegen gewechselt. 5 d nach dem Schlüpfen wurden die Imagines mindestens 3 h vor der Zigarettenrauchexposition maximal 5 min mittels  $\text{CO}_2$  betäubt und in die Rauchkäfige

überführt, wobei in jeden Käfig 15 Taufliegen (bei Probennahme für die Untersuchung der Genexpression) oder 50 - 65 Tiere (bei der Untersuchung der negativen Geotaxis und der Überlebensrate) überführt wurden. Der Aufbau des Rauchkäfigs war analog zu dem in dem Kapitel 2.5.3 beschriebenen. Der Kunststoffzylinder war jedoch höher (etwa 1,5 cm) und die verwendete Mediummenge wurde verändert (halbgefüllt mit Fliegenstandardmedium für die Untersuchung der Genexpression und der Überlebensrate bzw. randhoch gefüllt für die Untersuchung der negativen Geotaxis).

## **2.6 Zigarettenrauchexposition von *Drosophila*-Larven und -Imagines**

### **2.6.1 Wildtyp-Larven**

Nach Geschlechtern selektierte (Kapitel 2.5.2), 5 d alte L3-Larven, die aus einer synchronisierten Eiablage stammten, wurden für eine Dauer von 56 min mit einer Konzentration von vier Zügen/min Zigarettenrauch exponiert (Gesamtmenge an Zigaretten: 24 Stück). Die Kontrolltiere wurden Luft ausgesetzt. Die Berauchung folgte stets um die Mittagszeit. Die Käfiganzahl innerhalb einer Kammer wurde pro Versuchsreihe nach Möglichkeit konstant gehalten.

### **2.6.2 *hsp70*-GFP-Larven**

Nicht nach Geschlechtern selektierte, 5 d alte L3-Larven des transgenen Reporterstamms *hsp70*-GFP wurden für 56 min mit vier Zügen/min Zigarettenrauch exponiert (Gesamtmenge an Zigaretten: 24 Stück). Die Kontrolltiere wurden Luft ausgesetzt. Die Berauchung erfolgte stets um die Mittagszeit. Die Käfiganzahl innerhalb einer Kammer wurde pro Versuchsreihe immerzu konstant gehalten.

### **2.6.3 Imagines**

Nach Geschlechtern selektierte, 5 d alte jungfräuliche, adulte Taufliegen wurden 56 min lang einer Konzentration von zwei Zügen/min Zigarettenrauch exponiert (Gesamtmenge an Zigaretten: zwölf Stück). Die Kontrolltiere wurden Luft ausgesetzt. Die Berauchung folgte stets um die Mittagszeit. Die Käfiganzahl innerhalb einer Kammer wurde pro Versuchsreihe möglichst konstant gehalten.

#### **2.6.4 Zweifache Zigarettenrauchexposition von *Drosophila***

Die Vorbereitung und Exposition von *Drosophila*-L3-Larven des Stamms Canton-S wurde analog zu dem in Kapitel 2.6.1 erläuterten Verfahren durchgeführt. Jedoch wurde die Expositionslänge auf 112 min erhöht (Gesamtmenge an Zigaretten: 48 Stück). Lebende Larven wurden nach der Zigarettenrauchexposition zweimal in 1x PBS gewaschen und in eine Petrischale randvoll gefüllt mit Fliegenstandardmedium überführt. Auf die Petrischale wurde ein zu beiden Seiten offenes, mittleres *Drosophila*-Kulturröhrchen mittels Parafilm befestigt und mit einem Milbenstopfen verschlossen. Das Medium wurde nach 2 d gewechselt und noch nicht verpuppte Tiere sowie melanisierte Larven wurden entfernt und von dem jeweiligen Versuchsansatz ausgeschlossen. Die geschlüpften Taufliegen wurden 5 - 6 d nach der Zigarettenrauchexposition jungfräulich abgesammelt und nach Geschlechtern selektiert gehalten. Nach Geschlechtern falsch sortierte sowie später geschlüpfte Tiere wurden aus dem Versuch exkludiert. Nach 2 - 3 d wurden die adulten Taufliegen kurz mittels CO<sub>2</sub> sediert und in neue Kulturröhrchen mit Fliegenstandardmedium überführt.

5 d nach dem Schlüpfen der letzten in die Wertung eingeschlossenen Taufliegen erfolgte eine erneute Zigarettenrauchexposition. Vorbereitend dazu wurden mindestens 3 h vor der Exposition die Taufliegen maximal 5 min mittels CO<sub>2</sub> betäubt und in die Rauchkäfige transferiert, wobei in jeden Käfig 42 - 64 Taufliegen überführt wurden. Der Aufbau des Rauchkäfigs war analog zu dem in Kapitel 2.5.4 beschriebenen.

Der Rauchversuch erfolgte stets um die Mittagszeit, wobei die Imagines 56 min lang einer Konzentration von drei Zügen/min Zigarettenrauch exponiert wurden (Gesamtmenge an Zigaretten: 18 Stück). Die Kontrolltiere wurden Luft ausgesetzt. Die Käfiganzahl innerhalb einer Kammer wurde pro Versuchsreihe immerzu konstant gehalten.

#### **2.7 Nikotinverfütterung an *Drosophila*-Wildtyp-Larven**

Für die Nikotinverfütterung wurde Medium mit einer Nikotinkonzentration von 0, 5, 20 und 50 mM verwendet (s. Kapitel 2.3.1.2). Geschlechtsselektierte L3-Larven (s. Kapitel 2.5.2) wurden 5 d nach einer synchronisierten Eiablage für 1 h auf das Nikotinmedium mit den jeweilig genannten Konzentrationen überführt.

## 2.8 Probenpräparation zur anschließenden Isolation von RNA

### 2.8.1 Ganze Wildtyp-Larven

Zur Isolierung von Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) wurden 0, 30, 60 und 120 min nach der Zigarettenrauchexposition (Kapitel 2.6.1) bzw. direkt nach Exposition mit Nikotin (Kapitel 2.7) pro Ansatz zehn Larven entnommen und gewaschen (1x PBS, 70 % EtOH, 1x PBS). Die Larven wurden in ein RNase-/DNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl RA1-Puffer aus dem Macherey-Nagel Nucleo Spin® RNA-Kit überführt und auf Eis für etwa 1 min homogenisiert. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

Nach der ersten Probennahme (bei Zigarettenrauchexpositionsexperimenten) wurden die Larven kurz in 1x PBS gewaschen und auf frisches Fliegenstandardmedium transferiert.

### 2.8.2 Ganze Tracheen aus Wildtyp-Larven

Die Tracheen wurden innerhalb eines Zeitfensters von 1,5 h nach der Exposition mit Zigarettenrauch präpariert. Dafür wurden maximal fünf Larven gleichzeitig gewaschen (1x PBS, 70 % EtOH, 1x PBS) und in ein Blockschälchen aus Glas mit 150 µl 1x PBS überführt. Mit Hilfe von Mikropinzetten wurde der Kopf entfernt und die beiden Tracheenstränge einer Larve aus dem Larvenkörper herauspräpariert. Adhärierende Organe und Gewebereste wurden sorgfältig unter Vermeidung der Verletzung dieser entfernt, in ein RNase-/DNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl RA1-Puffer aus dem Macherey-Nagel Nucleo Spin® RNA-Kit überführt und auf Eis gelagert. Nach Isolierung von 25 - 30 Tracheenpaaren wurde ein neues Reaktionsgefäß verwendet. Blockschälchen und Pinzetten wurden spätestens nach fünf präparierten Larven mit 70 % EtOH desinfiziert. Auf diese Weise konnten innerhalb des angegebenen Zeitfensters 21 - 69 Tracheenpaare isoliert werden. Zusätzlich wurde verbleibendes Gewebe von zehn Larven in einem RNase-/DNase-freiem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl RA1-Puffer aus dem Macherey-Nagel Nucleo Spin® RNA-Kit gesammelt und auf Eis gelagert. Die Proben wurden etwa 1 min auf Eis homogenisiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

### 2.8.3 Geteilte Tracheen aus Wildtyp-Larven

Die Isolation von halbierten Tracheen erfolgte auf gleiche Weise wie der in Kapitel 2.8.2 für die Isolierung von ganzen Tracheen beschrieben. Für die Teilung wurde das Tracheenpaar zwischen dem vierten und fünften primären Ast durchtrennt, sodass ein anteriorer und ein posteriorer Bereich als Probe genommen werden konnte. Auf die Probennahme verbleibender Larven wurde verzichtet. Je Probe wurden Tracheen isoliert aus 18 - 40 Larven verwendet.

### 2.8.4 Imagines

0, 30, 60 und 120 min nach der Zigarettenrauchexposition wurden pro Ansatz 15 adulte Taufliegen für 10 s mittels CO<sub>2</sub> betäubt, über einen Trichter in ein autoklaviertes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die Köpfe wurden vom übrigen Korpus sezerniert, indem gegen das Reaktionsgefäß geschnippt wurde. Die gefrorenen Taufliegen wurden aus dem Reaktionsgefäß auf eine bei - 20 °C vorgekühlte Glas-Petrischale auf einem Kühlblock überführt. Die Köpfe wurden in ein RNase-/DNase-freies 2 ml-Schraubdeckelröhrchen überführt. Thorax zusammen mit dem Abdomen wurde in ein RNase-/DNase-freiem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl RA1-Puffer aus dem Macherey-Nagel Nucleo Spin® RNA-Kit transferiert. Die Proben, die Thorax und Abdomen enthielten, wurden etwa 1 min auf Eis homogenisiert. Beide Proben wurden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

## 2.9 Probenpräparation zur anschließenden Detektion von Cotinin

0, 1, 2, 3 und 4 h nach der Zigarettenrauchexposition (Kapitel 2.6.1) bzw. direkt nach der Exposition mit Nikotin (Kapitel 2.7) wurden pro Ansatz zehn Larven entnommen und gewaschen (1x PBS, 70 % EtOH, 1x PBS). Die Larven wurden in 100 µl ELISA-Homogenisierungspuffer in einem autoklavierten 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, etwa 1 min auf Eis homogenisiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

Die Proben wurden für die weitere Präparation auf Eis aufgetaut und 15 min im Ultraschallbad behandelt. Zur Entfernung von Chitin- und Kutikularesten wurden die Proben zentrifugiert (Centrifuge 5415R (Eppendorf AG), 13 600 *revolutions per minute* (rpm), 2 min, RT), der Überstand in ein neues 1,5 ml autoklaviertes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

## 2.10 Molekularbiologische Methoden

### 2.10.1 RNA-Isolation

Für die Isolation von *messenger* RNA (mRNA) wurde das Nucleo Spin® RNA-Kit verwendet. Dazu wurden den Proben, die Köpfe adulter Tiere enthielten, 100 µl des RA1-Puffers hinzugefügt. Diesen Proben sowie den bereits mit dem RA1-Puffer versetzten Proben der verbleibenden Fliegenkorpusse

(Thorax und Abdomen) wurden je drei Edelstahlkugeln ( $\varnothing$  5 mm) hinzugefügt. Die Proben wurden im TissueLyzer 1 min bei 25 Hz behandelt. Die Proben, die aus ganzen Larven stammten, sowie jene mit Tracheenmaterial wurden nicht auf diese Weise vorbehandelt.

Allen Proben wurden 250  $\mu$ l RA1-Puffer zugefügt und kurz vermengt. Die Proben wurden zur Entfernung von Chitinresten auf die violette Säule gegeben und zentrifugiert (Centrifuge 5415R (Eppendorf AG), 1 min, 11 000 *relative centrifugal force* (rcf), RT). Der Durchfluss wurde mit 350  $\mu$ l 70 % EtOH (in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aus dem Kit) versetzt, fünfmal hoch- und hinunterpipettiert und zur mRNA-Bindung auf die blaue Säule gegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1 min, 11 000 rcf, RT). Dieser Prozess wurde wiederholt, sofern sich noch Flüssigkeit über der Säule nach dem vorangegangenen Zentrifugationsschritt befand. Die blaue Säule wurde auf ein neues Auffanggefäß überführt. Zur Entsalzung der Membran und späteren Optimierung der rDNase-Aktivität wurden 350  $\mu$ l MDB-Puffer hinzugefügt und zentrifugiert (Centrifuge 5415R (Eppendorf AG), 1 min, 11 000 rcf, RT). Es wurde eine in Tab. 2.13 gezeigte rDNase-Reaktionsmischung angesetzt.

**Tab. 2.13:** rDNase-Reaktionsmischung pro Probe für den DNA-Verdau während der RNA-Isolation.

	rDNase I	rDNase-Puffer
<b>Volumen je Probe</b>	10 $\mu$ l	90 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen je Probe</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>	

95  $\mu$ l der rDNase-Reaktionsmischung wurden je Probe hinzugefügt und die Ansätze wurden inkubiert (15 min, RT). Die rDNase-Aktivierung erfolgte durch die Zugabe von 200  $\mu$ l RAW2-Puffer und anschließender Zentrifugation (1 min, 11 000 rcf, RT). Die blaue Säule wurde mit einem neuen Auffanggefäß versehen und es folgten zwei Waschschrte: Zunächst wurde 600  $\mu$ l RA3-Puffer auf die Säule gegeben, zentrifugiert (Centrifuge 5415R (Eppendorf AG), 1 min, 11 000 rcf, RT) und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 250  $\mu$ l RA3-Puffer auf die Säule geben und erneut zentrifugiert (Centrifuge 5415R (Eppendorf AG), 2 min, 11 000 rcf, RT). Die Säule wurde auf ein 1,5 ml RNase-/DNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Zur Lösung der mRNA von der Säule wurde diese mit 60  $\mu$ l RNase-freiem H<sub>2</sub>O aus dem Kit (bei ganzen Larven) bzw. 40  $\mu$ l RNase-freiem H<sub>2</sub>O aus dem Kit (bei Kalibrator, Larvaltracheen oder Imagines) versetzt. Nach finaler Zentrifugation (Centrifuge 5415R (Eppendorf AG), 1 min, 11 000 rcf, RT) wurde die RNA bei - 80 °C gelagert.

### 2.10.2 DNA-Verdau

RNA, die aus ganzen Larven isoliert worden ist, wurde einem zusätzlichen Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA)-Verdau mittels des TURBO DNA-free™ Kits unterzogen. Dafür wurde eine TURBO DNase-Reaktionslösung angesetzt (Tab. 2.14).

**Tab. 2.14:** TURBO DNase-Reaktionsmischung pro Probe für einen zusätzlichen DNA-Verdau von aus ganzen Larven isolierter RNA.

	TURBO DNase	10x TURBO DNase Puffer
<b>Volumen je Probe</b>	1 µl	6 µl
<b>Gesamtvolumen je Probe</b>	<b>7 µl</b>	

Je Probe wurden 7 µl der TURBO DNase-Reaktionsmischung zugefügt und die Ansätze mit Hilfe eines Thermoblocks inkubiert (30 min, 37 °C). Nach Abkühlen der Proben 2 min auf Eis wurde je Probe 6,7 µl Inaktivierungsreagenz hinzugefügt und inkubiert (5 min, RT). Während dieser Inkubationszeit wurden die Probengefäße regelmäßig kurz angetippt, um das Absinken des Inaktivierungsreagenzes zu vermeiden. Die Proben wurden zentrifugiert (Centrifuge 5415R (Eppendorf AG), 1,5 min, 10 000 rcf, RT). Der Überstand, der die RNA der Proben enthielt, wurden unter Vermeidung der Auflösung des sich gebildeten Pellets in ein neues 1,5 ml RNase-/DNase-freies Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proben wurden bei - 80 °C gelagert.

### 2.10.3 Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration und -Reinheit wurde mittels des Implen Nanophotometers ermittelt. Die Proben, die für die RNA-Sequenzierung angedacht waren, wurden mittels des DeNovix Spectrophotometers untersucht. Dazu wurde 1 µl bzw. 2 µl des in der RNA-Isolation verwendeten RNase-freien H<sub>2</sub>O als Blankowert auf das Probenfenster pipettiert, mit dem im Falle des Implen-Gerätes für die jeweilige Konzentration angemessenen Deckels verschlossen und mittels des in dem Gerät integrierten RNA-Programms gemessen. Bei der Messung der RNA am Implen Nanophotometers von ganzen Larven wurden ein Probendeckel mit dem Faktor 50 verwendet, bei Larvaltracheen und Imagines wurde der Probendeckel mit dem Faktor zehn benutzt.

Das vom Photometer ermittelte Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ ) sollte Werte zwischen 1,8 und 2,0 annehmen. Abweichungen davon deuten auf durch beispielsweise Proteine verunreinigte Proben hin und könnten in der späteren Komplementär-DNA (*complementary*

DNA, cDNA)-Einstrang-Synthese (s. Kapitel 2.10.4) die Effektivität der Reversen Transkriptase beeinflussen. Der  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ -Wert erfährt jedoch auch eine Beeinflussung durch zu geringe RNA-Konzentrationen (etwa  $\leq 50$  ng/ $\mu$ L RNA), wie es bei einigen Proben von isolierten ganzen und halbierten Larvaltracheen sowie Imagines der Fall war. In solchen Fällen sind die Werte des  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ -Verhältnis unzuverlässig, da die Linearbeziehung zwischen der Konzentration und der Absorption nicht mehr gegeben ist.

Das vom Nanophotometer ermittelte Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 230 nm ( $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ ) sollte Werte von 2,0 und größer annehmen. Geringere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Puffern hin. Auch hier sind Abweichungen bei geringen RNA-Konzentrationen zu beobachten und Werte des  $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ -Verhältnis können nicht mehr zuverlässig für die Bestimmung der Reinheit der RNA genutzt werden.

#### 2.10.4 cDNA-Einstrang-Synthese

Für die cDNA-Einstrang-Synthese wurden 500 ng RNA bei ganzen Larven, 250 ng oder 350 ng RNA bei ganzen Larvaltracheen, 50 ng oder 100 ng RNA bei halbierten Larvaltracheen, 150 ng RNA bei Imago-Köpfen sowie 50 ng oder 100 ng RNA bei Thorax und Abdomen von adulten Tieren in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das korrespondierende Volumen RNA unter Kühlung in ein 0,5 ml RNase-/DNase-freies Reaktionsgefäß überführt und mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O aus dem Nucleo Spin® RNA-Kit von Macherey-Nagel versetzt, sodass insgesamt ein Volumen von 11  $\mu$ l erreicht wurde. Anschließend wurde aus dem Oligo-Desoxythymidin (dT)- (Tab. 2.15) und dem Desoxynukleosid-triphosphat (dNTP)-Mix (Tab. 2.16) ein Oligo-dNTP-Mix (Tab. 2.17) angesetzt.

Tab. 2.15. Zusammensetzung des 100  $\mu$ M Oligo-dT-Mix.

Substanz	Konzentration	Oligonukleotidsequenz	Volumen
Oligo-dT <sub>12</sub>	100 $\mu$ M	TTTTTTTTTTTT	30 $\mu$ l
Oligo-dT <sub>15</sub>	100 $\mu$ M	TTTTTTTTTTTTTTT	30 $\mu$ l
Oligo-dT <sub>18</sub>	100 $\mu$ M	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	30 $\mu$ l
<b>gesamt</b>	-	-	<b>90 <math>\mu</math>l</b>



Tab. 2.16: dNTP-Lösung (finale Konzentration: 10 mM pro Base).

Substanz (Konzentration)	Volumen
dATP (100 mM)	10 µl
dCTP (100 mM)	10 µl
dGTP (100 mM)	10 µl
dTTP (100 mM)	10 µl
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	60 µl
<b>gesamt</b>	<b>100 µl</b>

Tab. 2.17: Pro Probe anzusetzender Oligo-dNTP-Mix für die cDNA-Synthese.

	100 µM Oligo-dT	10 mM dNTP
<b>Volumen je Probe</b>	1 µl	1 µl
<b>Gesamtvolumen je Probe</b>	<b>2 µl</b>	

Je Ansatz wurden 2 µl des 100 µM Oligo-dNTP-Mixes hinzugefügt. Die Ansätze wurde präinkubiert (10 min, 65 °C). Anschließend wurden die Proben gekühlt (5 min, auf Eis). Unter Beibehaltung der Kühlung wurden 7 µl des Mastermixes mit Reverser Transkriptase (RT+) bzw. ohne das Enzym (RT-) als Negativkontrolle (für die qRT-PCR) zugefügt (Tab. 2.18).

Tab. 2.18: Pro Probe anzusetzender Mastermix für RT+ - und RT- -Proben bei der cDNA-Einstrang-Synthese.

	RT+	RT-
5x First Strand Buffer	4 µL	4 µL
DTT (100 mM)	1 µL	1 µL
Super Script III (200 U/µL)	1 µL	-
RNaseOUT (40 U/µL)	1 µL	-
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	-	2 µL
<b>Gesamtvolumen je Probe</b>	<b>7 µL</b>	<b>7 µL</b>

Für den Umschrieb und die anschließende Enzymdegradation wurden die Proben in zwei Schritten inkubiert. Danach wurden die Ansätze durch dasselbe Gerät gekühlt, bis die Proben entnommen wurden (Tab. 2.19).

Tab. 2.19: cDNA-Umschreibeprozess durch den Thermocycler.

Inkubationsschritt	Inkubationsdauer	Inkubationstemperatur
1	60 min	50 °C
2	15 min	70 °C
3	bis Entnahme der Proben	10 °C

Nach dem cDNA-Umschrieb wurden die Proben 2 min auf Eis gekühlt. Den aus ganzen Larven und aus ganzen, isolierten Tracheen resultierenden Proben wurden 20 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O zugefügt (1:1-Verdünnung). Alle anderen Proben verblieben unverdünnt. Proben von ganzen Larven wurden bei - 20 °C gelagert, der Kalibrator, Proben von ganzen sowie halbierten Larvaltracheen und Proben von Imagines wurden bei - 80°C verwahrt.

Sämtliches hier verwendetes RNase-freies H<sub>2</sub>O stammte aus dem Macherey-Nagel RNA Nucleo Spin<sup>®</sup> RNA-Kit.

### 2.10.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Für die Untersuchung der Genexpression wurde das Verfahren der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) angewendet. Diese Methode stellt eine Weiterentwicklung der gewöhnlichen PCR dar. Über das konventionelle PCR-Verfahren ist eine Vervielfältigung der cDNA möglich, wodurch die Expression von Genen ebenfalls verstärkt detektiert werden kann. Mittels qRT-PCR ist eine zusätzliche Quantifizierung der Genexpression möglich. Dies wird realisiert, indem nach jedem Amplifikationszyklus ein zunächst inaktiver Fluoreszenzfarbstoff in die gebildeten cDNA-Doppelstränge interkaliert und es so aufgrund von Elektronenübergängen zur Anregung der Fluoreszenz kommt, welche sich proportional zur cDNA-Menge verhält.

Eine Überprüfung der Identität der gebildeten PCR-Produkte erfolgt typischerweise über die Schmelzkurve, die aufgrund der unterschiedlichen Basenzusammensetzung für jedes Gen spezifisch ist. So können beispielsweise Primerdimere von spezifischen qRT-PCR-Produkten voneinander unterschieden werden, da diese sich bereits bei geringeren Temperaturen voneinander separieren.

Für eine Auswertung der Daten mittels relativer Quantifizierung muss eine Normalisierung jeder Probe auf ein konstitutiv exprimiertes Gen, ein sogenanntes Haushaltsgen, erfolgen, welches in seiner Expression keine Regulation durch die experimentelle Behandlung erfährt. Auf diese Weise können Konzentrationsschwankungen der cDNA ausgeglichen werden. Als solches Referenzgen diente bei den in dieser Arbeit präsentierten Daten *ribosomales Protein L32 (rpl32)*. Durch einen Kalibrator, der typischerweise eine unbehandelte Probe enthält, kann die relative Genexpression quantifiziert werden, da hier eine konstante Amplifikation des Zielgens erwartet wird. Dabei wird die Expression des zu analysierenden Gens auf die des Kalibrators bezogen.

Während der Amplifikationsphase wird die cDNA des Zielgens exponentiell vervielfältigt und somit steigt auch die Fluoreszenzintensität auf gleiche Weise an. Dem exponentiellen Anstieg schließt ein Plateau an, bei dem keine Amplifikation mehr stattfindet. Dieses ist mit dem Verbrauch der Oligonukleotide zu begründen. Der Zeitpunkt, bei dem die Fluoreszenzintensität zu Beginn der exponentiellen Phasen signifikant ansteigt, wird auch als *cycle threshold* ( $C_T$ )- oder *crossing point* ( $C_p$ )-Wert bezeichnet (Abb. 2.5). Er wird in der Auswertung verwendet, um durch einen vom Hersteller gegebenen Algorithmus auf die Expressionsstärke zurückzuschließen.

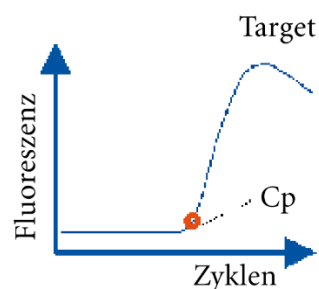


Abb. 2.5: Visuelle Darstellung des  $C_p$ -Wertes im Zuge einer Amplifikation.<sup>110</sup>

### 2.10.5.1 Analyse der Genexpression

Für die Analyse von Proben via qRT-PCR wurden vom Kalibrator, der Wasserprobe und den jeweiligen RT+ -Proben je Triplikate erstellt. Die Proben der RT- wurden einfach analysiert. Dazu wurde die cDNA zunächst langsam auf Eis aufgetaut und je Probe 2  $\mu$ l in die Mikrotiterschächte (*wells*) einer für die qRT-PCR angedachte Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden 8  $\mu$ l des Mastermixes (Tab. 2.20) pro *well* hinzugeben. Die qRT-PCR-Mikrotiterplatte wurde mit einer selbstklebenden Folie versiegelt und zentrifugiert (Heraeus Instruments Megafuge 1.0R (Heraeus), 1 500 rcf, 1 min, RT). Mikrotiterplatten, die nicht sofort durch den LightCycler prozessiert worden sind, wurden unter Lichtausschluss bis zur Verwendung bei 4 °C verwahrt. Das genutzte Amplifikationsprogramm ist in Tab. 2.21 zu sehen.

Das hier verwendete RNase-freie H<sub>2</sub>O stammte ausschließlich aus dem Macherey-Nagel RNA Nucleo Spin® RNA-Kit.

Tab. 2.20: Mastermix für eine qRT-PCR am LightCycler.

Reagenz	Volumen je Probe
RNase-/DNase freies H <sub>2</sub> O	2,4 µl
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5 µl
Primer - <i>forward</i> (10 pmol/µl)	0,3 µl
Primer - <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	0,3 µl
<b>Gesamtvolumen je Probe</b>	<b>8 µl</b>

Tab. 2.21: Verwendetes qRT-PCR-Programm am LightCycler.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Präinkubation	95 °C	10 min	1
Amplifikation	95 °C	10 s	50
	63 °C	10 s	
	72 °C	10 s	
	74 °C	1 s	
Schmelzkurve	95 °C	10 s	1
	65 °C	10 s	
	97 °C	10 s	
Kühlung	40 °C	30 s	1

Die Analyse der Genexpression der Proben erfolgte mit dem zugehörigen Programm LightCycler® 480 Software release 1.5.0 SP3 über die relative Quantifizierung. Für die Analyse wurde darauf geachtet, dass die C<sub>p</sub>-Werte der zusammengehörigen Triplikate nicht um den Wert 0,75 voneinander abweichen.

Die Oligonukleotidsequenzen der Primer für die untersuchten Gene sind in Tab. 2.22 gezeigt.

Tab. 2.22: Verwendete qRT-PCR-Primer.

Primer	Anmerkungen	Oligonukleotidsequenz Vorwärts-Primer (5' → 3') ( <i>forward</i> )	Oligonukleotidsequenz Rückwärts-Primer (3' → 5') ( <i>reverse</i> )
<i>rpl32</i>	alle Transkripte	CCAGTCGGATCGATATGCTAA	GTTTCGATCCGTAACCGATGT
<i>Cyp18a1</i>	RA + RB	TCCACCATTCTGGAGTCGAT	ACCCATTGAGTTCACATCC
<i>hsp70</i>	alle Transkripte, kein Intronspanning	CCTGGACAAGTGCAACGAAAC	ATAGGGGAGCAGTGGCGA

### 2.10.5.2 Kalibrator

Für den Kalibrator wurden fünf große L3-Larven, die sich noch im Nährmedium befanden, und fünf späte L3-Larven des Stamms Canton-S geschlechtsunselektiert verwendet.

### 2.10.5.3 Standardkurven

Für die Gene *rpl32*, *Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase 18a1* (*Cyp18a1*) sowie *Hitzeschockprotein 70 kDa* (*hsp70*) wurden jeweils Standardkurven erstellt. Für die Aufnahme von Standardkurven wurde ein Kalibrator aus ganzen Larven eingesetzt (s. Kapitel 2.10.5.2). Hierbei wurde dessen unverdünnte cDNA sowie in einer 1:10- und 1:100-fachen Verdünnung (je in RNase-freiem H<sub>2</sub>O stammend aus dem Macherey-Nagel RNA Nucleo Spin® RNA-Kit.), jeweils in Triplikaten, und zusätzlich in den 1:1 000- bzw. 1: 10 000-Verdünnungen in jeweils fünffacher Ausfertigung aufgetragen.

Die Erstellung der Standardkurven erfolgte über die absolute Quantifizierung des von der Firma Roche eigens für den LightCycler bereitgestellten Programms LightCycler® 480 Software release 1.5.0 SP3. Für eine Standardkurve durften die C<sub>p</sub>-Werte der zusammengehörigen Replikate nicht um den Wert 0,5 abweichen, um einen Gesamtfehler < 0,26 zu erhalten. Ebenso betrug die Effizienz der verwendeten Primer einen Wert > 1,78.

### 2.10.5.4 Statistische Auswertung von Genexpressionsdaten

Die statistische Auswertung zur Ermittlung des Signifikanzwertes (p) erfolgte im Falle von Zigarettenrauchexpositionsexperimenten pro Geschlecht und Zeitpunkt jeweils in Bezug auf die Luftkontrolle mittels eines einseitigen *ratio-paired* t-Tests (ganze Larve: vier biologische Replikate mit zehn Larven pro Expositionsgruppe, Geschlecht und Zeitpunkt; ganze Tracheen: drei biologische Replikate mit jeweils 21 - 69 Tracheen pro Expositionsgruppe und Geschlecht sowie dazugehörige, von Tracheen befreites, verbleibendes Homogenat von zehn Larven pro Expositionsgruppe und Geschlecht;

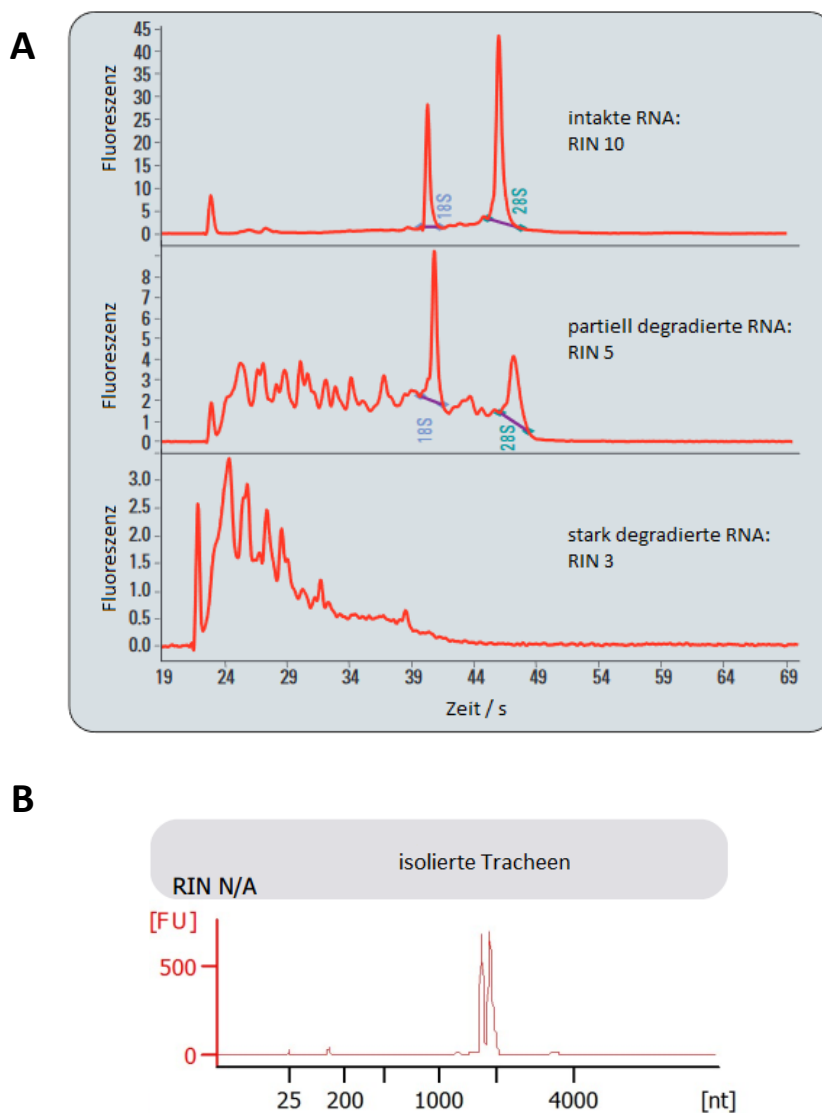
halbierte Tracheen: vier biologische Replikate mit jeweils 18 - 40 Proben pro Expositionsgruppe, Geschlecht und Tracheenbereich; Imago: drei biologische Replikate mit zehn Tauflieden pro Expositionsgruppe, Geschlecht, Zeitpunkt und Segment).

Im Falle der Nikotinverfütterungsversuche wurde je Geschlecht eine Einweg-Varianzanalyse (*one-way analysis of variances*, ANOVA) mit Dunnett's Post-Hoc-Test durchgeführt (vier biologische Replikate mit je zehn Larven pro Konzentration und Geschlecht).

## 2.10.6 RNA-Sequenzierung

### 2.10.6.1 Bestimmung der RNA-Integrität über den Bioanalyzer

Um sicherzustellen, dass die RNA der für die RNA-Sequenzierung verwendeten, isolierten Tracheen intakt war, wurden diese Proben mittels des Agilent Bioanalyzers untersucht. Dieser ermittelt einen sogenannten *RNA integrity number* (RIN)-Wert, der sich aus dem Verhältnis eukaryotischer, ribosomaler 18S- sowie ribosomaler 28S-RNA ergibt. Die RIN-Zahl kann Werte zwischen eins und zehn annehmen. Je kleiner der RIN-Wert, desto stärker degradiert liegt die RNA der untersuchten Probe vor (Abb. 2.6 - A). Bei Insekten wie *Drosophila melanogaster* besteht die ribosomale 28S-RNA aus zwei Untereinheiten mit vergleichbarer Größe. Diese werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten und können beispielsweise durch eine thermische Behandlung voneinander getrennt werden. Aufgrund der ähnlichen Größe der beiden Untereinheiten zur 18S-Bande ist eine Bestimmung der RIN bei Invertebraten nicht möglich. Jedoch kann visuell das Vorliegen einer Degradation bestimmt werden: Bei Vorliegen intakter RNA sind zwei distinkte Banden auf der Höhe von etwa 2 000 Nukleotiden (nt) zu erkennen (Abb. 2.6 - B). Auch bei Invertebraten verbreitern sich mit zunehmender Degradation die Banden zunehmend in Richtung kleinerer Nukleotide.



**Abb. 2.6: Bestimmung der RNA-Integrität am Agilent Bioanalyzer.** A: Beispielhaftes Elektropherogramm von intakter (oben), partiell degradierter (mittig) und stark degradierter RNA von Vertebraten (modifiziert nach <sup>111</sup>). B: Das beispielhafte Elektropherogramm der untersuchten Larvaltracheen von *Drosophila melanogaster* zeigt zwei klar voneinander getrennte Signale auf der Höhe von etwa 2000 nt. Die RNA dieser Probe ist intakt.

Für die Bestimmung der RNA-Integrität der Proben, die für die RNA-Sequenzierung angedacht waren, wurde das Agilent 6000 Pico Kit nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden vorbereitend 550  $\mu$ l der RNA-Gelmatrix auf den Spin Filter pipettiert und zentrifugiert (Centrifuge 5415R (Eppendorf AG), 1 500 rcf, 10 min, RT), 65  $\mu$ l dessen wurden anschließend in ein 0,5 ml RNase-/DNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Das RNA Dye Concentrate wurde nach vorheriger Inkubation unter Lichtausschluss (45 min, RT) 10 s auf höchste Stufe vermischt und 1  $\mu$ l davon zur Gelmatrix hinzugefügt (Gel-Dye-Mix). Der Gel-Dye-Mix wurde 10 s vermischt, zentrifugiert

(Centrifuge 5415R (Eppendorf AG), 13 000 rcf, 10 min, RT) und bis zur Verwendung bei 4 °C unter Lichtausschluss verwahrt.

Für die Probenpräparation wurden diese zunächst 1:20 in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aus dem Macherey-Nagel Nucleo Spin® RNA Kit verdünnt und diese sowie der Größenmarker wurden denaturiert (2 min, 70 °C). Der Marker wurde nach der Denaturierung mit 90 µl RNase-/DNase-freiem H<sub>2</sub>O aus dem Macherey-Nagel Nucleo Spin® RNA Kit versetzt.

Der Chip wurde nach Herstellerangaben beladen und die RNA-Integrität über den Agilent 2001 Bioanalyzer und der dazugehörigen Agilent Bioanalyzer 2100 expert Software überprüft.

### **2.10.6.2 Prozessierung der Proben für die RNA-Sequenzierung**

Die RNA-Sequenzierung wurde mittels des Verfahrens der nächsten Generation (*next generation sequencing*, NGS) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Erstellung eines qualitativen und quantitativen Genexpressionsprofils der gewünschten Proben (Transkriptom). Mit diesem Hochdurchsatzverfahren kann somit die Gesamtheit der in ihrer Expression modifizierten Gene durch wie in diesem Fall eine Exposition mit einem Mal erfasst und analysiert werden. Dafür wird die mRNA der jeweiligen Proben zunächst durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Durch Fragmentierung, beispielsweise mechanisch über die *shotgun*-Methode, und anschließender Ligation von Adapteroligonukleotiden an die 5'- und 3'-Enden der cDNA wird eine Bibliothek angelegt. Die Fragmente werden durch Bindung an eine Flusszelle immobilisiert und über eine Brücken-PCR amplifiziert. Dabei werden Oligonukleotide verwendet, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Das jeweilige Fluoreszenzsignal ist damit spezifisch für das Fragment und erlaubt eine Identifizierung dessen. Die ausgelesenen Fragmente (*reads*) werden final mit einem Referenzgenom verglichen. Die Anzahl der detektierten *reads* korreliert dabei positiv mit der Genexpression.

Für diese Analyse wurden Tracheen, isoliert aus männlichen und weiblichen Wildtyp-L3-Larven, nach Zigarettenrauch- und Luftexposition innerhalb eines Zeitrahmens von 1,5 h verwendet (s. Kapitel 2.8.2). Die RNA der Proben wurde extrahiert (Kapitel 2.10.1) und die Integrität dieser mittels des Agilent Bioanalyzers überprüft (Kapitel 2.10.6.2).

Die RNA-Sequenzierung wurde am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, in Hamburg durchgeführt. Je Probe wurden 17 - 22 Millionen *reads* zugeordnet.

### **2.10.6.3 Auswertung der Daten resultierend aus der RNA-Sequenzierung**

Die Hauptkomponentenanalyse (*principle component analysis*, PCA), die hierarchische Clusteranalyse, die jeweiligen Diagramme sowie das *read-mapping* wurden am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, in Hamburg angefertigt. Regulierte Gene wurden als signifikant erachtet, sofern eine Deregulation im Bereich  $-0,59 \leq \log_2$ -fache Veränderung der Genexpression im Vergleich zur Luftexposition vorlag bzw. eine Hochregulation im Bereich



$\geq 0,59$   $\log_2$ -fache Veränderung der Genexpression in Relation zur unbehandelten Kontrolle detektiert wurde. Simultan wurde als adjustierter p-Wert die Falscherkennungsrate (*false discovery rate*, FDR)  $< 0,05$  als Kriterium für im Vergleich zur Kontrolle signifikant regulierte Gene verwendet.

Die Auswertung der prozessierten Daten erfolgte eigens mit der frei zugänglichen Software *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID)<sup>102, 103</sup>. Dazu wurden die Flybase-ID signifikant differentiell regulierter Gene im Vergleich zur jeweiligen Luftkontrolle innerhalb der im Programm implementierten Funktionsannotationsanalyse als Genliste eingefügt. Die Identifikationsplattform FLYBASE\_GENE\_ID wurde ausgewählt und zur Analyse herangezogen. Für die weitere Auswertung wurden die vom Programm identifizierten Genontologie (GO)-Terme, die in dem Ordner GOTERM\_BP\_DIRECT zusammengefasst waren, bis zu einem p-Wert von  $p < 0,1$  verwendet. Auf die Verwendung eines adjustierten p-Wertes wurde verzichtet, da mittels der Datensätze lediglich Hypothesen erstellt, jedoch nicht belegt werden sollten. Es folgte eigens eine Zuordnung der Terme zu allgemeineren Elterntermen, wobei die Internetpräsenz <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/> dafür zu Rate gezogen wurde. Mehrfachzuordnungen zu den einzelnen Kategorien waren möglich.

### 2.10.7 Detektion von Cotinin

Die Detektion von Cotinin wurde an das Verfahren von GREEN *et al.* angelehnt.<sup>105</sup>

#### 2.10.7.1 Proteinbestimmung mittels des BCA-Verfahrens

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde durch die Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA)-Methode mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Das Kit wurde dabei nach Herstellerprotokoll angewendet. Als chemische Grundlage dient die als Biuret-Reaktion bekannte Reduktion eines zweiwertigen Kuperions ( $\text{Cu}^{2+}$ ) zu einem einwertigen Kupferion ( $\text{Cu}^+$ ) im alkalischen Milieu durch Proteine. Das  $\text{Cu}^+$  wird von BCA komplexiert, was sich in einem violetten Farbumschlag äußert. Eine Quantifizierung erfolgt mittels eines bovines Serumalbumin (BSA)-Standards.

Für diesen Assay wurde zunächst eine Arbeitslösung bestehend aus 50 Teilen BCA-Reagenz A und 1 Teil BCA-Reagenz B hergestellt. Diese wurde für 15 s vermischt, bis eine homogene Lösung entstanden ist. 25  $\mu\text{l}$  der BSA-Standards je in Duplikaten sowie der 1:10-verdünnten Proben (in ELISA-Homogenisierungspuffer) je in Triplikaten wurden jeweils in ein *well* einer transparenten 96-*well*-Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zufügen von je 200  $\mu\text{l}$  Arbeitsreagenz wurde die Mikrotiterplatte in drei Schritten inkubiert (erster Inkubationsschritt: 30 s, RT, unter Schütteln; zweiter Inkubationsschritt (30 min, 37 °C), dritter Inkubationsschritt: 5 min, RT). Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm durch das Tecan-Lesegerät detektiert.

Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte über die Magellan™-Software.

### 2.10.7.2 Cotinin-ELISA

Bei dem Cotinin-*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) handelt es sich um einen kompetitiven Festphasen-ELISA. Hierbei konkurriert das Enzymkonjugat Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) mit dem sich in der Probe befindlichen Cotinin um die Bindungsstellen des Antikörpers, mit dem der *well*-Boden der ELISA-Mikrotiterplatte beschichtet ist. Durch mehrere Waschgänge wird überschüssiges Cotinin entfernt. Bei Bindung von 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Enzymsubstrat an HRP kommt es zu einer Farbreaktion, sodass wiederum eine inverse Korrelation zwischen der Absorption und der Cotininmenge in der Probe vorliegt. Die Stopplösung, die typischerweise eine Säure enthält, denaturiert das Enzym und unterbindet auf diese Weise die weitere Bindung von TMB an HRP. Mit Hilfe einer Standardkurve kann die Cotininmenge quantifiziert werden.

Das Cotinin-ELISA-Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Dafür wurde das ELISA-Kit 1 h vor Verwendung bei RT gelagert. 10 µl der Cotinin-Standards sowie der Proben je mit einer Konzentration von 1 µg (nach Rachexposition) bzw. 5 µg Protein (nach Nikotinverfütterung)/µl ELISA-Homogenisierungspuffer wurden jeweils in Duplikaten den *wells* hinzugefügt. Nach der Zugabe von 100 µl Enzymkonjugat pro *well* wurde die Mikrotiterplatte in zwei Schritten je unter Lichtausschluss inkubiert (erster Inkubationsschritt: 30 s, RT, unter Schütteln; zweiter Inkubationsschritt: 1 h, RT). Das Konjugat wurde entfernt und die *wells* sechsmal mit je 300 µl Millipore-Wasser gewaschen. Die Mikrotiterplatte wurde nach Beenden des Waschganges sorgfältig getrocknet, indem diese umgedreht und energisch auf Zellulosepapier geschlagen wurde. Anschließend wurden je *well* 100 µl des Enzymsubstrats appliziert und die Mikrotiterplatte unter Lichtausschluss inkubiert (30 min, RT). Nach Zufügen von 100 µl Stopplösung pro *well* wurde die Mikrotiterplatte erneut inkubiert (30 s, RT, unter Schütteln) und anschließend die Absorption mit Hilfe des Tecan-Mikroplattenlesegerätes und der zugehörigen Magellan™-Software bei 450 nm detektiert.

Die statistische Auswertung erfolgte bei Zigarettenrauchexpositionsexperimenten je Geschlecht und Zeitpunkt in Bezug auf die jeweils unbehandelten Proben mittels eines einseitigen *ratio-paired* t-Test (vier biologische Replikate mit je zehn Larven pro Expositionsgruppe, Geschlecht und Zeitpunkt); im Falle der Nikotinapplikation über das Medium in vier voneinander unabhängigen Versuchen je Geschlecht durch eine *one-way* ANOVA mit Dunnett's Post-Hoc-Test (vier biologische Replikate mit je zehn Larven pro Geschlecht und Konzentration).

## 2.11 Weitere Methoden

### 2.11.1 *hsp70*-GFP-Larven

#### 2.11.1.1 ganze Larven

Direkt nach der Berauchung wurden *hsp70*-GFP-Larven zweimal in 1x PBS gewaschen und in kleine Kulturröhrchen überführt. 22 - 26 h nach Expositionsende wurden die Larven nach Geschlechtern selektiert (s. Kapitel 2.5.2) und mittels Dichlorvos betäubt (fünf Larven in 50 µl; Verdünnung: 1:1 000 in 1x PBS, 10 min, RT). Anschließend wurden die Larven zweimal in 1x PBS gewaschen, in einen Tropfen Halokarbonöl auf einem Objektträger überführt und mikroskopiert (GFP-Kanal (Anregung: 460 - 495 nm; Emission: 510 - 550 nm; Belichtungszeit: 1 s; Empfindlichkeit: ISO 1600, Vergrößerung: 16x (ganze Larve) bzw. 63x (Fokus auf posteriore Larve), Kontrast: niedrig; Programm: Olympus cellSens Standard). Zur Hervorhebung der Fluoreszenz wurde diese nachträglich mit Hilfe der Image J-Software<sup>104</sup> durch das Tool „Colour Balance“ variiert, indem die grüne Fluoreszenz bezüglich ihrer Helligkeit (*brightness*) bei jeder Aufnahme gleichermaßen verändert wurde. Anschließend wurde zusätzlich die Fluoreszenz in allen Bildern gleichmäßig mit Hilfe des Programms MS Word hervorgehoben.

#### 2.11.1.2 ganze Tracheen

Direkt nach der Berauchung wurden je Expositionsgruppe 16 *hsp70*-GFP-Larven zweimal in 1x PBS gewaschen und in kleine Kulturröhrchen überführt. 21 - 29 h nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition wurden die Tracheen der Larven nach dem in Kapitel 2.5.2 beschriebenen Protokoll nach Geschlechtern selektiert, die Tracheen aus diesen isoliert (Kapitel 2.8.2) und anschließend mikroskopiert (GFP-Kanal (Anregung: 460 - 495 nm; Emission: 510 - 550 nm; Belichtungszeit: 1 s; Empfindlichkeit: ISO 1600, Vergrößerung: 25x, Kontrast: hoch, Programm: Olympus cellSens Standard). Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mittels des Programms Image J<sup>104</sup>. Für eine bessere Darstellung der Fluoreszenz wurden die Bilder nach der Quantifizierung mittels Image J<sup>104</sup> bearbeitet. Ebenso wurde mit Hilfe dieses Programmes die Helligkeit bei allen Bildern gleichermaßen verdeutlicht.

Pro Expositionsgruppe und Geschlecht wurden 16 isolierte Tracheenpaare untersucht. Die statistische Auswertung der Quantifizierung erfolgte je Geschlecht über einen einseitig ungepaarten t-Test in Bezug auf die jeweilige Luftkontrolle.

### 2.11.2 Immunfluoreszenzfärbung von Larventracheen

Für die Immunfluoreszenzfärbung der Tracheen von *Drosophila*-Larven wurden direkt nach der Exposition fünf bis zehn L3-Larven gewaschen (1x PBS, 70 % EtOH, 1x PBS) und in ein Blockschälchen aus Glas mit 200 µl 1x PBS überführt. Mit Hilfe von Mikropinzetten wurden den Tieren jeweils der Kopf sowie der Darm entfernt. Die Kutikula wurde an mehreren Stellen aufgerissen und die Tracheen so weit wie möglich freigelegt ohne sie vollständig zu isolieren. Die aufgerissenen Larven wurden je in 2 ml 1x PBS in ein *well* einer 6-*well*-Mikrotiterplatte überführt. Dieser Prozess wurde solange wiederholt bis 20 - 30 gut präparierte Larven vorlagen. Die präparierten Tiere wurden in 2 ml 3,5 %iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (in 1x PBS, hergestellt aus 20 % PFA) je *well* unter leichtem Schütteln fixiert (15 min, RT). Die Larven wurden zweimal mit je 2 ml Waschpuffer unter leichtem Schütteln gewaschen (je 15 min, RT) und anschließend unter Schütteln geblockt (30 min, RT).

Die Antikörper- und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Dihydrochlorid-Behandlung fand ausschließlich unter Lichtausschluss statt. Hierbei wurde je eine Larve mittels einer Mikropinzette in ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte überführt und mit 150 µl Antikörperlösung, in der  $\alpha$ -Coracle verdünnt (1:200) vorlag, versetzt. Die Larven wurden in zwei Schritten unter Schütteln inkubiert (erster Inkubationsschritt: 10 min, RT; zweiter Inkubationsschritt: über Nacht, 4 °C). Die Larven wurden in ein *well* einer 6-*well*-Mikrotiterplatte mit 2 ml Waschpuffer unter Schütteln gewaschen (15 min, RT). Für die Behandlung mit dem zweiten Antikörper wurden die Larven mit der Mikropinzette in je ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte mit 150 µl Antikörperlösung, in welcher AlexaFluor 488® Antikörper verdünnt (1:300) vorlag, übertragen und unter Schütteln inkubiert (4 h, RT). Die Larven wurden in ein neues *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte mit 150 µl Antikörperlösung, in welcher DAPI-Dihydrochlorid-Stammlösung verdünnt (1:40) vorlag, übertragen und in dieser unter Schütteln inkubiert (7 min, RT). Die Larven wurden in der 6-*well*-Mikrotiterplatte zweimal unter Schütteln gewaschen (je 15 min, RT). Für das Mikroskopieren wurden die Tracheenpaare vollständig in Blockschälchen aus Glas mit 200 µl 1x PBS isoliert und auf einen Objektträger in je einen Tropfen *ibidi mounting medium* überführt. Der Objektträger wurde mit einem Deckgläschen bedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die Detektion der Fluoreszenz der Proben erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mittels des UV- (Emission: 330 - 385 nm; Extinktion:  $\geq$  420 nm) und des GFP-Fluoreszenzfilters (Anregung: 460 - 495 nm; Emission: 510 - 550 nm) (Belichtungszeit: 1,493 s; Empfindlichkeit: ISO 1600, Vergrößerung: 200x, Kontrast: mittel; Programm: Olympus cellSens Standard). Je Expositionsgruppe und Geschlecht wurden fünf bis acht Tracheenpaare untersucht.

### 2.11.3 Bestimmung der Aktivität nach Zigarettenrauchexposition

#### 2.11.3.1 Lokomotorische Aktivität von Larven

Die lokomotorische Aktivität ist ein Fitnessparameter, der für die Beurteilung der Auswirkung genetischer Veränderungen und/oder einer Behandlung herangezogen werden kann. Das Vorgehen wurde an das von NICHOLS *et al.* angelehnt.<sup>112</sup>

Direkt nach der Berauchung wurden die Larven einzeln jeweils einmal in 1x PBS gewaschen mittig auf eine große Petrischale mit Glucose-Agar-Medium platziert. Unter dieser Platte war ein Gitter mit Quadraten der Größe 0,5 cm<sup>2</sup> sichtbar. Die Bewegung der Larven wurde innerhalb eines Zeitfensters von 1 min videografisch dokumentiert.

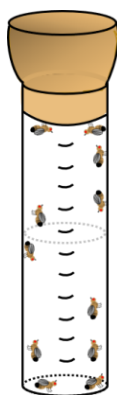
Für die Auswertung wurde die Anzahl der überquerten Gitternetzlinien gezählt. Die Passage von sich kreuzenden oder sich nahezu kreuzenden Gitterlinien wurde als eine Überquerung bewertet.

Je Expositionsgruppe und Geschlecht wurden zehn Larven untersucht. Für die statistische Auswertung wurde eine *one-way* ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test durchgeführt.

#### 2.11.3.2 Geotaxis-Assay

Entsprechend der Methoden von NICHOLS *et al.*<sup>112</sup> und BAINTON *et al.*<sup>113</sup> wird sich bei diesem Assay die intrinsische Eigenschaft der Taufliegen zu Nutze gemacht, senkrechte Oberflächen zu erklimmen (negative Geotaxis).

Zur Herstellung der Geotaxisröhrchen wurden ein an beiden Seiten offenes sowie ein nur zu einer Seite geöffnetes, mittleres Kulturröhrchen mit Tesafilm miteinander befestigt. Auf dem Röhrchen wurde eine Skalierung in 1 cm-Schritten aufgetragen. Die Öffnung wurde mittels eines Milbenstopfens verschlossen (s. Abb. 2.7) Die maximal für eine Taufliege zu erreichende Höhe innerhalb eines solchen Röhrchens betrug 15 cm.



**Abb. 2.7: Schematische Darstellung eines Geotaxisröhrchens.** Für Untersuchung der negativen Geotaxis nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition wurden die exponierten Imagines in die vorgesehenen Röhrchen transferiert und die nach 10 s erreichte Höhe im Röhrchen 0, 30, 60, 90 und 120 min nach Expositionsende dokumentiert. Für die Ermittlung der Höhe wurde eine Messskala in 1 cm-Schritten aufgetragen.

### 2.11.3.2.1 Einfache Zigarettenrauchexposition

Nach der Exposition wurden die Taufliegen (63 - 65 pro Expositionsgruppe und Geschlecht) innerhalb von 5 min ohne CO<sub>2</sub>-Betäubung in die Geotaxisröhrchen überführt und diese mit Milbenstopfen verschlossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Stopfen gleichmäßig in die Röhrchen hineinreichten. Die Taufliegen wurden 1 min lang im Röhrchen ungestört gelassen, damit sie sich akklimatisieren konnten. Anschließend wurden die Taufliegen durch dreimaliges, energisches Klopfen der Röhrchen auf einen Tisch auf den Boden des Röhrchens geschüttelt. Den Taufliegen wurde erlaubt der negativen Geotaxis nachzugehen. Dies wurde mittels einer Videoaufnahme dokumentiert. Die erreichte Höhe im Röhrchen wurde nach 10 s nach Runterklopfen analysiert. Dieses Vorgehen wurde nach 30, 60, 90 und 120 min nach Expositionsende wiederholt.

Pro Expositionsgruppe und Geschlecht wurde die Höhe von 42 - 48 Taufliegen ausgewertet. Für die statistische Analyse wurde je Messzeitpunkt und Geschlecht ein einseitig ungepaarter t-Test in Bezug auf die jeweilige Kontrolle durchgeführt. Tote Tiere wurden von der Auswertung nicht ausgeschlossen, da diese nicht innerhalb dieses Versuchsaufbaus unmittelbar vor der Durchführung des Assays zweifelsfrei und ohne mögliche Beeinflussung des Versuchsausganges als solche identifiziert werden konnten.

### 2.11.3.2.2 Zweifache Zigarettenrauchexposition

Die Untersuchung der negativen Geotaxis erfolgte analog zu der in Kapitel 2.11.3.2.1 beschriebenen Methode. In diesem Falle wurden die Fliegen jedoch 15 s mittels CO<sub>2</sub> sediert, um sie in die Geotaxisröhrchen zu überführen. Nach Runterklopfen der Taufliegen wurde die erreichte Höhe im Röhrchen 4 h nach Beendigung der Exposition innerhalb eines Zeitfensters von 10 s einmalig bestimmt und videografisch festgehalten.

Danach wurden die Taufliegen kurz mittels CO<sub>2</sub> betäubt und in große Kulturröhrchen mit Fliegenstandardmedium überführt.

20 h nach Zigarettenrauchexpositionsende wurden die Taufliegen kurz mit CO<sub>2</sub> sediert, tote Fliegen entfernt und erneut in die Geotaxisröhrchen, verschlossen mit einer Petrischale randvoll gefüllt mit Fliegenstandardmedium, überführt. Nach Austausch der Petrischale gegen einen Milbenstopfen wurde 24 h nach Expositionsende, wie zuvor in Kapitel 2.11.3.2.1 beschrieben, die negative Geotaxis untersucht, indem die erreichte Höhe im Röhrchen nach 10 s analysiert wurde.

Für die statistische Auswertung von 49 - 59 Taufliegen pro Geschlecht und Zeitpunkt wurde eine *one-way* ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test je Geschlecht durchgeführt. Verstorbene Tiere wurden in der Auswertung zum Zeitpunkt 4 h nach Expositionsende nicht ausgeschlossen, da diese nicht innerhalb dieses Versuchsaufbaus unmittelbar vor der Durchführung des Assays zweifelsfrei und ohne mögliche Beeinflussung des Versuchsausganges identifiziert werden konnten.

## 2.11.4 Bestimmung der Überlebensrate nach Rauchexposition

### 2.11.4.1 Zigarettenrauchexposition während des Larvalstadiums

Um die Überlebensrate der Larven während der Metamorphose als Fitnessparameter zu bestimmen, wurde die Anzahl der lebenden Larven direkt nach der Behandlung gezählt. Tote Tiere wurden aussortiert, lebende Tiere wurden zweimal in 1x PBS gewaschen und in eine kleine Petrischale randvoll gefüllt mit Fliegenstandardmedium transportiert. Auf diese wurde ein beidseitig offenes, mittleres Kulturröhrchen mittels Tesafilms befestigt, welches durch Milbenstopfen verschlossen wurde. Die Anzahl der Puppen, die sich bis zu 2 d nach der Behandlung gebildet hatten, wurde gezählt; weiterhin wurde das Medium zu diesem Zeitpunkt gewechselt. Die Anzahl der geschlüpften, adulten Taufliegen wurde 5 - 6 d nach der Zigarettenrauchexposition bestimmt. Melanisierte Larven, falsch geschlechtsselektierte Tiere, während der Rauchexposition verpuppte Larven sowie in dem sich angegebenen Zeitrahmen nicht entwickelte Tiere wurden aus der Bewertung ausgeschlossen. Für die statistische Auswertung von vier biologischen Replikaten wurde eine  $\beta$ -lineare Regression<sup>114, 115</sup> mit der Annäherung  $1 \sim 0,9999$  und ein Bonferroni-Post-Hoc-Test angewendet.

### 2.11.4.2 Zigarettenrauchexposition während des Imaginalstadiums

Direkt nach der Berauchung wurden die Taufliegen für 15 s mittels CO<sub>2</sub> betäubt und in *Drosophila*-Kulturröhrchen mit wenig Fliegenstandardmedium (Füllhöhe im Röhrchen: 1 cm) überführt (je Expositionsgruppe und Geschlecht 65 Taufliegen). Die Röhrchen wurden horizontal gelagert. Aufgrund teilweise langer Sedierung der Taufliegen infolge der Zigarettenrauchexposition wurde die Evaluation der überlebenden Tiere 24 h nach Rauchexpositionsende vorgenommen. Für die statistische Auswertung von fünf biologischen Replikaten mit 65 Taufliegen pro Expositionsgruppe und Geschlecht wurde je Geschlecht ein einseitiger, ungepaarter t-Test in Bezug auf die jeweiligen, unbehandelten Imagines durchgeführt.

### 2.11.4.3 Zigarettenrauchexposition während des Larval- und Imaginalstadiums

Die Untersuchung der Überlebensrate erfolgte analog zu dem in Kapitel 2.11.4.2 beschriebenen Verfahren. Für die statistische Auswertung von vier voneinander unabhängigen Experimenten mit 42 - 64 Taufliegen pro Expositionsgruppe und Geschlecht wurde je Geschlecht eine *one-way* ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Das Rauchmodell für die *Drosophila*-Larve

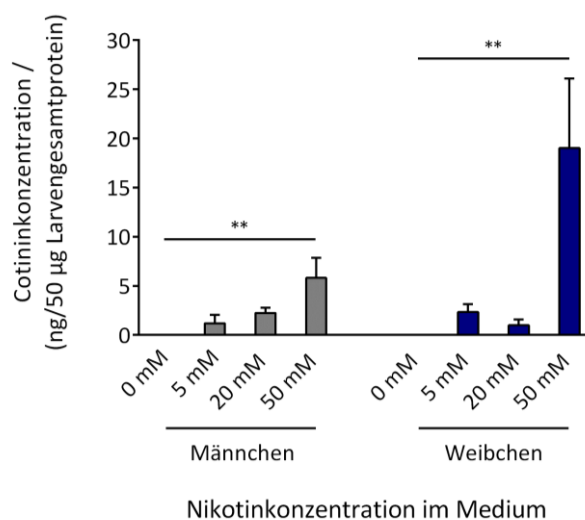
#### 3.1.1 Vorangehende Untersuchungen: Cotinin kann infolge einer oralen Aufnahme von Nikotin bei ganzen Wildtyp-Larven detektiert werden

Bei dem Alkaloid Nikotin handelt es sich um einen sekundären Pflanzenstoff, der vor allem in Tabakpflanzen *Nicotiana* spp. als endogenes Insektizid gebildet wird. Nikotin, das beispielsweise über die Inhalation von Tabakrauch in den Organismus gelangt, wird im Zuge des Metabolisierungsprozesses bei Säugern vor allem zu Cotinin verstoffwechselt. Dieser Metabolit ist im Vergleich zur Ausgangssubstanz durch eine längere Halbwertszeit gekennzeichnet und findet als spezifischer Biomarker für die akute Zigarettenrauchexposition Anwendung.<sup>12</sup>

Bis *dato* ist nichts über den Metabolismus von Nikotin bei der *Drosophila*-Larve bekannt. Jedoch konnte in verschiedenen Invertebratensystemen Cotinin als Stoffwechselprodukt von Nikotin nachgewiesen werden.<sup>105, 106</sup> Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, ob Cotinin als Biomarker für eine Aufnahme von Zigarettenrauch während des juvenilen Stadiums auch bei *Drosophila melanogaster* geeignet ist, wurden Wildtyp-Larven im dritten Häutungsstadium (L3) mit verschiedenen Konzentrationen an Nikotin im Nährmedium versetzt. Anschließend wurden ganze Larven hinsichtlich ihrer Cotininkonzentration untersucht.

In der Kontrolle konnte weder bei Männchen noch bei Weibchen Cotinin detektiert werden. Bei beiden Geschlechtern konnte jedoch nach der oralen Aufnahme von Nikotin Cotinin nachgewiesen werden. Der Umsatz von Cotinin korrelierte dabei positiv mit der verwendeten Nikotinkonzentration im Nährmedium. Bei Verwendung von 5 mM Nikotin wurde 1,2 ng bzw. 2,4 ng Cotinin/50 µg Gesamtprotein bei Männchen bzw. Weibchen detektiert. Bei Exposition mit 20 mM Nikotin im Medium wurde eine Konzentration von 2,2 bzw. 1,0 ng Cotinin/50 µg Larvengesamtprotein ermittelt. Doch erst bei Verwendung des 50 mM konzentrierten Nikotin-Mediums wurde Cotinin signifikant erhöht im Vergleich zu unbehandelten Larven vorgefunden. Hierbei konnte bei Männchen 5,8 ng Cotinin/50 µg Gesamtprotein, bei Weibchen 19,0 ng Cotinin/50 µg Gesamtprotein detektiert werden (Abb. 3.1).





**Abb. 3.1: Cotininkonzentration bei ganzen Wildtyp-Larven nach oraler Aufnahme von Nikotin.** Wildtyp-Larven wurden 1 h lang in Nährmedien mit verschiedenen Nikotinkonzentrationen gehalten. Anschließend wurden Proben ganzer Larven genommen, das Gesamtprotein isoliert, in Hinsicht auf die Proteinmenge normalisiert und mit Hilfe eines ELISA-Assays bezüglich des Nikotin-Metaboliten Cotinin untersucht. Die Cotininkonzentration stieg bei Männchen auf bis zu 5,8 ng/50 µg Gesamtprotein bei Verwendung des höchstkonzentrierten Mediums an, bei Weibchen wurde bis zu 19,0 ng Cotinin/50 µg Gesamtprotein detektiert. MW ± SEM. n = 4 (zehn Larven je Konzentration). Statistik (je Geschlecht): *one-way* ANOVA mit Dunnett's Post-Hoc-Test. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

### 3.1.2 Design eines *Drosophila*-Modells zur Exposition von Zigarettenrauch während juveniler Entwicklungsphasen

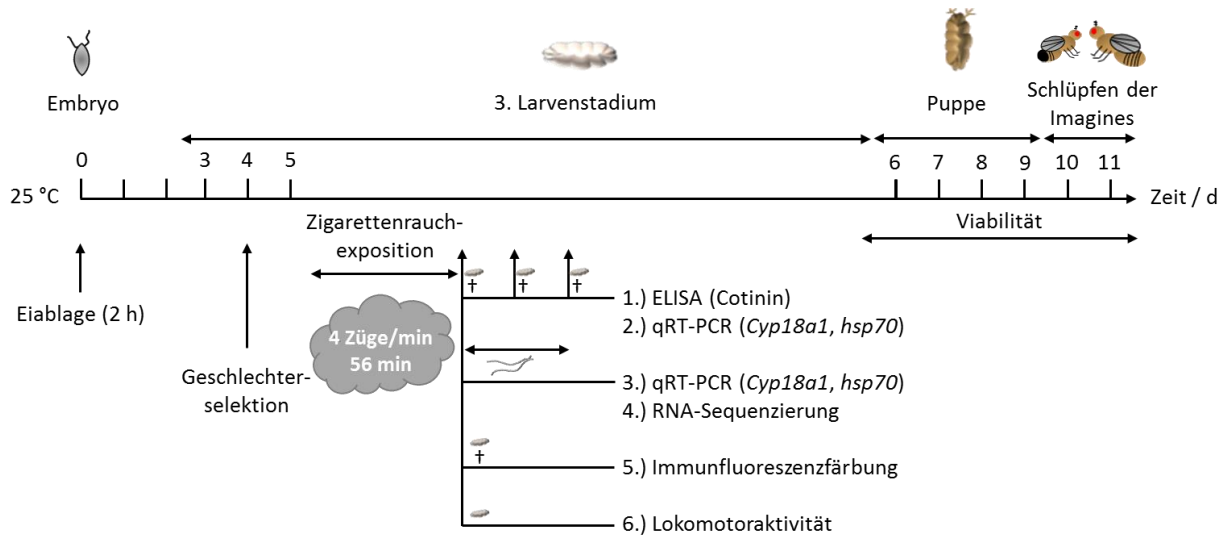
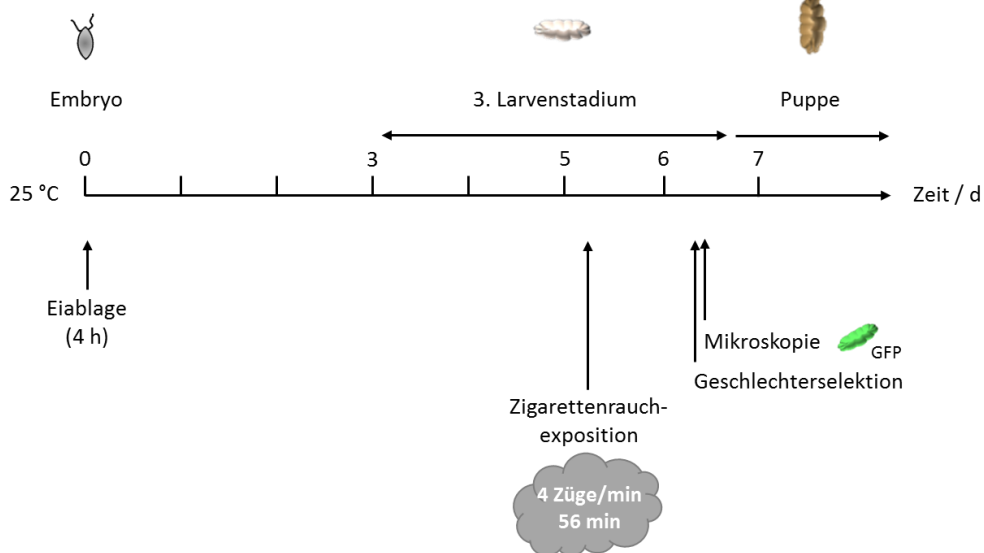
Erste Resultate zeigten, dass Nikotin, als Bestandteil von Zigarettenrauch, beim Menschen und bei der Tauflye gleichermaßen zu Cotinin metabolisiert wird (Abb. 3.1). Dahingehend sollte ein Rauchmodell entwickelt werden, um die Fragestellung dieser Arbeit, welche Auswirkungen eine Zigarettenrauchexposition während vulnerabler Lebensphasen nach sich zieht, zu untersuchen. Dieses Modell hatte dabei folgende Aspekte berücksichtigt:

- 1.) Aufgrund zukünftiger Betrachtungen des Modells in Hinsicht auf chronisch-entzündliche Atemwegserkrankungen sollte ein krankheitsorientiertes Modell verwendet werden, welches die Auswirkungen des Tabakrauchs voneinander geschlechtergetrennt repräsentiert.
- 2.) Es musste eine Zigarettenrauchdosis gefunden werden, die bei Larven eine physiologische Reaktion hervorruft, jedoch nicht letal ist.
- 3.) Es musste sichergestellt werden, dass der Zigarettenrauch in die Atemwegsorgane der Larve eindringt.

Die Etablierung des Modells wurde mit dem Wildtyp-Stamm Canton-S durchgeführt, von dem bekannt ist, sensibler als andere Wildtyp-Stämme auf eine Zigarettenrauchexposition zu reagieren.<sup>116</sup> Um eine Alterssynchronisation der Larven zu gewährleisten, wurde ein kurzes Zeitfenster für die Eiablage von 2 h gewählt. Am vierten Tag nach der Oviposition wurden die Larven nach Geschlechtern selektiert, um den geschlechterspezifischen Aspekt chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen<sup>68, 117</sup> zukünftig nachvollziehen zu können. Die Larven wurden 24 h später einer Zigarettenrauchexposition unterzogen. Zum Zeitpunkt der Berauchung befanden sich die Larven im L3-Stadium, etwa 7 h vor Einleitung der Verpuppung. Dies ist eine Phase mit einem stabilen Hormonstatus<sup>118</sup>, die eine gezielte Untersuchung der Atemwege ermöglicht. Die Verwendung spezieller Gefäße und einer geringen Menge an Nährmedien stellte sicher, dass Larven während der Exposition mit Tabakrauch an einer Flucht oder am Vergraben ins Medium gehindert wurden und somit für den gesamten Zeitraum dem Tabakrauch exponiert waren. Eine Gruppe von Tieren aus der gleichen Eiablage, die unter identischen Bedingungen gehalten und behandelt wurde, diente als Kontrolle. Während des Versuchs wurden diese Kontrolltiere in einer zweiten mit Umgebungsluft durchfluteten Kammer innerhalb der Rauchmaschine gehalten. Die Kontrollkammer wurde mit der gleichen Flussrate belüftet und wies die gleiche Temperatur und Luftfeuchtigkeit wie die Rauchexpositions-kammer auf. Tiere in der Expositions-kammer wurden 56 min lang dem Zigarettenrauch von insgesamt 24 Zigaretten exponiert (vier Züge/min). Mit den gewählten Parametern konnte nur marginal Cotinin detektiert werden. Jedoch wiesen die Larven eine signifikante Erhöhung der *Cyp18a1*-Genexpression auf. Daraufhin wurden diese Expositionszeit und Rauchkonzentration für alle nachfolgenden Experimente verwendet. Im Zuge der Modelletablierung wurde die Expression der Gene *Cyp18a1* und *hsp70* in ganzen Larven, isolierten sowie halbierten Tracheen mittels qRT-PCR bestimmt und hinsichtlich der Analyse der Auswirkungen von Zigarettenrauch auf die Larve das Transkriptomprofil von Larvaltracheen mit Hilfe einer RNA-Sequenzierung untersucht. Weiterhin die Integrität des Atemwegsepithels überprüft. Außerdem wurde die Fitness der Larven anhand physiologischer, verhaltensbiologischer und pathologischer Parameter untersucht, wobei sich auf die Lokomotoraktivität und die Viabilität in den drei Entwicklungsstadien (Larve, Puppe und Imago) konzentriert wurde. Der experimentelle Ablauf inklusive der detektierten Parameter ist in Abb. 3.2 - oben grafisch dargestellt.

Ferner wurde für die Etablierung ein ähnliches Modell für die Zigarettenrauchexposition des transgenen Reporterstamms *hsp70*-GFP verwendet. Hierfür wurde jedoch die Dauer der Eiablage von 2 h auf 4 h erhöht und die Geschlechtsselektion wurde erst unmittelbar vor der Untersuchung der Fluoreszenzintensität vorgenommen (Abb. 3.2 - unten). Diese Larven wurden nach der Exposition mit Luft oder Zigarettenrauch fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

## Canton-S

*hsp70*-GFP

**Abb. 3.2: Experimenteller Ablauf der Exposition von Zigarettenrauch während juveniler Entwicklungsphasen von *Drosophila melanogaster*.** Oben: Zigarettenrauchexposition des Wildtyp-Stamms Canton-S. Nach einer synchronisierten Eiablage und einer Geschlechtsselektion wurden 5 d alte L3-Larven für 56 min dem Rauch von 24 Zigaretten ausgesetzt (vier Züge/min) bzw. Luft ausgesetzt. Unmittelbar im Anschluss an die Exposition wurden die Larven hinsichtlich unterschiedlicher Parameter analysiert. Es wurden die Genexpressionsprofile der Gene *Cyp18a1* sowie *hsp70* ermittelt bei sowohl ganzen Larven als auch im isolierten Atemwegsepithel und die Konzentration des Nikotinmetaboliten Cotinin wurde quantifiziert. Zudem erfolgte eine RNA-Sequenzierung von isolierten Tracheen. Des Weiteren wurden physiologische Aspekte wie die Integrität des Atemwegsepithels und verhaltensbiologische Merkmale wie die Lokomotoraktivität und pathologische Parameter wie die Viabilität der verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Unten: Zigarettenrauchexposition des transgenen Reporterstamms *hsp70*-GFP. Nach einer synchronisierten Oviposition wurden 5 d alte L3-Larven mit vier Zügen/min für eine Dauer von 56 min beraucht oder für die jeweilige Zeit Luft exponiert. 24 h nach der Behandlung wurden die Tiere nach Geschlechtern selektiert und unmittelbar darauf wurde die von GFP ausgehende Fluoreszenz *in vivo* in ganzen Tieren bzw. *ex vivo* in isolierten Tracheen untersucht.

## 3.2 Auswirkungen einer Zigarettenrauchexposition auf die Physiologie der *Drosophila*-Larve

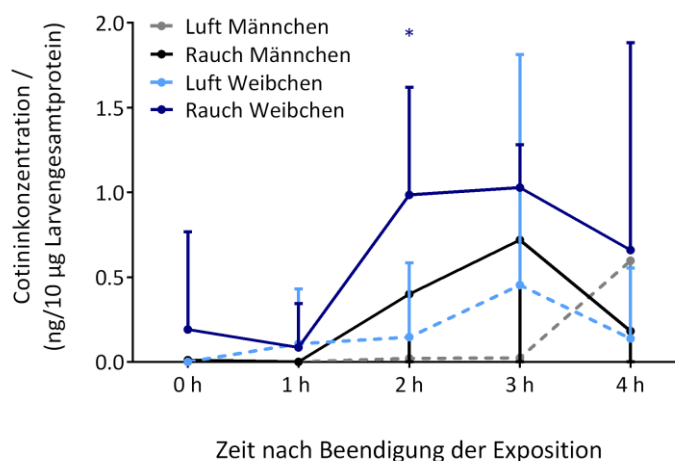
### 3.2.1 Cotinin kann bei *Drosophila*-Wildtyp-Larven infolge einer Zigarettenrauchexposition detektiert werden

Tabakrauch ist ein rein anthropogener Faktor. Damit ist eine physiologische Reaktion bei *Drosophila per se* nicht absehbar und wurde zunächst analysiert. Versuche, bei denen *Drosophila*-Larven Nikotin über das Nährmedium aufgenommen hatten (Abb. 3.1), zeigten, dass Larven auf das auch im Tabakrauch vorkommende Alkaloid wie in anderen Invertebraten<sup>105, 106, 119</sup> und Vertebraten-systemen<sup>120</sup> zu Cotinin umgesetzt wurde.

Dazu wurde direkt nach der Berauchung mit Zigaretten sowie stündlich bis zu 4 h nach Beendigung der Exposition die Cotininkonzentration in ganzen Larven ermittelt (Abb. 3.3).

Die Ergebnisse der einzelnen unabhängigen Versuche wiesen eine große Streuung auf. Der Basalwert der männlichen, Luft-exponierten Larven wurde bei maximal 0,6 ng Cotinin je 10 µg Gesamtprotein detektiert. Nach einer Zigarettenrauchexposition erfolgte eine geringe Erhöhung der Cotininkonzentration, dessen Maximum zum Zeitpunkt 3 h nach Rauchexpositionsende bei 0,7 ng Cotinin je 10 µg Gesamtprotein detektiert wurde. 4 h nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition unterschritt die ermittelte Cotininkonzentration der Rauchexpositionsgruppe die der Luft-exponierten Tiere (0,2 ng Cotinin/10 µg Larvengesamtprotein).

Die weiblichen, Luft-exponierten Larven wiesen Werte von maximal 0,5 ng Cotinin je 10 µg Gesamtprotein auf. Unmittelbar nach Zigarettenrauchexposition sowie 1 h später wurden in Rauch- und Luft-exponierten Tieren nahezu identische Cotininkonzentrationen gemessen. In den folgenden zwei Stunden stiegen diese auf 1,0 ng Cotinin pro 10 µg Gesamtprotein an. Hierbei erwies sich der Wert, der 2 h nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition ermittelt wurde, als statistisch signifikant zur Luftkontrolle. Zum zuletzt analysierten Zeitpunkt (4 h nach Beendigung der Exposition) sank die Konzentration auf 0,7 ng Cotinin je 10 µg Gesamtprotein ab.



**Abb. 3.3: Cotininkonzentration in ganzen Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.** Die Cotininkonzentration in ganzen, männlichen und weiblichen Larven nach Rauch- bzw. Luftexposition wurde stündlich über einen Zeitraum von 4 h mittels eines ELISAs ermittelt. Während bei Männchen keine signifikante Veränderung von Cotinin im Vergleich zur Luftkontrolle detektiert wurde, wurde bei den Weibchen dahingehend eine signifikante Erhöhung der Cotininkonzentration 2 h nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. MW  $\pm$  SEM (SEM wird für die Männchen einseitig nach unten, für die Weibchen einseitig nach oben gerichtet dargestellt). n = 4 (zehn Larven pro Messzeitpunkt). Statistik: einseitig gepaarter t-Test (Vergleich der Zigarettenrauch- zur Luftexposition; jeweils pro Zeitpunkt und Geschlecht). \*p < 0,05 (schwarz bei Männchen, blau bei Weibchen).

### 3.2.2 Eine Zigarettenrauchexposition induziert die Expression der Gene *Cyp18a1* und *hsp70* bei ganzen Wildtyp-Larven

Da Cotinin mit den gewählten Parametern für das Rauchmodell nicht in beiden Geschlechtern auf signifikante Weise nachgewiesen werden konnte, wurde nach Zielgenen gesucht, die unter den gewählten Bedingungen sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen auf eine Konfrontation mit Zigarettenrauch mit einer veränderten Expression reagieren und somit als Biomarker für eine Zigarettenrauchexposition geeignet sind.

Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase (Cyp) 18a1 hat bei *Drosophila* eine Funktion als am Katabolismus des Hormons 20-Hydroxyecdysol (20E) beteiligtes Enzym inne.<sup>121, 122</sup> Gemäß Proteinsequenzabgleich mittels der Internetpräsenz *flybase*<sup>1</sup> ist Cyp18a1 homolog zu humanen Cyp1a1. Bei diesem handelt es sich um ein metabolisch kompetentes Enzym.<sup>12</sup> Es ist bekannt, dass Cyp1a1 durch im Rauch befindliche, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH) induziert wird.<sup>12, 23, 25</sup> Aufgrund von Ähnlichkeiten der molekularen Struktur von PAH und steroidalen Hormonen wie 20E besteht die Möglichkeit, dass es sich bei PAH ebenfalls um Substrate von Cyp18a1

handeln könnte, weshalb *Cyp18a1* als spezifisches Zielgen für eine Zigarettenrauchexposition ausgewählt wurde.

Ein weiteres in dieser Arbeit als Marker ausgewähltes Gen ist *Hitzeschockprotein 70 kDa (hsp70)*. Hitzeschockproteine liegen hochkonserviert vor und werden vermehrt bei verschiedenen Reizen wie thermischen Stress, oxidativen Stress oder ionisierender Strahlung synthetisiert und fungieren als Chaperone.<sup>123</sup> Im Gegensatz zu *Cyp18a1* stellt *hsp70* daher einen universalen und unspezifischen Biomarker für eine Zigarettenrauchexposition dar.

Das Expressionsprofil Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponierter Larven wurde unmittelbar nach der jeweiligen Exposition sowie 30, 60 und 120 min nach Beendigung dieser analysiert. Dabei wies die *Cyp18a1*-Expression von ganzen Wildtyp-Larven bei männlichen und bei weiblichen Tieren ein vergleichbares Profil auf (Abb. 3.4 - links).

Bei männlichen Tieren wurde direkt nach der Zigarettenrauchexposition eine vermehrte Gentranskription von *Cyp18a1* um das 3,4-fache beobachtet verglichen mit Luft-exponierten Larven beobachtet. Nach 30 min wurde eine 2,6-fache Zunahme der Genexpression ermittelt, die anschließend auf eine 2,9-fach erhöhte Transkriptmenge 60 min nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition anstieg, jeweils in Relation zur Luftkontrolle. Während die Änderung der Expression zu diesen drei Zeitpunkten signifikant war in Bezug auf die Kontrolle, konnte 120 min nach Expositionsende im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrolltieren keine signifikant veränderte *Cyp18a1*-mRNA-Konzentration detektiert werden. Die Expression war 0,9-fach verändert und lag somit geringfügig unter dem Wert der Luft-exponierten Larven.

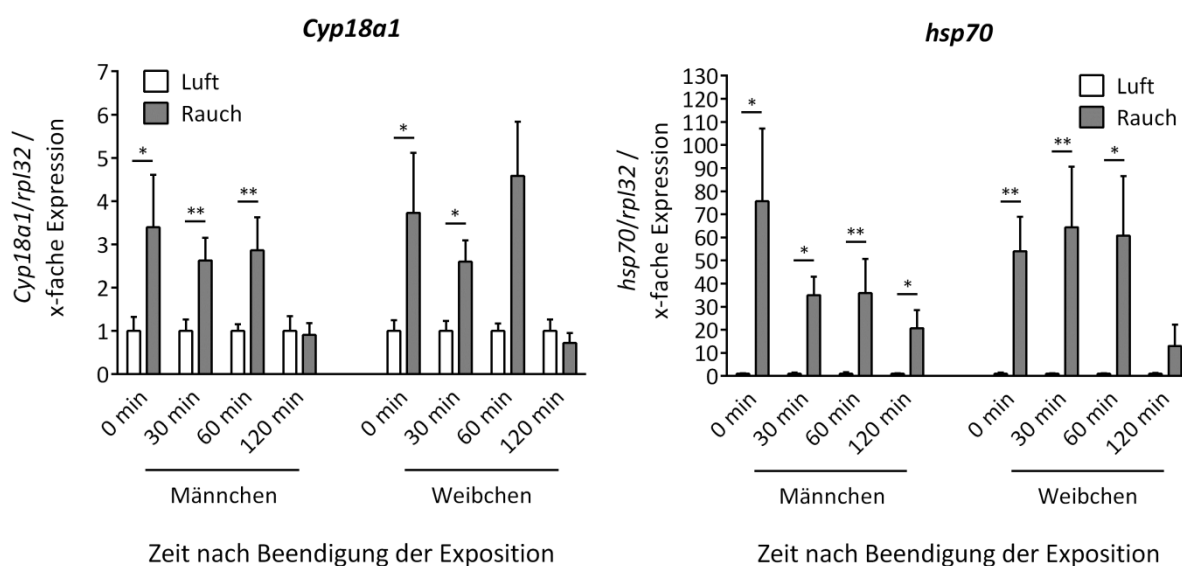
Die *Cyp18a1*-Expression bei weiblichen Tieren lag unmittelbar nach der Berauchung 3,7-fach und 30 min später 2,6-fach höher als bei den Kontrolltieren vor. Die maximale Erhöhung der Genexpression (4,6-fach) wurde 60 min nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition in Relation zur Kontrolle detektiert. Die Transkriptmenge war jedoch im Gegensatz zu den Zeitpunkten 0 min und 30 min nicht signifikant erhöht in Bezug auf die Luft-exponierten Larven. Vergleichbar mit den Männchen wurde 120 min nach Zigarettenrauchexpositionsende eine verminderte Expression (0,7-fach) des *Cyp18a1*-Gens der berauchten Tiere im Vergleich zu Luft-exponierten Larven detektiert.

Das Expressionsprofil des *hsp70*-Gens wies nach der Konfrontation der Larven mit Zigarettenrauch bei Männchen und Weibchen einen einheitlichen Verlauf auf (Abb. 3.4 - rechts).

Bei Männchen konnte für das Gen *hsp70* die stärkste Hochregulation direkt nach der Zigarettenrauchexposition beobachtet werden, wobei eine 75-fach erhöhte Transkriptmenge in Relation zur Luftkontrolle detektiert wurde. Im weiteren Verlauf (30 min und 60 min) sank die

Expression je auf das etwa 35-fache gegenüber dem Kontrollwert ab. 120 min nach Beendigung der Exposition wurde eine 20-fache Expressionszunahme im Vergleich zu Luft-exponierten Larven beobachtet. Zu sämtlichen Zeitpunkten wurden statistisch signifikante *hsp70*-Konzentrationen in Relation zur Kontrolle detektiert.

Im Vergleich zu den männlichen Larven wiesen die weiblichen Tiere eine stark erhöhte *hsp70*-Expression auf: Unmittelbar nach der Zigarettenrauchexposition konnte eine etwa 54-fache Erhöhung der Expression im Vergleich zur Luftkontrolle gemessen werden. Im späteren Verlauf, 30 min sowie 60 min nach Beendigung der Rauchprozedur, stieg diese auf das 65- bzw. 61-fache jeweils in Relation zur Kontrolle an. Zum zuletzt analysierten Zeitpunkt (120 min) war die Expression auf das 13-fache gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Dieser Zeitpunkt war im Gegensatz zu den anderen drei untersuchten Zeitpunkten nicht statistisch signifikant verglichen mit der jeweiligen Kontrolle.



**Abb. 3.4: Expression der Gene *Cyp18a1* und *hsp70* im zeitlichen Verlauf nach Zigarettenrauch bzw. Luftexposition.** Die Expression von *Cyp18a1* und *hsp70* wurde bei männlichen und weiblichen L3-Larven des Stammes Canton-S je nach 0, 30, 60, 120 min nach Beendigung der Exposition quantifiziert. Links: Expressionsprofil von *Cyp18a1* bei ganzen Larven. Die *Cyp18a1*-Expression stieg in beiden Geschlechtern bis zu 60 min nach Zigarettenrauchexpositionsende signifikant zur Kontrolle an und fiel nach 120 min unter den Wert der unbehandelten Tiere. Rechts: Expressionsprofil von *hsp70* bei ganzen Larven. Bei Männchen wurde bis zu 120 min, bei Weibchen bis zu 60 min nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition eine signifikante Erhöhung der *hsp70* Expression in Relation zur Kontrolle detektiert. Zur Normalisierung wurde jeweils das Haushaltsgen *rpl32* verwendet. n = 3 (zehn Larven je Messzeitpunkt). MW ± SEM. Statistik: einseitiger *ratio-paired* t-Test (Vergleich der Rauch- zur Luftexposition; jeweils pro Zeitpunkt und Geschlecht). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

### 3.2.3 Zigarettenrauch erhöht die Expression der Gene *Cyp18a1* und *hsp70* im larvalen Atemwegsepithel

Beim Menschen gelangt inhalierter Zigarettenrauch in die Lunge und interagiert dort primär mit dem Atemwegsepithel. Um zu verifizieren, dass im hier entwickelten *Drosophila*-Rauchmodell eine entsprechende Konfrontation des respiratorischen Epithels mit Zigarettenrauch stattfindet, wurde die Expression der Gene *Cyp18a1* und *hsp70* im Atemwegsepithel Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponierter Larven untersucht. Gleichzeitig zum Expressionsprofil der isolierten Atemwege wurde die Expression der Gene *Cyp18a1* und *hsp70* in der verbleibenden Larve nach der Entfernung der Tracheen ermittelt.

Die Expression des Gens *Cyp18a1* in den isolierten larvalen Atemwegen des Stamms Canton-S war infolge einer Exposition mit Zigarettenrauch um ein Vielfaches erhöht (Abb. 3.5 - oben). Im Epithel weiblicher und männlicher Larven wurden nahezu identische, im Vergleich zu Luft-exponierten Larven etwa fünffach erhöhte Expressionsspiegel detektiert. Diese war jeweils signifikant in Bezug auf die Luftkontrolle.

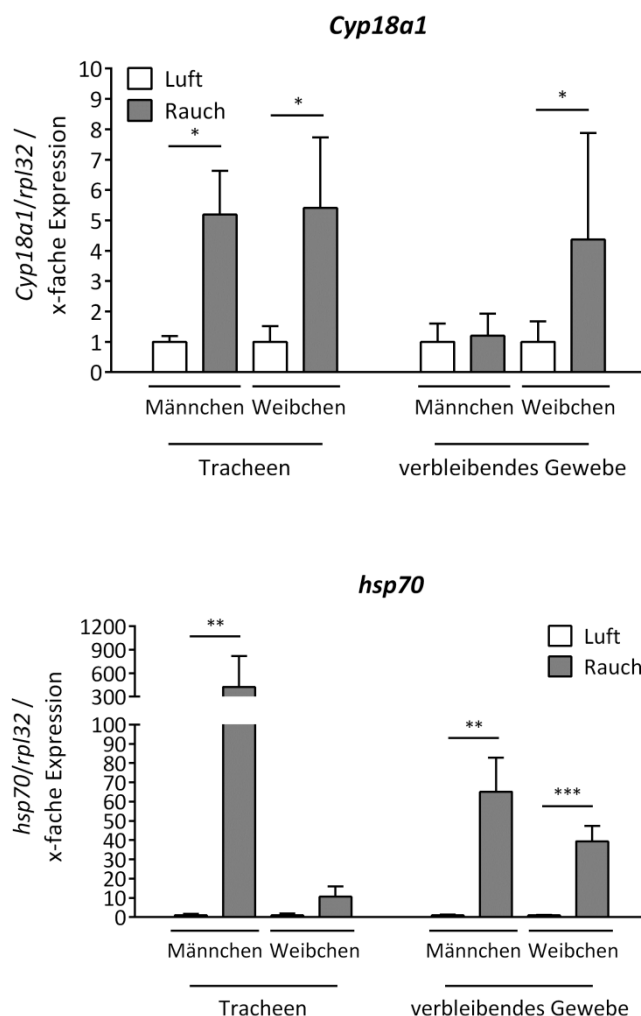
Im verbleibenden Homogenat berauchter Larven wurde hingegen ein deutlicher Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt. Während im Homogenat männlicher Larven keine statistisch signifikante Zunahme der *Cyp18a1*-Transkripte (1,2-fach) in Relation zur Kontrolle gemessen wurde, wies das Homogenat weiblicher Larven eine 4,3-fache Erhöhung der Genexpression mit hoher Varianz in Relation zum den nicht Zigarettenrauch-exponierten Larven auf. Diese Zunahme erwies sich als statistisch signifikant im Vergleich zur Luftkontrolle.

Für das Gen *hsp70* wurde ebenfalls das Expressionsniveau in den Atemwegen sowie im verbleibenden Homogenat von männlichen und weiblichen Larven überprüft (Abb. 3.5 - unten). Bezüglich der isolierten Tracheen wiesen die Männchen eine signifikante, 425-fache Zunahme von *hsp70*-Transkripten nach Zigarettenrauchexposition im Vergleich zur Luftkontrolle auf. Währenddessen war die Genexpression der weiblichen Larven mit einer zehnfachen Regulation in Bezug auf die Luftkontrolle weit weniger stark ausgeprägt. Die Zunahme der *hsp70*-Expression im Atemwegsepithel weiblicher Larven war nicht signifikant verändert im Vergleich zu mit Luft konfrontierten Larven.

Im Gegensatz zu *Cyp18a1* wurde im verbleibenden Larvenmaterial ebenfalls eine statistisch signifikante Regulation von *hsp70* in beiden Geschlechtern ermittelt. Bei den Zigarettenrauch-exponierten Männchen wurden höhere Transkriptmengen als bei Weibchen detektiert. Es wurde eine durchschnittlich 65-fache Zunahme der Genexpression im verbleibenden Homogenat männlicher Larven im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Die Expressionszunahme war damit niedriger



als in den isolierten Atemwegen männlicher Larven. Bei den Weibchen wurde eine 39-fache Erhöhung der *hsp70*-mRNA-Konzentration durch Zigarettenrauchexposition in Relation zur Kontrolle detektiert und überstieg die Expression von isolierten Tracheen aus weiblichen, mit Rauch exponierten Larven.



**Abb. 3.5: Expressionen der *Cyp18a1*- und *hsp70*-Transkripte in isolierten Tracheen und dem verbleibenden Homogenat von Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.** Nach Beendigung der Exposition wurden innerhalb eines Zeitfensters von 1,5 h die Atemwege aus *Drosophila*-Wildtyp-Larven isoliert und ebenso verbleibendes Larvenmaterial als Probe genommen. Die Genexpression von *Cyp18a1* und *hsp70* wurde mittels qRT-PCR analysiert. Das Haushaltsgen *rp32* diente jeweils zur Normalisierung der Expression. Oben: Die *Cyp18a1*-mRNA-Konzentration erhöhte sich in den isolierten Tracheen nach der Zigarettenrauchexposition in beiden Geschlechtern signifikant in Relation zur Kontrolle. Im verbleibenden Homogenat wurde nur bei den Weibchen eine signifikante Zunahme der Transkripte ermittelt. Unten: Die *hsp70*-mRNA-Konzentration wurde infolge einer Zigarettenrauchexposition in den isolierten Tracheen von beiden Geschlechtern auf signifikante Weise in Relation zur Kontrolle erhöht. Im verbleibenden Larvenmaterial wurde *hsp70* nur bei den Weibchen signifikant reguliert verglichen mit den unbehandelten Proben. MW  $\pm$  SEM. n = 3 (je Messzeitpunkt pro Versuch 21 - 69 Tracheen bzw. jeweils zehn verbleibende Larven). Statistik: einseitiger *ratio-paired* t-Test (Vergleich der Rauch- zur Luftexposition; jeweils pro Gewebe und Geschlecht). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

### 3.2.4 *Cyp18a1* und *hsp70* werden im gesamten Atemwegssystem von Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauchexposition exprimiert

Trotz funktioneller Analogie des Tracheensystems zur Lunge liegt ein wesentlicher Unterschied in der Aufnahme und der Verteilung der Luft im Organ vor: In Säugern geschieht die Distribution durch Muskelkontraktionen im Zuge der Atmung, während bei Invertebraten unter Ruhebedingungen die Ventilation vor allem durch die Öffnung der Stigmen kontrolliert wird und weitestgehend von der Diffusion abhängig ist. Doch auch Muskelkontraktionen können anteilig zur Verteilung der Luft im Organismus beitragen.<sup>90</sup> Aufgrund dessen stellt sich die Frage über die Reichweite von Zigarettenrauch in den Atemwegstrakt von *Drosophila*-Larven hinein.

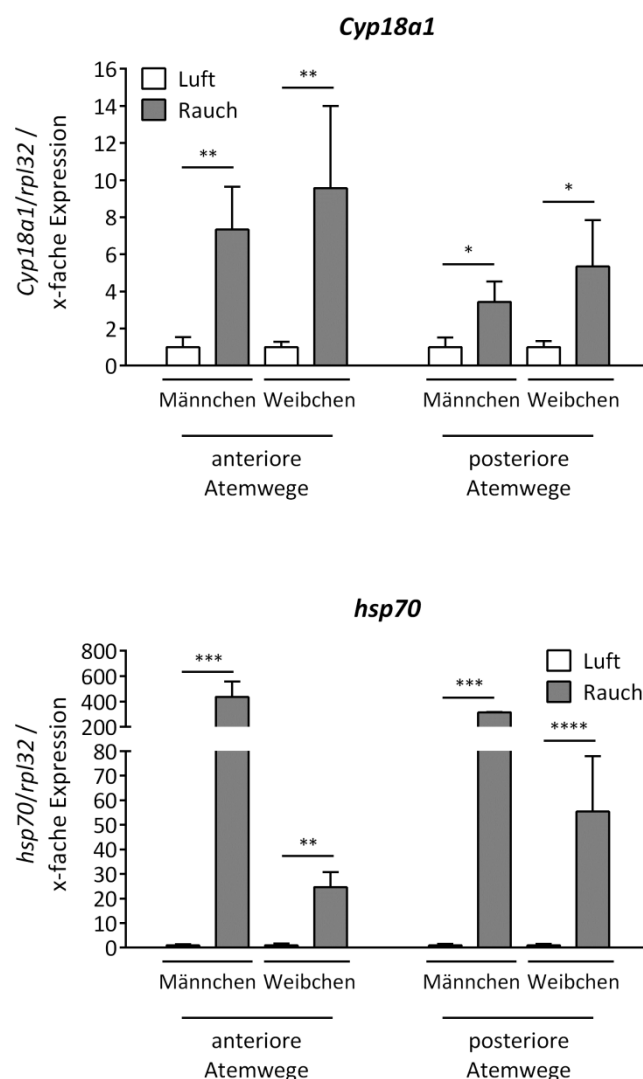
Um zu analysieren, wie weit der Zigarettenrauch in die larvalen Tracheen eindringt, wurden die Tracheen von Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauchexposition isoliert und diese zusätzlich zwischen der vierten und fünften primären Abzweigung entzwei geteilt und individuell untersucht. Wie zuvor wurde die Expression von *Cyp18a1* und *hsp70* gemessen.

Im Falle von *Cyp18a1* wurde festgestellt, dass bei beiden Geschlechtern im anterioren Teil der Tracheen eine stärkere Regulation als in den posterioren Tracheen stattfand. Im anterioren Bereich des Tracheenstrangs wurde bei Männchen im Mittel eine signifikante, 7,3-fache Zunahme von *Cyp18a1* detektiert in Relation zur Kontrolle, während das Gen posterior 3,4-fach signifikant reguliert wurde im Vergleich zu Luft-exponierten Larven.

Bei Weibchen wurde die *Cyp18a1*-Expression der anterioren Tracheen nach Zigarettenrauchexposition 9,5-fach auf signifikante Weise erhöht in Relation zur Luftkontrollgruppe, während in den posterioren Atemwegen eine 5,3-fache Rauch-induzierte Zunahme im Vergleich zu Luft-exponierten Larven ermittelt wurde. Diese erwies sich als statistisch signifikant in Bezug auf die Kontrolle (Abb. 3.6 - oben).

*hsp70* wurde in den anterioren Atemwegen von männlichen Larven nach Zigarettenrauchexposition 437-fach signifikant stärker exprimiert verglichen mit der Kontrolle. Auch im posterioren Bereich konnten signifikant erhöhte *hsp70*-Transkriptmengen detektiert werden, wobei eine 315-fache Expressionszunahme in Relation zur Luftgruppe ermittelt wurde.

Die *hsp70*-Transkriptmenge im vorderen Tracheenbereich weiblicher Larven waren infolge einer Zigarettenrauchexposition um das 24-fache signifikant erhöht im Vergleich zur Luftkontrolle, während in den posterioren Tracheen eine in Bezug auf die Luft-exponierten Proben 55-fache Induktion der Genexpression beobachtet wurde. Diese liegt damit im Gegensatz zu den Männchen höher als im anterioren Bereich und erwies sich in Bezug auf die Luftkontrolle als statistisch signifikant (Abb. 3.6 - unten).



**Abb. 3.6:** *Cyp18a1*- sowie *hsp70*-Expression in anterioren und posterioren Tracheen von Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition. Nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition wurden die Tracheen innerhalb von 1,5 h isoliert, zwischen dem vierten und fünften primären Ast manuell geteilt und die Genexpression mittels qRT-PCR analysiert. Das Haushaltsgen *rpl32* diente jeweils der Normalisierung. Oben: Bei *Cyp18a1* konnte nach Zigarettenrauchexposition im Vergleich zur Kontrolle im anterioren Bereich eine siebenfache Zunahme bei den Männchen bzw. eine neunfache Hochregulation bei den Weibchen beobachtet werden. Währenddessen wurden die Transkriptmengen posterior etwa halb so hoch bei beiden Geschlechtern detektiert. Unten: *hsp70*-mRNA wurden nach Zigarettenrauchexposition bei den Männchen in beiden Bereichen in vergleichbaren Konzentrationen in Bezug auf die jeweilige Luftkontrolle detektiert. Bei den Weibchen hingegen wurde in anterioren Tracheen weniger Transkripte als im posterioren Bereich detektiert. MW  $\pm$  SEM. n = 4 (pro Versuch 18 - 40 Tracheen). Statistik: einseitiger *ratio-paired* t-Test (Vergleich der Rauch- zur Luftexposition; jeweils pro Bereich und Geschlecht). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

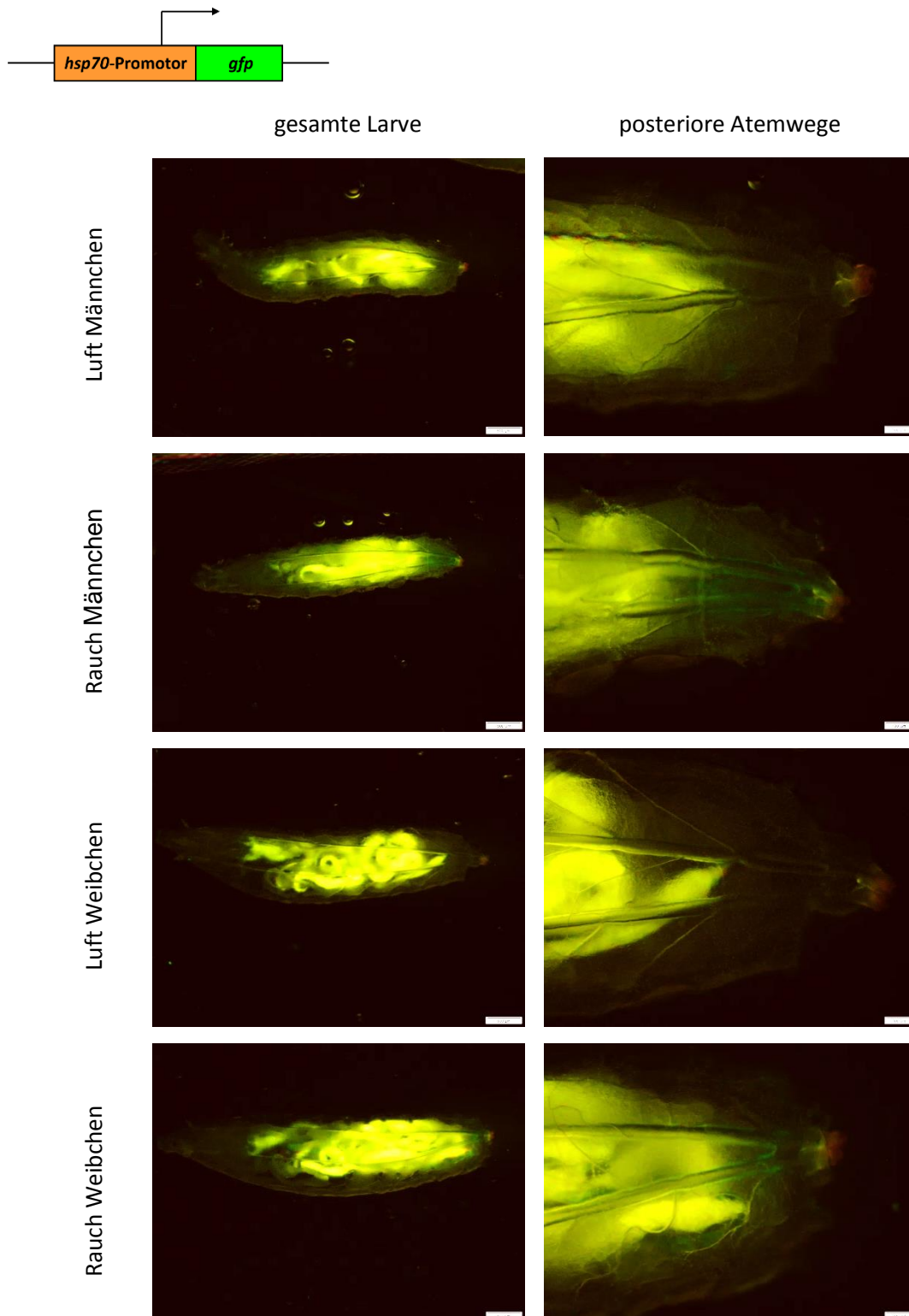
### **3.2.5 GFP wird nach Zigarettenrauchexposition *in vivo* im posterioren Tracheensystem der transgenen Reporterlinie *hsp70*-GFP synthetisiert**

Für eine Visualisierung der Antwort des Atemwegtraktes auf die Zigarettenrauchexposition wurde die *Drosophila*-Reporterlinie *hsp70*-GFP zu Rate gezogen. Bei diesem transgenen Stamm wurde das für grün-fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) kodierende Gen aus der Meduse *Aequorea victoria* in mehreren Kopien hinter die Promotorsequenz von *hsp70* gefügt, sodass GFP unter der transkriptionellen Kontrolle von *hsp70* steht.<sup>31</sup> Infolge des Einleitens der Synthese von GFP über die Aktivierung von *hsp70* erlaubt dieses Konstrukt eine indirekte Visualisierung der Zigarettenrauch-induzierten *hsp70*-Transkription über die von GFP ausgehende Fluoreszenz.

Für diese Versuchsreihe wurden Larven des transgenen Reporterstamms *hsp70*-GFP mit Zigarettenrauch exponiert und 24 h später *in vivo* mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 3.7).

Ganze männliche und weibliche Larven, die als Kontrolle Luft ausgesetzt wurden, wiesen nach Behandlung kein oder ein nur ein wenig intensives GFP-Fluoreszenzsignal auf, welches, sofern vorhanden, im Fettkörper detektiert wurde.

Bei der Untersuchung von Zigarettenrauch-exponierten Larven hinsichtlich ihres GFP-Signals wurde bei Fokussierung auf das larvale Respirationssystem im posterioren Tracheenbereich eine erhöhte Fluoreszenzintensität beobachtet. Die von GFP ausgehende Fluoreszenz wurde von den posterioren Stigmen entlang der Dorsalstränge bis mindestens zum zweiten Primärast detektiert. Dies konnte bei Männchen und bei Weibchen gleichermaßen beobachtet werden, wobei die posterioren Tracheenstränge männlicher, Zigarettenrauch-exponierter Larven eine stärkere GFP-Fluoreszenz als die Weibchen vorwiesen. Wie zuvor bei den Kontrollen wurde in anderen Organen kein oder nur ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert. Ein Signal wurde, sofern beobachtet, vermehrt bei weiblichen Tieren gefunden und betraf vorwiegend im Bereich des Pharynx der Larven. Jedoch war GFP auch partiell im Fettkörper detektierbar.

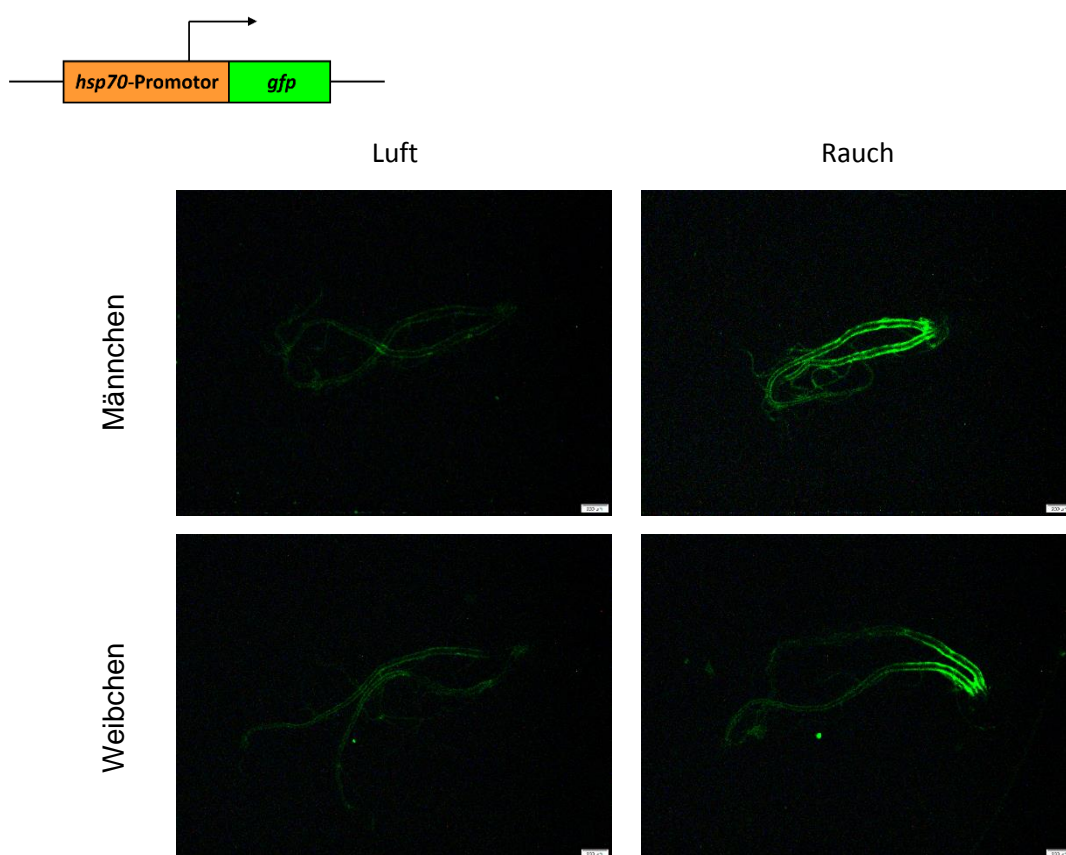


**Abb. 3.7:** *In vivo*-fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transgenen *hsp70*-GFP-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition. 24 h nach Exposition wurden Larven geschlechtsselektiert voneinander sediert und mikroskopiert. Während die Lufttiere nur wenig GFP synthetisierten, wurde bei Zigarettenrauch-exponierten Larven vorwiegend im posterior gelegenen Atemwegstrakt eine verstärkte GFP-Fluoreszenzintensität detektiert. Der Messbalken entspricht einer Länge von 500  $\mu\text{m}$  (ganze Larve) bzw. 100  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung der posterioren Atemwege). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von  $n = 10 - 13$  Larven.

### 3.2.6 Zigarettenrauch führt zu einer Erhöhung des GFP-Signals in den Atemwegen der transgenen Reporterlinie *hsp70*-GFP

Weiterhin wurde beim transgenen Reporterstamm *hsp70*-GFP die GFP-Fluoreszenzintensität im gesamten Respirationssystem qualitativ ermittelt. Dazu wurden die Atemwege nach Zigarettenrauchexposition isoliert und *ex vivo* fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 3.8).

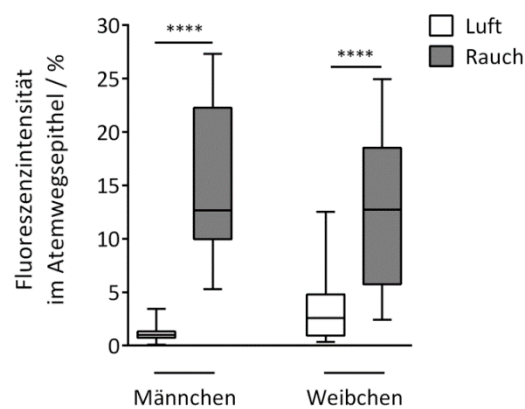
Die Bildgebung zeigte, dass von den Tracheen unbehandelter Tiere nur eine geringe Fluoreszenzintensität ausging. Bei den weiblichen Kontrollen wurde ein intensiveres GFP-Signal detektiert als bei Luft-exponierten Männchen, jedoch zeigten die einzelnen Tracheen der Weibchen eine größere Streuung. Im Zuge einer Konfrontation mit Zigarettenrauch wies vorwiegend der posteriore Bereich der Atemwege ein erhöhtes, von GFP ausgehendes Fluoreszenzsignal auf. Doch auch eine erhöhte Intensität von GFP in den anterior gelegenen Bereichen war vor allem bei den Tracheen männlicher Larven zu verzeichnen. Bei Weibchen hingegen trat diese eher marginal auf.



**Abb. 3.8:** *Ex vivo*-fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen isolierter Atemwegsstränge von transgenen *hsp70*-GFP-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition. 24 h nach der Behandlung mit Zigarettenrauch bzw. Luft wurden die Atemwege isoliert und hinsichtlich der GFP-Fluoreszenz untersucht. Während bei Kontrolltieren ein GFP-Signal von geringer Intensität beobachtet wurde, wurde bei Zigarettenrauch-exponierten Larven vorwiegend im posterioren Teil der Tracheen GFP detektiert. Der Messbalken entspricht einer Länge von 200 µm. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von n = 16 Larven.

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der isolierten Tracheen wurde eine Quantifizierung der GFP-Intensität in den gesamten Atemwegen durchgeführt (Abb. 3.9). Dabei erfolgte eine Normalisierung der von GFP ausgehenden Fluoreszenz auf die Hintergrundfluoreszenz der Bildaufnahme.

Nach Zigarettenrauchexposition nahm bei den männlichen Larven die prozentuale Fluoreszenz um den Faktor 13,5 auf 14,8 % signifikant in Bezug auf die detektierte Fluoreszenzintensität der Luft-exponierten Larven (1,1 %) zu. Bei den Weibchen wurde allgemein ein etwas stärkeres, basales GFP-Signal detektiert (3,4 %), jedoch variierte die GFP-Intensität zwischen den einzelnen Individuen stärker als es bei den männlichen Kontrolllarven der Fall war. Nach Zigarettenrauchexposition war in den Tracheen weiblicher Larven eine signifikante, 3,7-fache Zunahme der GFP-Fluoreszenz auf eine 12,5 %ige Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollen zu beobachten. Damit wurde der visuelle Eindruck (Abb. 3.8) durch die Quantifizierung bestätigt.



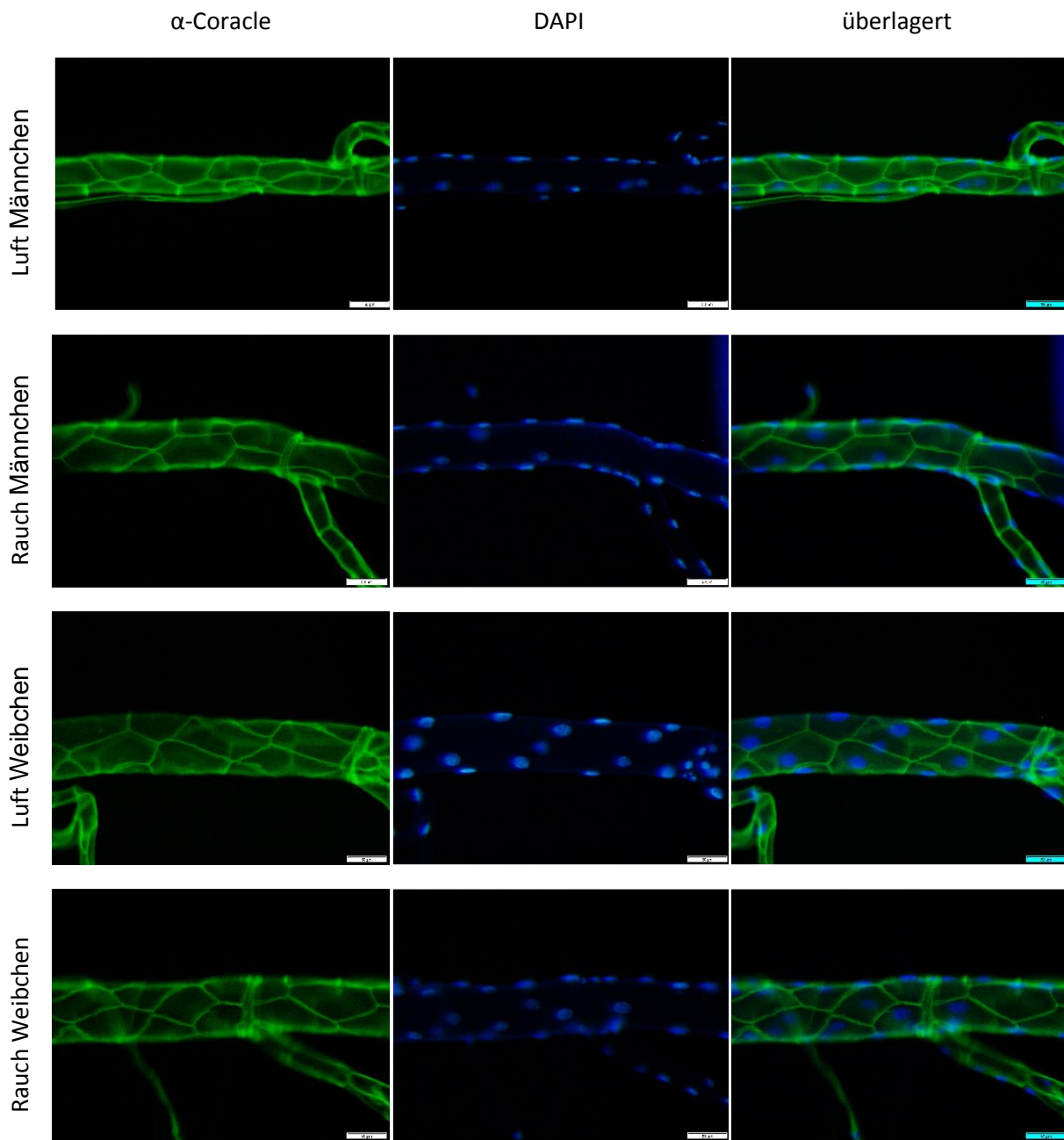
**Abb. 3.9: Fluoreszenzquantifizierung der isolierten Tracheen von Larven der transgenen Reporterlinie *hsp70*-GFP nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.** Larven der transgenen Reporterlinie *hsp70*-GFP wurden Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponiert. Nach 22 - 30 h wurde anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Atemwege die Fluoreszenzintensität von GFP quantifiziert. Die GFP-Signalintensität der Atemwege wurde bei jeder Probe auf die Hintergrundfluoreszenz bezogen. Im Vergleich zu den jeweiligen Luftkontrolltieren wurde in beiden Geschlechtern ein signifikant erhöhtes GFP-Signal detektiert. Median  $\pm$  Min./Max.. n = 16. Statistik: einseitiger, ungepaarter t-Test (Vergleich der Rauch- zur Luftexposition; jeweils pro Geschlecht). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

### **3.2.7 Die Zellintegrität der Atemwege wird durch eine Zigarettenrauchexposition bei Wildtyp-Larven nicht beeinflusst**

Das Protein Coracle (Cora) ist als Komponente der *Septate Junctions* für die transepitheliale Diffusionsbarriere zuständig.<sup>124</sup> Ein Verlust von Cora hat zur Folge, dass die Integrität der Epithelzellen verloren geht und somit ein permeables System entsteht, das durchlässig für beispielsweise die Hämolymphe ist.<sup>125, 126</sup> Auch von der Exposition mit Tabakrauch ist bekannt, die Integrität der Epithelzellen im Menschen zu mindern.<sup>52, 58, 127</sup> Gene, die mit der Zellintegrität assoziiert werden, konnten auch mittels der Transkriptomanalyse in Zigarettenrauch-exponierten Atemwegen weiblicher Larven dysreguliert vorgefunden werden (s. Abb. 3.14).

Mit Hilfe des Rauchmodells wurde untersucht, ob eine erhöhte Permeabilität nach Exposition mit Zigarettenrauch in den Tracheen der Larven festzustellen ist. Tracheen geraucher Larven wurden isoliert und mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung wurden die *Septate Junctions* qualitativ analysiert. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte keine Unterschiede zwischen der Morphologie der Tracheen geraucher Tiere und den Atemwegen entsprechender Kontrolltiere sowohl bei männlichen als auch weiblichen Larven (Abb. 3.10) auf.





**Abb. 3.10: Immunfluoreszenzfärbung der Atemwege von Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponierten Wildtyp-Larven.** Die Tracheen wurden unmittelbar nach Exposition mit DAPI-Dihydrochlorid sowie mittels einen gegen Cora gerichteten Antikörper inkubiert und abschließend die Fluoreszenz dokumentiert. Es wurde keine Veränderung der Integrität des Atemwegsepithels infolge einer Exposition mit Zigarettenrauch beobachtet. Der Messbalken entspricht einer Länge von 50  $\mu$ m. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von n = 5 - 8 Larven.

### 3.2.8 Transkriptomanalyse

#### 3.2.8.1 Die Transkriptomprofile sind zwischen den einzelnen biologischen Replikaten miteinander vergleichbar

Um einen Überblick zu erhalten, welche Gene infolge einer Zigarettenrauchexposition differentiell im Respirationstrakt der *Drosophila*-Larven reguliert wurden, wurden Tracheen von Wildtyp-Larven nach Beendigung der Rauchexposition isoliert und einer RNA-Sequenzanalyse unterzogen. Die Genexpression der Rauchexpositionsgruppe wurde jeweils auf die der korrespondierenden Kontrolle normalisiert.

Insgesamt wurden in den Atemwegen männlicher Larven 1 271 durch Zigarettenrauch differentiell regulierte Gene detektiert, von denen 399 hoch- und 872 herabreguliert waren. In den Tracheen isoliert aus den weiblichen Larven wurden insgesamt 1 100 nach Exposition mit Zigarettenrauch dysregulierte Gene gefunden, von denen 620 Gene vermehrt und 480 Gene vermindert exprimiert wurden.

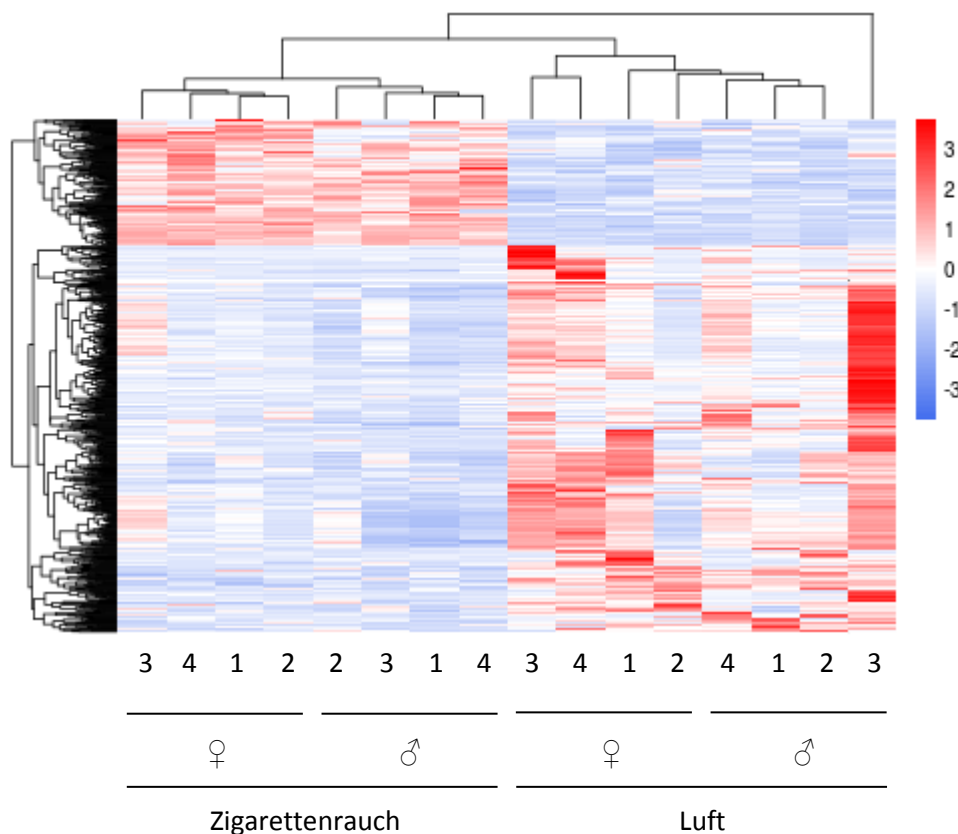
Beim Vergleich der beiden Geschlechter unterschieden sich zunächst die Anzahl der regulierten Gene voneinander, hier lagen bei den Männchen 171 mehr Gene dysreguliert als bei den Weibchen vor. Gleichzeitig wurden bei den Männchen mehr Gene de- und weniger Gene hochreguliert im Vergleich zum Transkriptom Zigarettenrauch-exponierter, weiblicher Larven.

Die erhaltenen Transkriptomprofile der einzelnen biologischen Replikate männlicher und weiblicher Tracheen wurden dann jeweils im Zuge einer hierarchischen Clusteranalyse in Form einer *Heatmap* visualisiert (Abb. 3.11). Mit dieser werden die Transkriptomprofile der einzelnen Replikate durch einen Farbcode miteinander verglichen. Dies erlaubt einen Rückschluss darauf, ob die Regulationsrichtung und -stärke in den einzelnen Proben miteinander vergleichbar ist.

Die einzelnen Replikate Zigarettenrauch-exponierter Larven wiesen bei beiden Geschlechtern ein *per se* konsistentes Expressionsprofil auf. Jedoch wurden im 3. Replikat der männlichen, mit Zigarettenrauch exponierten Tiere vermehrt hochregulierte Gene detektiert, während in den anderen Replikaten eher eine Herabregulation beobachtet wurde.

Bei Luft-exponierten männlichen wie weiblichen Larven zeigte sich eine größere Varianz im Transkriptom zwischen den einzelnen Replikaten. Bei den Weibchen wurde bei den Replikaten 3 und 4 viele Gene stärker hochreguliert als bei Replikat 1. Hinsichtlich Replikat 2 wurde eine verstärkte Herabregulation von Genen im Vergleich zu den anderen Replikaten detektiert. Bei den Männchen wurde bei den Replikaten 1 und 2 ein vergleichbares Transkriptomprofil beobachtet. In Relation zu diesen wurden vermehrt Gene mit einer stärkeren Genexpression bei Replikat 4 gemessen. Besonders Replikat 3 der männlichen Luftkontrollgruppe unterschied sich in seinem Transkriptom-

profil stärker von den übrigen drei biologischen Replikaten, da hier viele Gentranskripte stark vermehrt detektiert wurden als bei anderen. Dieses wurde auch von der Auswertungssoftware als eine unabhängige Gruppe klassifiziert. Es stellte sich daher die Frage, ob die einzelnen biologischen Replikate miteinander vergleichbar waren.



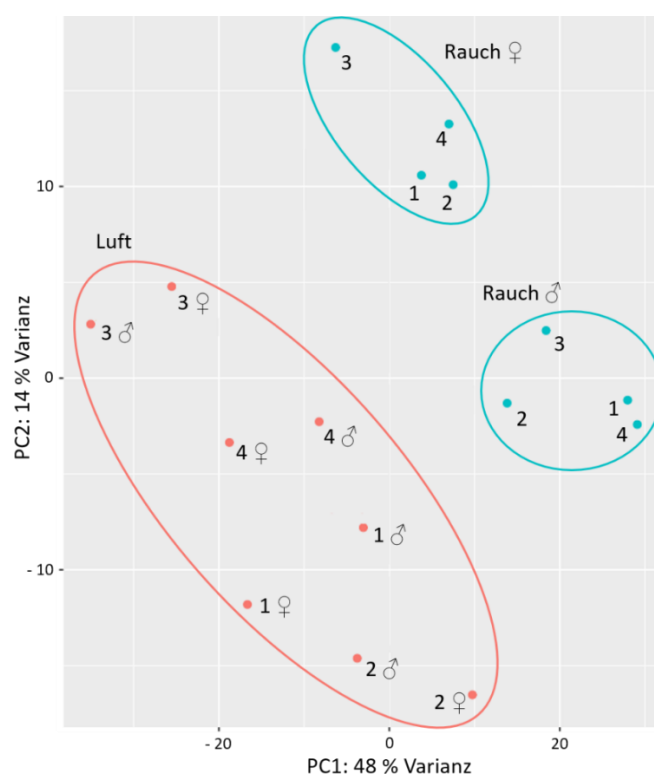
**Abb. 3.11:** Grafische Darstellung der hierarchischen Clusteranalyse in Form einer *Heatmap* von regulierten Genen männlicher bzw. weiblicher Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition. Die *Heatmap* zeigt alle in der RNA-Sequenzierung detektierten Gene in Tracheen isoliert aus männlichen bzw. weiblichen L3-Larven des Stamms Canton-S nach Zigarettenrauch- oder Luftexposition. Rote Balken zeigen hochregulierte Gene an. Die Farbintensität korreliert dabei mit der Höhe der log<sub>2</sub>-fachen Veränderung des Gens in Bezug auf die Referenz. Blaue Balken stellen deregulierte Gene nach Zigarettenrauchexposition im Vergleich zur Luftkontrolle an, wobei eine Farbintensität mit der Deregulation des jeweiligen Gens korreliert. Die biologischen Replikate sind mit arabischen Ziffern gekennzeichnet. n = 4.

Um zu untersuchen, ob die einzelnen Replikate ein homogenes Transkriptomprofil aufwiesen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) zu Rate gezogen.

Die PCA dient zur vereinfachten Darstellung komplexer Zusammenhänge und kann dazu genutzt werden die Vergleichbarkeit von Replikaten darzustellen. Diese äußert sich innerhalb eines PCA-Diagramms durch eine Gruppierung von Daten; potentielle Ausreißer können dadurch identifiziert

werden, da sie außerhalb dieser Gruppe anzutreffen sind. Diese Analyse wurde ebenfalls im Rahmen der Transkriptomanalyse durchgeführt.

In dem in Abb. 3.12 dargestellten PCA-Diagramm zeigte sich, dass die einzelnen Replikate der Kontrollgruppe in beiden Geschlechtern weniger gruppiert, sondern in der Darstellung verstreut, auftraten. Dies deutete auf eine gewisse Variabilität der Transkriptome zwischen den einzelnen Replikaten untereinander hin, wie sie auch zuvor durch die *Heatmap* gezeigt wurde. Beim Vergleich der Datenpunkte zwischen männlichen und weiblichen Kontrollen innerhalb eines biologischen Replikats (zum Beispiel Luft 1 ♂ und Luft 1 ♀ usw.) wurde je eine ähnliche Anordnung innerhalb des Diagramms beobachtet. Dies implizierte vergleichbare Expressionsprofile innerhalb eines Replikates und somit eines Versuchs ohne das Vorliegen von Ausreißern. Die Datenpunkte, die aus den gerauchten Tracheen erhalten wurden, gruppieren sich jedoch deutlich in Abhängigkeit vom Geschlecht und waren homogen zwischen den Replikaten 1 - 4 verteilt. Dies zeigte, dass die Transkriptomdaten der einzelnen Replikate miteinander vergleichbar waren und sich nach Zigarettenrauchexposition geschlechterabhängig voneinander unterschieden.



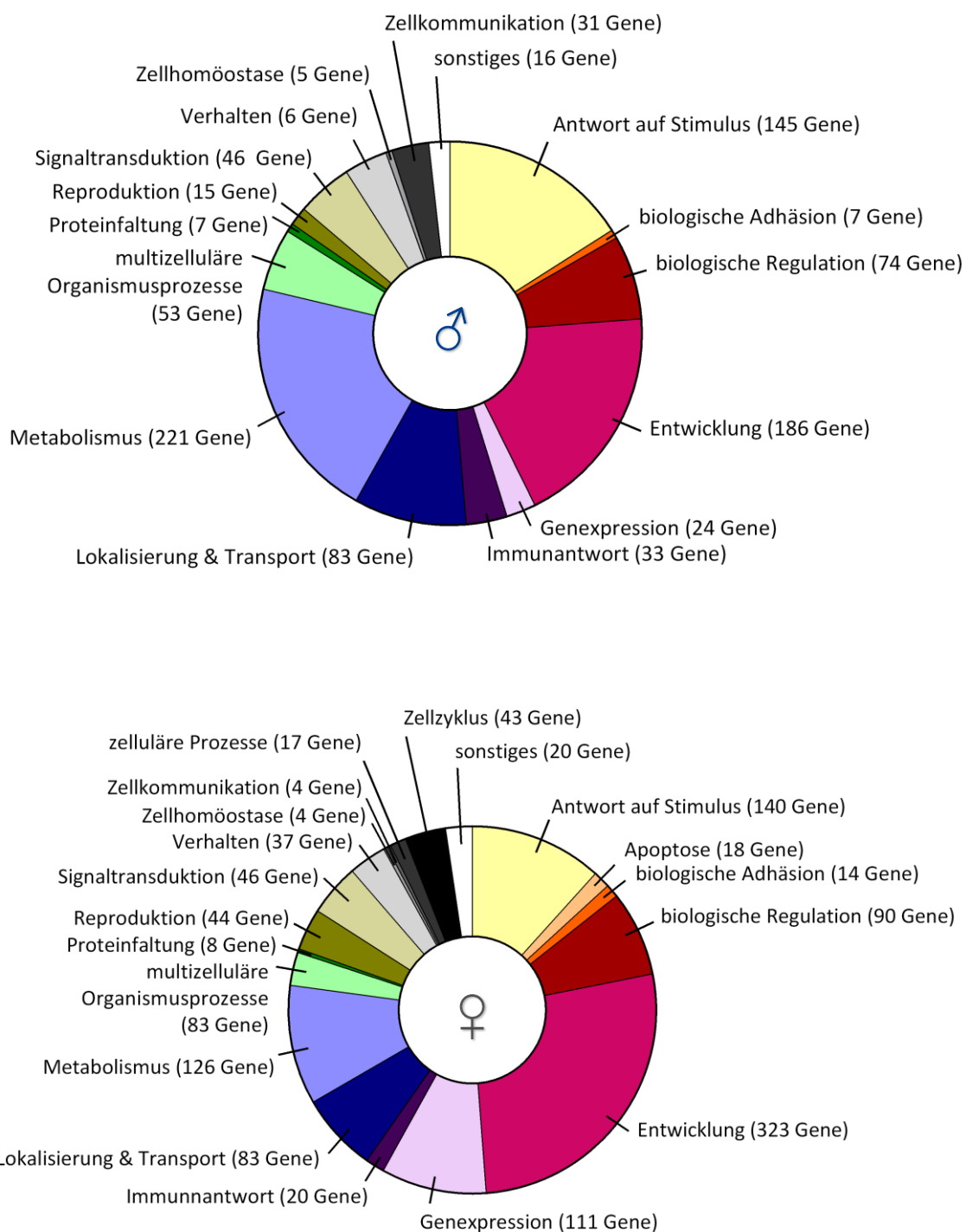
**Abb. 3.12: PCA-Diagramm des Tracheentranskriptoms männlicher und weiblicher Tracheen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.** Tracheen von männlichen und weiblichen Wildtyp-Larven wurden nach Rauch- bzw. Luftexposition isoliert. Im Zuge der RNA-Sequenzierung wurde eine PCA durchgeführt. Die Datenpunkte im Diagramm repräsentieren die einzelnen Komponenten der biologischen Replikate 1 – 4 der untersuchten Gruppen Luft ♂, Rauch ♂, Luft ♀, Rauch ♀. Das PCA-Diagramm zeigte eine wenig zentrierte Gruppierung in der Kontrollgruppe in beiden Geschlechtern (orange). Dahingegen wurde eine geschlechterspezifische Anordnung der einzelnen Zigarettenrauch-exponierten Replikate beobachtet (grün). n = 4.

### **3.2.8.2 Mittels der Transkriptomanalyse werden mit dem Xenobiotikametabolismus, der Entwicklung und der Immunantwort assoziierte Gene nach Zigarettenrauchexposition reguliert vorgefunden**

Zur Identifizierung der durch Zigarettenrauch regulierten biologischen Prozesse in den Tracheen wurde das *online* frei verfügbare DAVID-Programmpaket<sup>102, 103</sup> verwendet. Dieses stellt aufgrund der eingespeisten Gene Funktionsbeziehungen zu biologischen Prozessen her, die in Form von Genontologie (GO)-Termen ausgegeben werden. Das Programm kalkuliert die statistische Signifikanz, mit der ein jeweiliger GO-Term im Vergleich zu einer Referenz reguliert wird und gibt die Anzahl sämtlicher zugeordneter, hoch- wie auch deregulierten Gene an. Die im Vergleich zur Kontrolle signifikant veränderten GO-Terme wurden anschließend eigens in allgemeinere Funktionskategorien (Eltern-Terme) eingeordnet. Die grafische Darstellung der nach Zigarettenrauchexposition veränderten GO-Terme ist in Abb. 3.13 zu sehen.

In diesen Kreisdiagrammen ist gezeigt, dass tracheale Gene, die eine Dysregulation infolge einer Zigarettenrauchexposition erfahren haben, sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen den gleichen Prozessen zugeordnet werden konnten. Dabei wurden Gene am häufigsten den biologischen Prozessen „Entwicklung“ und „Metabolismus“ zugeordnet. Aber auch andere Einordnungen konnten gefunden werden wie die „Antwort auf Stimulus“, dem unter anderem der Xenobiotikametabolismus zugeordnet wird, sowie „Signaltransduktion“, „Proteinfaltung“, „Reproduktion“ und „Genexpression“. Gene konnten auch mit den biologischen Prozessen „Immunantwort“, „biologische Regulation“ und „biologische Adhäsion“ in Verbindung gebracht werden. Bei den Weibchen wurden zwei weitere Klassifizierungen gefunden: Hier konnten regulierte Gene mit den biologischen Prozessen „Apoptose“ und „Zellzyklus“ assoziiert werden.

Während bei den Männchen dem biologischen Prozess „Metabolismus“ die meisten Gene zugeordnet wurden, stellte dies bei den Weibchen hingegen der Prozess „Entwicklung“ dar.

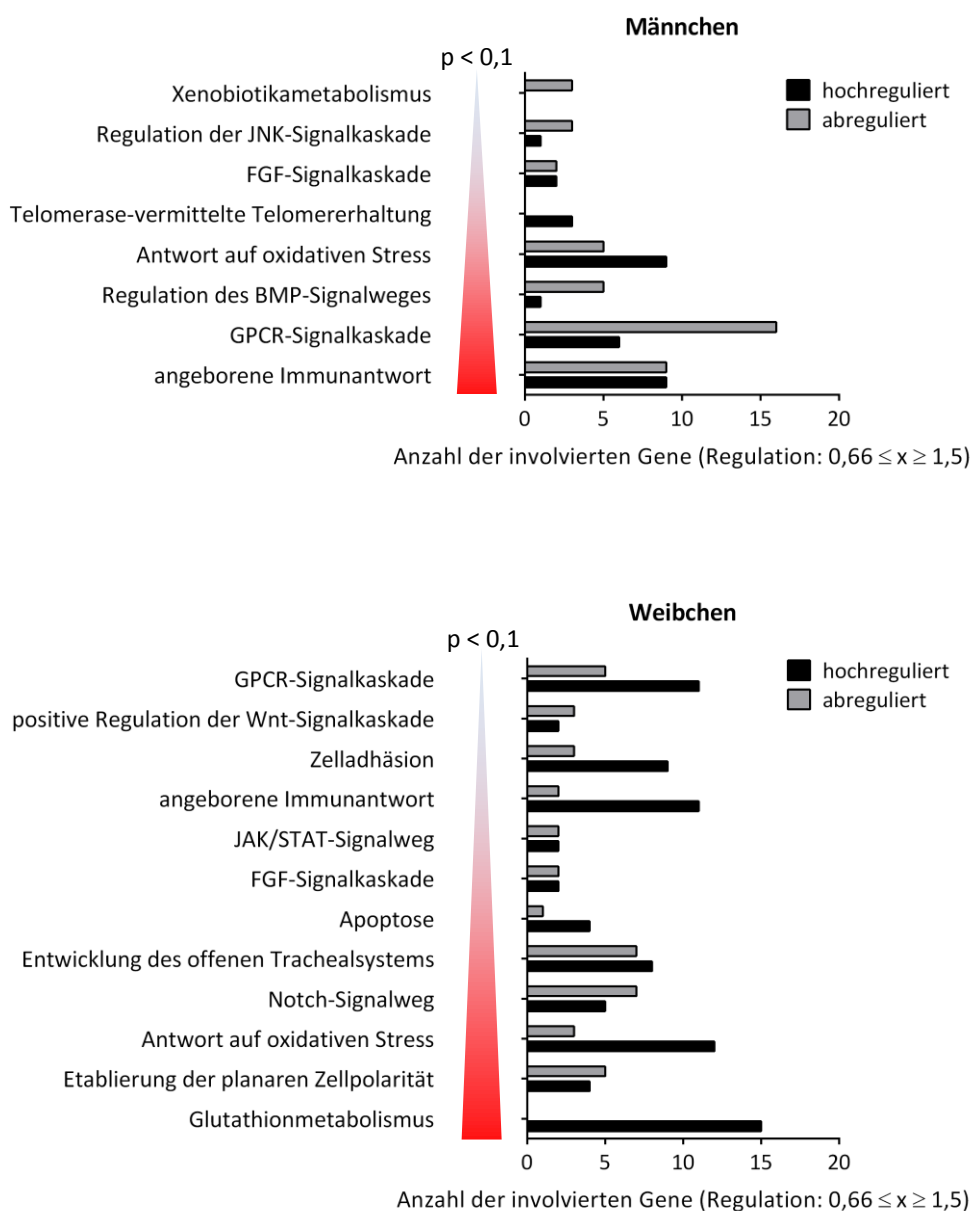


**Abb. 3.13: Kreisdiagramme von verallgemeinerten biologischen Prozessen, die infolge einer Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition in männlichen (oben) bzw. weiblichen (unten) Tracheen reguliert sind.** Das Atemwegsepithel wurde aus Wildtyp-Laven nach Zigarettenrauch bzw. Luftexposition isoliert und das Transkriptom mittels RNA-Sequenzierung identifiziert. Signifikant regulierte Gene (statistisch signifikante Regulation  $0,66 \leq x \leq 1,5$ ;  $FDR < 0,05$ ) wurden mittels der DAVID-Programmpakets<sup>102, 103</sup> analysiert. Die signifikant veränderten GO-Terme wurden manuell in allgemeinere Funktionsbeziehungen zusammengefasst (Doppelzuordnungen möglich,  $p < 0,1$ ). Viele Gene wurden mit der Entwicklung und dem Metabolismus assoziiert.  $n = 4$ .

Für die weitere Betrachtung der einzelnen, von dem Programmpaket DAVID<sup>102, 103</sup> durch eine Zigarettenrauchexposition als dysreguliert klassifizierte biologische Prozesse der männlichen und weiblichen larvalen Tracheen wurden diejenigen herausgesucht, die in einem potentiellen Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen wie *Asthma bronchiale* und COPD und/oder einer Zigarettenrauchexposition stehen. Diese und deren Anzahl von der Software assoziierten, hoch- und herabregulierten Gene sind in Abb. 3.14 dargestellt.

In den Atemwegen männlicher Larven konnten acht Prozesse identifiziert werden, die nach Zigarettenrauchexposition verändert waren (Abb. 3.14 - oben). Dazu gehörten der „Xenobiotikametabolismus“ sowie die „Regulation der C-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalkaskade“. Außerdem wurden dysregulierte Gene mit dem „Fibroblastenwachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF)-Signalweg“, der „Telomerase-vermittelte(n) Telomererhaltung“, der „Antwort auf oxidativen Stress“ und der „Regulation des Knochenmorphogenetischen Protein (*bone morphogenetic protein*, BMP)-Signalwegs“ assoziiert. Die „G-Protein gekoppelte Rezeptor (*G-protein coupled receptor*, GPCR-Signalgebung“ sowie die „angeborene Immunantwort“ waren am stärksten durch die Zigarettenrauchexposition in männlichen Atemwegen moduliert.

Das Transkriptomprofil der Atemwege Zigarettenrauch-exponierter Weibchen zeigte 14 dysregulierte Prozesse im Vergleich zur Luftkontrolle (Abb. 3.14 - unten). Neben den bereits bei den Männchen erwähnten Prozessen wurden zusätzlich die „positive Regulation der Wnt-Signalkaskade“, die „Zelladhäsion“, die „Apoptose“, der „Notch-Signalweg“, die „Entwicklung des offenen Trachealsystems“ sowie die „Etablierung der planaren Zellpolarität“ verändert vorgefunden. Am stärksten waren Gene durch Zigarettenrauch reguliert worden, die mit dem Prozess „Glutathionmetabolismus“ in Zusammenhang stehen. Im Gegensatz zu den Männchen wurde eine Zigarettenrauchexposition nicht mit der „Regulation der BMP-Signalkaskade“ wie bei den Weibchen in Verbindung gebracht.



**Abb. 3.14: Ausgewählte, regulierte biologische Prozesse im Atemwegsepithel von männlichen und weiblichen *Drosophila*-Larven infolge einer Zigarettenrauchexposition im Vergleich zu Luft-exponierten Tieren, die im potentiellen Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen oder einer Konfrontation mit Zigarettenrauch stehen.** Tracheen von männlichen und weiblichen *Drosophila*-Larven wurden nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition isoliert und das Tracheentranskriptom mittels einer RNA-Sequenzierung analysiert. Differenziell regulierte Gene (statistisch signifikante Regulation  $0,66 \leq x \leq 1,5$ ; FDR  $< 0,05$ ) wurde in die frei verfügbare Software DAVID<sup>102, 103</sup> eingespeist, welche veränderte biologische Prozesse identifizierte. Einige ausgewählte biologische Prozesse stehen in einem möglichen Kontext mit einer Zigarettenrauchexposition und/oder einer Pathogenese von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen sind bis zu einem p-Wert von 0,1 dargestellt. Schwarze Balken zeigten hoch-, graue Balken deregulierte Gene an. Diese sind für Männchen (oben) und Weibchen (unten) dargestellt. Je weiter oben in der Grafik ein Prozess zu finden ist, desto höher ist der p-Wert. n = 4.



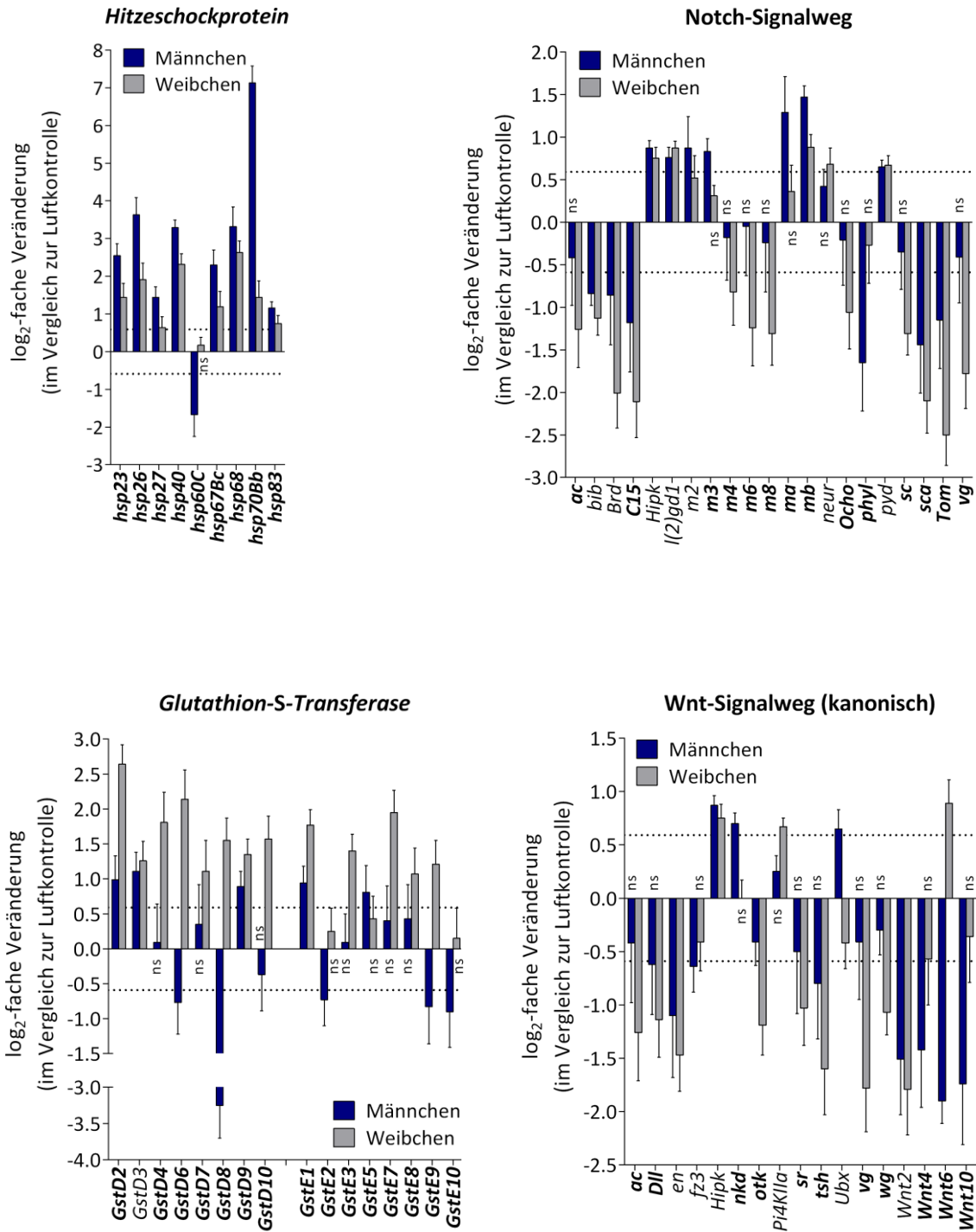
*Asthma bronchiale* und auch COPD sind Erkrankungen, die eine geschlechterspezifische Ausprägung aufweisen.<sup>68, 117</sup> Da im Zuge der zuvor durchgeführten Versuche besonders bei der *hsp70*-Expression ebenfalls ein sexueller Dimorphismus beobachtet wurde, wurden geschlechterspezifische Expressionsprofile anhand der Transkriptomanalyse herausgearbeitet. Dabei waren die zuvor erläuterten, signifikant veränderten Prozesse des Xenobiotikametabolismus, der Antwort auf oxidativen Stress, der angeborenen Immunantwort, der Entwicklung (wie der kanonische Wnt-Signalweg) und die GPCR-vermittelte Signalgebung Gegenstand dieser Betrachtungen. Es wurde ein sexueller Dimorphismus als gegeben angesehen, wenn sich wenigstens die Hälfte der damit assoziierten Gene in Männchen und Weibchen unterschiedlich verhielten (Unterschiede der Mittelwerte der beiden Geschlechter:  $\log_2$ -fache Veränderung  $\geq 0,5$ ). Diese sind Abb. 3.15 sowie Abb. 3.16 zu entnehmen.

Hier wurde in Bezug auf den Xenobiotikametabolismus bei vielen *Cyp* und *Gst*-kodierenden Genen eine geschlechtsspezifische Regulation beobachtet. Während bei *Cyp*-Genen vorwiegend eine Deregulation detektiert wurde, die ausgeprägter bei den Männchen war, wurde bei *Gst*-Genen eine Zunahme der Genexpression nach Zigarettenrauchexposition vor allem bei den Weibchen detektiert. Aber auch bei der *hsp*-vermittelten Antwort auf oxidativen Stress wurde eine sich zwischen den Geschlechtern unterscheidende Genexpression ermittelt, jedoch exprimierten Männchen stärker die damit assoziierten Gene.

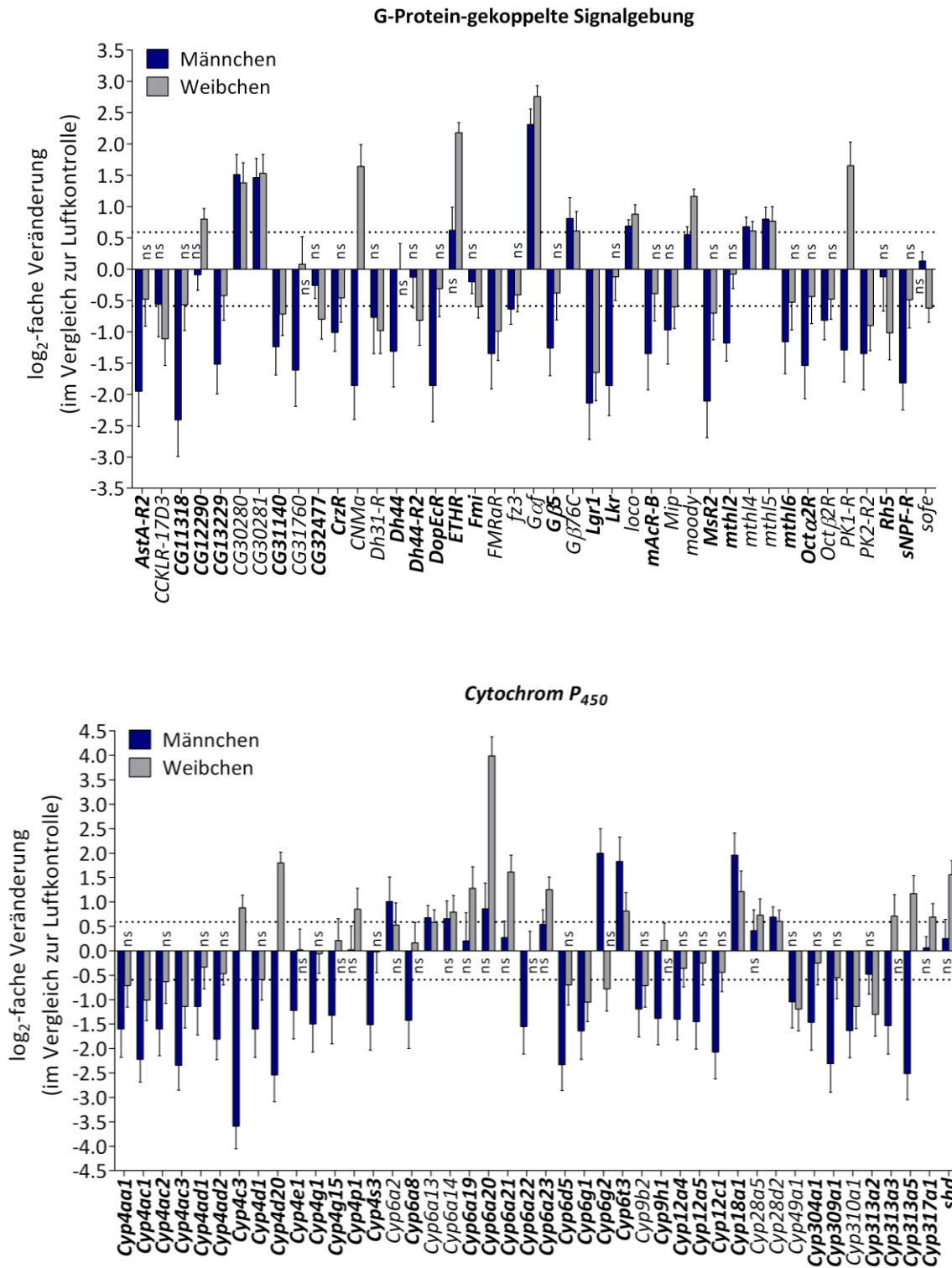
Im Gegensatz dazu konnte bei den Signalwegen der angeborenen Immunantwort keine geschlechtsspezifische Genexpression beobachtet werden.

In Hinblick auf die für die Entwicklung relevanten Gene wurde bei dem kanonischen Wnt-Signalweg eine geschlechterspezifische Regulation detektiert, wobei vorwiegend bei weiblichen Larven eine stärkere Deregulation der damit assoziierten Gene ermittelt wurde. Aber auch bei der Notch-Signalgebung wurde eine stärkere Deregulation der Genexpression bei den Weibchen beobachtet.

Im Gegensatz dazu wurden bei den Männchen infolge einer Zigarettenrauchexposition Gene, die mit der GPCR-Signalgebung assoziiert wurden, stärker dereguliert im Vergleich zu den Weibchen.



**Abb. 3.15:** Expression von Genen, die mit Hitzeschockproteinen, Glutathion-S-Transferasen, Notch- oder kanonischem Wnt-Signalweg assoziiert werden, in Tracheen männlicher und weiblicher Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauchexposition in Relation zur Luftkontrolle. Im Zuge der Transkriptomanalyse wurde beobachtet, dass Gene, die involviert sind in die Signalwege Notch und Wnt (kanonisch) sowie *hsp*- und *Gst*-zugehörige Gene geschlechtsspezifisch in den Atemwegen Rauch-exponierter Larven exprimiert wurden (Unterschiede der Mittelwerte:  $\log_2$ -fache Veränderung  $\geq 0,5$ ; in fett). Die Genexpression sind jeweils auf die Luftkontrolle normalisiert.  $n = 4$ . ns = nicht signifikant (bezogen auf die die Luftkontrolle des jeweiligen Geschlechts).



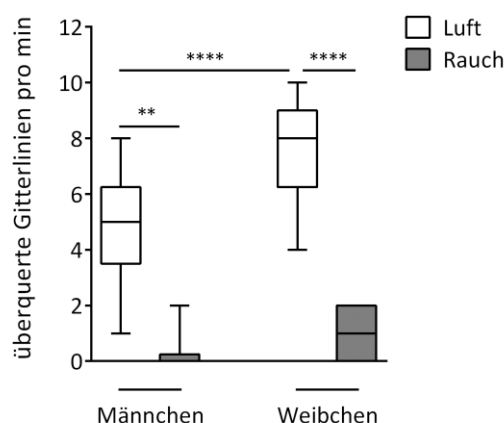
**Abb. 3.16:** Expression von Genen, die mit Cyp oder der GPCR-Signalkaskade assoziiert werden, in Tracheen männlicher und weiblicher Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauchexposition in Relation zur Luftkontrolle. Im Zuge der Transkriptomanalyse wurde beobachtet, dass Gene, die involviert sind in die GPCR-Signalgebung und Cyp-zugehörige Gene geschlechtsspezifisch in den Atemwegen Rauch-exponierter Larven exprimiert wurden (Unterschiede der Mittelwerte:  $\log_2$ -fache Veränderung  $\geq 0,5$ ; in fett). Die Genexpressionen sind jeweils auf die Luftkontrolle normalisiert.  $n = 4$ . ns = nicht signifikant (bezogen auf die die Luftkontrolle des jeweiligen Geschlechts).

### 3.3 Auswirkungen des Zigarettenrauchs auf die Fitness der Larve

#### 3.3.1 Zigarettenrauch vermindert die lokomotorische Aktivität bei Wildtyp-Larven

Die lokomotorische Aktivität ist ein weiterer Ausleseparameter, um die Fitness von *Drosophila* beurteilen zu können. Die Fitness wird dabei in dieser Arbeit als Widerstandsfähigkeit definiert. Hierzu wurden *Drosophila*-Wildtyp-Larven mit Zigarettenrauch oder Luft exponiert. Nach der Behandlung wurde die lokomotorische Aktivität mittels überquerter Gitternetzlinien innerhalb eines definierten Zeitraumes dokumentiert (Abb. 3.17).

Es wurde beobachtet, dass männliche, Luft-exponierte Larven durchschnittlich fünf Gitterlinien innerhalb 1 min überquerten. Diese bewegten sich damit signifikant weniger als die korrespondierenden weiblichen Kontrolllarven, die in demselben Zeitraum im Mittel acht Gitternetzlinien passierten. Die Aktivitäten zwischen den Geschlechtern Luft-exponierter Larven zeigten laut statistischer Analyse einen signifikanten Unterschied. Nach einer Zigarettenrauchexposition wurde eine stark verringerte lokomotorische Aktivität im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle beobachtet. Während jedoch die männlichen, Zigarettenrauch-exponierten Larven nahezu inaktiv waren, überquerten die weiblichen Larven durchschnittlich eine Gitternetzlinie im gleichen Zeitraum. Hier war jedoch der Geschlechterunterschied nicht statistisch signifikant.



**Abb. 3.17: Lokomotorische Aktivität von Wildtyp-Larven nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.** Unmittelbar nach Exposition mit Zigarettenrauch bzw. Luft wurde die lokomotorische Aktivität von *Drosophila*-Wildtyp-Larven überprüft. Weibliche Tiere der Luft-exponierten Gruppe waren agiler als die korrespondierenden männlichen Larven. Die Aktivität wurde jedoch infolge einer Zigarettenrauchexposition signifikant in beiden Geschlechtern verringert. Median  $\pm$  Min./Max.. n = 10 Larven. Statistik: one-way ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

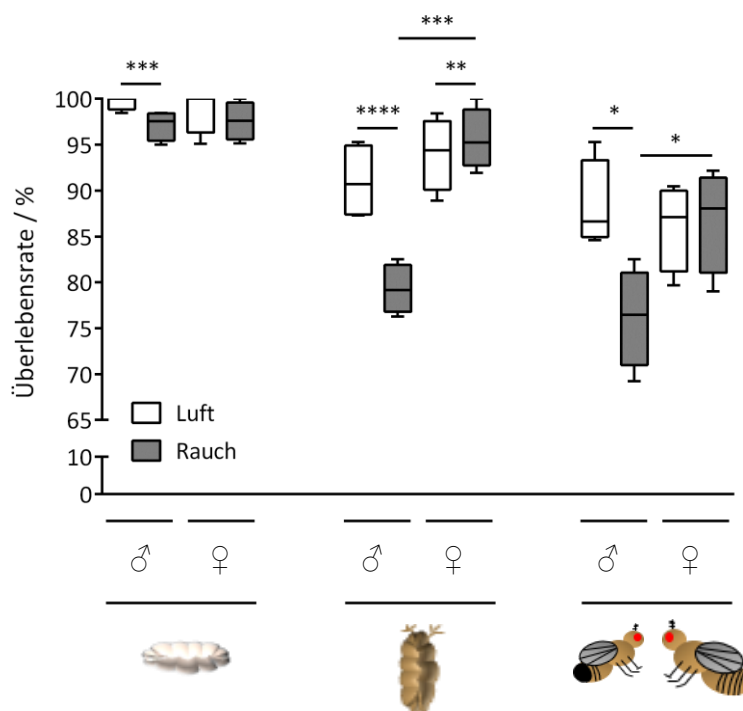
### **3.3.2 Die Verpuppungsrate ist bei Zigarettenrauch-exponierten, männlichen Wildtyp-Larven reduziert**

Tabakrauch besteht aus einer Vielzahl an Komponenten, von denen viele sich als toxisch erwiesen haben.<sup>11</sup> Der Kontakt zu Zigarettenrauch induziert Apoptose und Nekrose.<sup>128</sup> Gene, die mit der Apoptose assoziiert werden, konnten auch mittels der Transkriptomanalysen in Zigarettenrauch-exponierten Atemwegen weiblicher Larven gefunden werden (Abb. 3.14). Aufgrund dessen wurde überprüft, wie sich eine Zigarettenrauchexposition während des Larvalstadiums mittels des Rauchmodells auf die Viabilität während der folgenden Entwicklungsstadien auswirkt (Abb. 3.18). Dabei wurden die Anzahl der überlebenden Tiere in den einzelnen Entwicklungsstadien jeweils auf die vor Beginn der Exposition eingesetzten Larven bezogen.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine signifikant verringerte Anzahl der exponierten Larven die Zigarettenrauchapplikation überlebte (97,1 %), während nach der Luftexposition 99,6 % der Tiere am Leben waren. Bei den weiblichen Larven konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Zigarettenrauch- und Luft-behandelten Tieren ermittelt werden. Hier überlebten 97,6 % der weiblichen Larven eine Konfrontation mit Zigarettenrauch, während nach Luftexposition 98,8 % der Larven am Leben waren (Abb. 3.18 - links).

Bei den Männchen wurde beobachtet, dass 79,3 % der ursprünglich eingesetzten Larven der Rauchexpositionsgruppe in das Puppenstadium übergegangen sind. Dies war signifikant verringert in Bezug zur Luftexpositionsgruppe, bei der sich 91,0 % der Larven verpuppten. Bei den weiblichen Larven entwickelten sich 95,6 % der Tiere relativ zur Ausgangszahl zur Puppe, sofern sie zuvor Zigarettenrauch exponiert waren. Erfolgte hingegen eine Luftexposition, erreichten 94,0 % der Larven das nächste Entwicklungsstadium (Abb. 3.18 - Mitte).

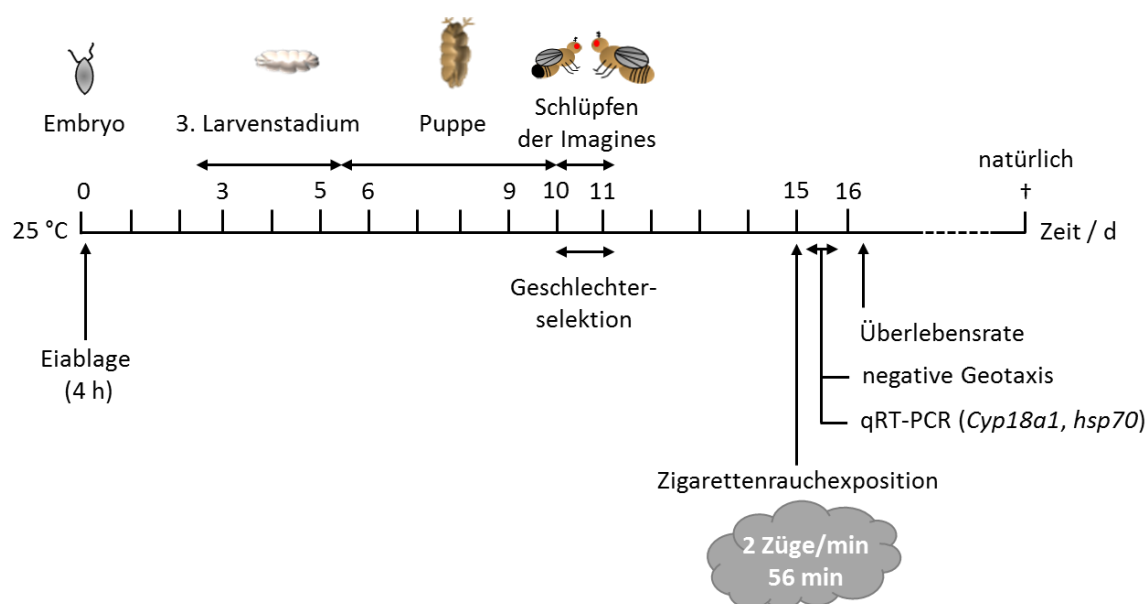
Bei den Männchen komplettierten 76,2 % der Larven die Metamorphose nach Zigarettenrauchexposition in Bezug auf die Anzahl anfänglich eingesetzter Tiere. Im Zuge einer Luftexposition wurde beobachtet, dass 88,3 % aller ursprünglich eingesetzten Larven sich zu Imagines entwickelten. Bei den Weibchen erreichten 86,8 % der zu Beginn eingesetzten Tiere das letzte Entwicklungsstadium nach Exposition mit Zigarettenrauch. Bei Konfrontation mit Luft schlüpfen 86,1 % der Tiere, die mit Beginn des Versuchs eingesetzt wurden (Abb. 3.18 - rechts).



**Abb. 3.18: Überlebensrate während der einzelnen Entwicklungsstadien Larve, Puppe und Imago nach vorheriger Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition von Wildtyp-Larven.** L3-Larven wurden Zigarettenrauch oder Luft exponiert. Direkt nach der Berauchung wurde die Anzahl lebender Larven gezählt (links), nach 2 d der Anteil der sich verpuppten Tiere (mittig) und 5 - 6 d später die Anzahl geschlüpfter adulter Tiere (rechts) bestimmt. Die Anzahl wurde jeweils auf die zu Beginn des Versuchs eingesetzten Tiere bezogen. Männliche, Zigarettenrauch-exponierte Larven wiesen eine reduzierte Überlebensrate direkt nach der Berauchung auf. Weiterhin verpuppten sich bei den männlichen Tieren bei Zigarettenrauchexposition weniger Tiere als bei Luftexposition. Aus diesen entwickelten sich nahezu sämtliche Tiere zu Imagines. Bei den Weibchen konnte keine reduzierte Überlebensrate während der einzelnen Entwicklungsstadien infolge einer Zigarettenrauchexposition beobachtet werden. Median  $\pm$  Min./Max.. n = 4 (ausgehend von 65 Larven). Statistik:  $\beta$ -lineare Regression mit Bonferroni-Post-Hoc-Test und einer Annäherung 1 ~ 0,9999. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

### 3.4 Das Rauchmodell für die adulte *Drosophila*

Neben dem Rauchmodell für das juvenile Entwicklungsstadium wurde ein weiteres Modell etabliert, welches bei adulten Taufliegen angewendet werden kann. Dieses ist schematisch in Abb. 3.19 dargestellt. Auch hier musste zunächst sichergestellt werden, dass der Tabakrauch vom Tier wahrgenommen wird und sich in einer veränderten Genexpression äußert, aber nicht oder nur wenig letal wirkt. Hierbei wurde im Gegensatz zum vorherigen Modell eine etwas verlängerte Eiablage von 4 h durchgeführt und auf die Geschlechtertrennung im Larvalstadium verzichtet. 5 d nach dem Schlüpfen wurden adulte, jungfräuliche Taufliegen für 56 min Zigarettenrauch exponiert, während die Kontrollgruppe für die jeweilige Zeit Luft ausgesetzt war. Es wurde eine Dosis von zwei Zügen/min gewählt, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass Taufliegen im adulten Stadium wesentlich sensibler auf Zigarettenrauch reagierten als sie es während larvaler Entwicklungsstadien taten. Dies äußerte sich in einer stark reduzierten Überlebensrate. Anschließend wurde die Genexpression von *Cyp18a1* sowie *hsp70* im Zuge der Etablierungsstudien untersucht. Weiterhin wurden die Auswirkungen des Zigarettenrauchs auf die Überlebensrate sowie die negative Geotaxis analysiert.



**Abb. 3.19: Experimenteller Ablauf für die Zigarettenrauchexposition während des adulten Entwicklungsstadiums.** Nach einer synchronisierten Eiablage durchliefen die Tiere die Entwicklung bis zur adulten Taufliege. Jungfräuliche Imagines wurden 5 d nach Schlüpfen Zigarettenrauch ausgesetzt (56 min, zwei Züge/min). Die entsprechende Kontrolle wurde Luft exponiert. Anschließend wurden in einer Kinetik die Genexpressionsprofile von *Cyp18a1* und *hsp70* im Kopf- sowie im Thorax-Abdomen-Homogenat detektiert. Außerdem wurde das negative Geotaxisverhalten überprüft und 24 h nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition die Überlebensrate der Tiere ermittelt. Die Tiere wurden konstant bei 25 °C gehalten.

### 3.5 Auswirkungen einer Zigarettenrauchexposition auf die Genexpression von adulten Tafliegen

#### 3.5.1 Eine Exposition mit Zigarettenrauch induziert *Cyp18a1* bei adulten Tafliegen

Für die Etablierung des Rauchmodells im adulten Entwicklungsstadium wurde, wie bei der Zigarettenrauchexposition während juveniler Entwicklungsphasen, eine Regulation des Gens *Cyp18a1* als Ausleseparameter festgelegt. Anhand dessen kann beurteilt werden, ob der Zigarettenrauch von der Imago vergleichbar mit der Larve aufgenommen wird. Tafliegenproben wurden gesammelt und seziiert; Proben vom Kopf sowie Proben, die den übrigen Korpus (Thorax und Abdomen zusammen) enthielten, wurden untersucht.

Es wurde unmittelbar nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition eine signifikante Erhöhung der *Cyp18a1*-mRNA-Konzentration in Köpfen männlicher Tafliegen um das 1,7-fache beobachtet im Vergleich zu den Luftkontrolltieren. Im Verlauf der Zeit nahm das Expressionsniveau graduell ab (1,5-fach bei 30 min; 1,2-fach bei 60 min, je in Relation zur Luftkontrolle). Zum zuletzt analysierten Zeitpunkt, 120 min nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition, reduzierte sich die *Cyp18a1*-Transkriptmenge weiter auf die 0,9-fache Expression in Bezug auf die Kontrolle. Lediglich zum zuerst untersuchten Zeitpunkt unterschieden sich die Expressionsspiegel der Rauchgruppe signifikant von dem der Luftkontrolle (Abb. 3.20 - links).

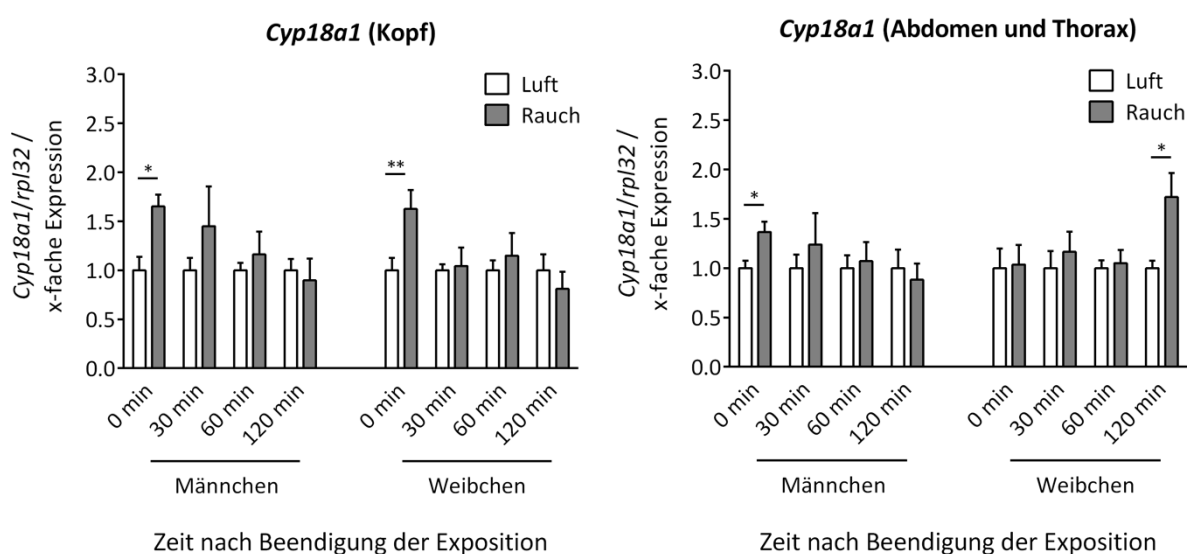
In Köpfen weiblicher Imagines wurde ebenfalls direkt nach Beendigung der Berauchung eine um den Faktor 1,6 erhöhte *Cyp18a1*-Expression im Vergleich zur Kontrolle detektiert. Zu den beiden nachfolgend untersuchten Zeitpunkten verminderte sich die Expression weiter (1,0-fach bei 30 min; 1,1-fach bei 60 min, jeweils in Relation zur Kontrolle). Zum Zeitpunkt 120 min nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition wurde eine weiter verringerte *Cyp18a1*-Transkriptmenge (0,8-fach) in der Rauchexpositionsgruppe in Relation zur Luftkontrolle ermittelt. Wie auch bei den Männchen äußerte sich auch hier nur die Expression unmittelbar nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition als statistisch signifikant in Bezug auf die Luft-exponierten Tiere (Abb. 3.20 - links).

Bezüglich der Thorax-Abdomen-Proben konnte bei den männlichen Imagines ein erhöhtes *Cyp18a1*-Signal bei Zigarettenrauchexposition im Vergleich zur Luftexposition direkt nach der Rauchprozedur detektiert werden (1,5-fach). Die Expression verringerte sich im Laufe der darauffolgend untersuchten Zeitpunkte (1,2-fach bei 30 min; 1,1-fach bei 60 min, je in Relation zur Kontrolle). 120 min nach Beendigung der Exposition wurde die geringste Transkriptmenge unterhalb des Kontrollspiegels (0,9-fach) detektiert. Lediglich der zuerst untersuchte Zeitpunkt zeigte eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Änderung des Expressionslevels (Abb. 3.20 - rechts).



Im Falle der Weibchen konnte im Thorax-Abdomen-Homogenat zu den drei zuerst untersuchten Zeitpunkten keine signifikante Veränderung der *Cyp18a1*-Konzentration beobachtet werden (1,0-fach bei 0 min; 1,2-fach bei 30 min; 1,1-fach bei 60 min, jeweils im Vergleich zur Kontrolle). Zum Zeitpunkt 120 min nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition wurde eine 1,6-fach erhöhte *Cyp18a1*-Transkriptmenge detektiert, die sich statistisch signifikant von dem der Luftkontrollgruppe unterschied (Abb. 3.20 - rechts).

Beim Vergleich der Expressionsprofile mit dem der ganzen Larven fiel auf, dass im jedem Bereich etwa ein Drittel so hohe *Cyp18a1*-mRNA-Konzentrationen erreicht wurden wie in der ganzen Larve.



**Abb. 3.20: Expression von *Cyp18a1* im Kopf- sowie im Thorax-Abdomen-Homogenat von adulten Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponierten Tauflieden.** Jungfräuliche Imagines wurden 5 d nach Schlüpfen geschlechtergetrennt Zigarettenrauch bzw. Luft exponiert. Kopfhomogenat und Homogenat vom Thorax zusammen mit Abdomen wurde direkt nach der Exposition sowie 30, 60 und 120 min später bezüglich des *Cyp18a1*-Expression mittels qRT-PCR untersucht. Das Haushaltsgen *rpl32* diente jeweils zur Normalisierung. Links: *Cyp18a1* wurde unmittelbar nach der Zigarettenrauchexposition im Kopfhomogenat beider Geschlechter signifikant im Vergleich zur Kontrolle exprimiert. Rechts: *Cyp18a1* wurde im Thorax-Abdomen-Homogenat direkt nach der Berauchung bei den Männchen, bei den Weibchen 120 min nach Expositionsende signifikant exprimiert in Relation zur jeweiligen Kontrolle. MW  $\pm$  SEM. n = 3 (je zehnmal Kopf bzw. zehnmal Abdomen und Thorax). Statistik: einseitiger *ratio-paired* t-Test (Vergleich der Rauch- zur Luftexposition; jeweils pro Zeitpunkt und Geschlecht). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

### 3.5.2 Eine Exposition mit Zigarettenrauch induziert *hsp70* bei adulten Taufliiegen

Analog zu *Cyp18a1* wurde auch die Expression von *hsp70* in Köpfen sowie in Abdomen und Thorax zusammen von Imagines ermittelt.

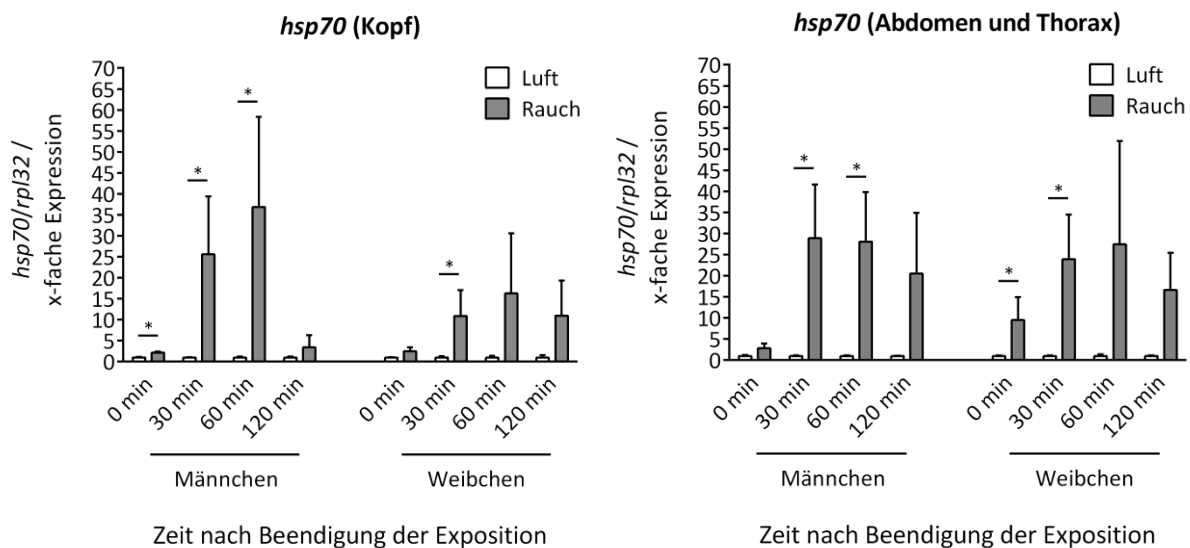
Die *hsp70*-Expression bei adulten Tieren war in beiden untersuchten Proben quantitativ stärker verglichen mit *Cyp18a1*. In den Köpfen von männlichen *Drosophila* war die *hsp70*-Konzentration bis 60 min nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition signifikant erhöht in Bezug auf die jeweilige Luftkontrolle. Hierbei wurde eine graduelle Erhöhung der *hsp70*-Transkriptmenge von 0 min (2,2-fach) über 30 min (26-fach) zu 60 min (37-fach) je in Bezug auf die Kontrolle zu beobachten. Zum zuletzt analysierten Zeitpunkt, 120 min nach Fertigstellung der Berauchung, verringerte sich die Transkriptmenge auf das 3,4-fache in Relation zu Luft-exponierten Imagines (Abb 3.21 - links).

Bei weiblichen Tieren wurde im Kopf unmittelbar nach der Zigarettenrauchkonfrontation 2,5-fach erhöhte *hsp70*-Spiegel im Vergleich zur Luftexpositionskontrolle quantifiziert, die bis 60 min nach Beendigung der Applikation mit Zigarettenrauch weiter anstiegen (elffach bei 30 min; 16-fach bei 60 min, jeweils in Relation zu Luft-exponierten Köpfen). 120 min nach Fertigstellung der Zigarettenrauchexposition verringerte sich das *hsp70*-Level wieder (elffach in Relation zu Köpfen Luft-exponierter Imagines). Nur zum Zeitpunkt 30 min nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition wurde eine statistische signifikante Veränderung der *hsp70*-Expression in Relation zur Kontrolle gefunden (Abb. 3.21 - links).

Bei den männlichen Taufliiegen wurde im Thorax-Abdomen-Homogenat unmittelbar nach Expositionsende nur wenig *hsp70* (2,8-fach) in der berauchten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe detektiert. 30 min und 60 min später stieg die Konzentration jedoch auf das 29-fache bzw. 28-fache in Relation zur Luftkontrolle an. 120 min nach Beendigung der Behandlung mit Zigarettenrauch wurde eine etwa 21-fache Zunahme der Transkriptmengen in Bezug auf die Luftkontrolle beobachtet. Die Expression zu den Zeitpunkten 30 min und 60 min unterschieden sich signifikant von der Kontrolle (Abb. 3.21 - rechts).

Bei Proben, die Thorax und Abdomen weiblicher Taufliiegen enthielten, wurde direkt nach der Zigarettenrauchexposition sowie nach 30 min und 60 min eine Erhöhung der *hsp70*-Transkripte beobachtet (9,5-fach bzw. 24-fach bzw. 27-fach). Zum zuletzt analysierten Zeitpunkt, 120 min nach Expositionsende, verminderten sich die Transkriptmengen wieder und lagen 17-fach erhöht vor in Bezug auf die der unbehandelten Tiere. Die *hsp70*-Expression zum Zeitpunkt 0 min und 30 min verhielten sich gemäß Analyse statistisch signifikant in Relation zur Kontrolle (Abb. 3.21 - rechts).

Beim Vergleich dieser Daten mit dem Expressionsprofil der Larven war wie auch bei dem Gen *Cyp18a1* auffällig, dass etwa halb so hohe Expressionslevel im Kopf- bzw. im Thorax-Abdomen-Homogenat erhalten wurden wie in ganzen Larven.



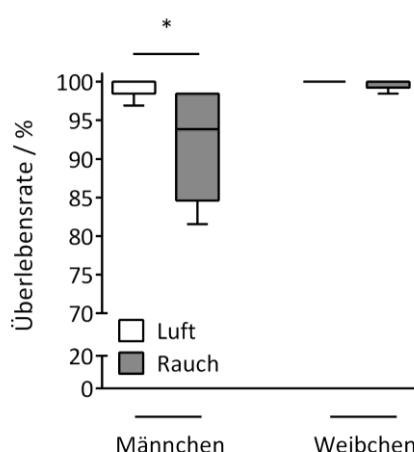
**Abb. 3.21: Expression von *hsp70* im Kopf- sowie im Thorax-Abdomen-Homogenat von adulten Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponierten Tauflieden.** Jungfräuliche Imagines wurden 5 d nach Schlüpfen geschlechtergetrennt Zigarettenrauch bzw. Luft exponiert. Kopfhomogenat und Homogenat vom Thorax zusammen mit Abdomen wurde direkt nach der Exposition sowie 30, 60 und 120 min später bezüglich des *Cyp18a1*- und *hsp70*-Expression mittels qRT-PCR untersucht. Das Haushaltsgen *rp132* diente jeweils zur Normalisierung. A: *Cyp18a1* wurde unmittelbar nach der Zigarettenrauchexposition im Kopfhomogenat beider Geschlechter signifikant exprimiert im Vergleich zur Kontrolle. B: *hsp70* war im Kopfhomogenat bis zu 60 min bei Männchen und bis 30 min bei Weibchen nach Expositionsende signifikant erhöht in Bezug auf die jeweilige Luftkontrolle. C: *Cyp18a1* wurde im Thorax-Abdomen-Homogenat direkt nach der Berauchung bei den Männchen, bei den Weibchen 120 min nach Expositionsende signifikant exprimiert in Relation zur jeweiligen Kontrolle. D: Eine signifikante Zunahme von *hsp70* im Thorax-Abdomen-Homogenat bei Männchen wurde 30 min und 60 min nach Zigarettenrauchexposition in Relation zur Kontrolle detektiert, bei Weibchen zum Zeitpunkt 0 min und 30 min. MW  $\pm$  SEM. n = 3 (je zehnmal Kopf bzw. zehnmal Abdomen und Thorax). Statistik: einseitiger *ratio-paired* t-Test (Vergleich der Rauch- zur Luftexposition; jeweils pro Zeitpunkt und Geschlecht). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

### 3.6 Auswirkungen des Tabakrauchs die Fitness der adulten Taufliège

#### 3.6.1 Eine Zigarettenrauchexposition während des adulten Entwicklungsstadiums wirkt sich auf das Überleben von männlichen Taufliègen aus

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel 3.4 angesprochen, reagierten Imagines sensitiver auf eine Exposition mit Zigarettenrauch als Larven. Da auch bei den Larven ein Einfluss der Zigarettenrauchexposition auf die Überlebensrate beobachtet wurde (Abb. 3.18), wurden die Auswirkungen des Zigarettenrauchs auch auf die Überlebensrate von adulten Taufliègen ermittelt.

Nach Zigarettenrauchexposition waren bis auf wenige Ausnahmen sämtliche Tiere bei Männchen und bei Weibchen immobilisiert, bei Luftexposition war hingegen keiner der Imagines bewegungsunfähig. Die meisten weiblichen Taufliègen regenerierten sich innerhalb von 1 h nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition, während viele der männlichen Taufliègen teilweise über mehrere Stunden betäubt waren. Um falsch-positiv gewertete Imagines auszuschließen, wurde die Anzahl lebender Tiere 24 h nach der Zigarettenrauchexposition bestimmt. Rauch-exponierte, männliche Taufliègen zeigten eine signifikant verringerte Überlebensrate von 92,0 % im Vergleich zur Luftkontrollgruppe auf, bei denen 99,4 % der Tiere am Leben waren, je relativ zur Anzahl der zu Beginn des Versuchs eingesetzten Taufliègen. Bei Zigarettenrauch-exponierten Weibchen konnte eine Überlebensrate von 99,7 % beobachtet werden, die sich statistisch nicht von den Luft-exponierten Taufliègen unterschied (100 %) (jeweils zu den zu Beginn des Experiments eingesetzten Tieren) (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Überlebensrate von männlichen und weiblichen Taufliègen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.**

Imagines wurden im Alter von 5 d Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponiert. Nach 24 h wurde die Anzahl der lebenden Taufliègen in Bezug auf die zu Beginn eingesetzten Tiere ermittelt. Männliche Imagines wiesen eine statistisch verminderte Anzahl überlebender Tiere nach einer Zigarettenrauchexposition im Vergleich zur Luftkontrolle auf. Eine veränderte Überlebensrate infolge einer Zigarettenrauchexposition konnte nicht bei den weiblichen Imagines beobachtet werden. Median  $\pm$  Max./Min.. n = 4 (50 - 65 Taufliègen pro Gruppe). Statistik: einseitiger, gepaarter t-Test (Vergleich der Rauch- zur Luftexposition; jeweils pro Geschlecht). \*p < 0,05.

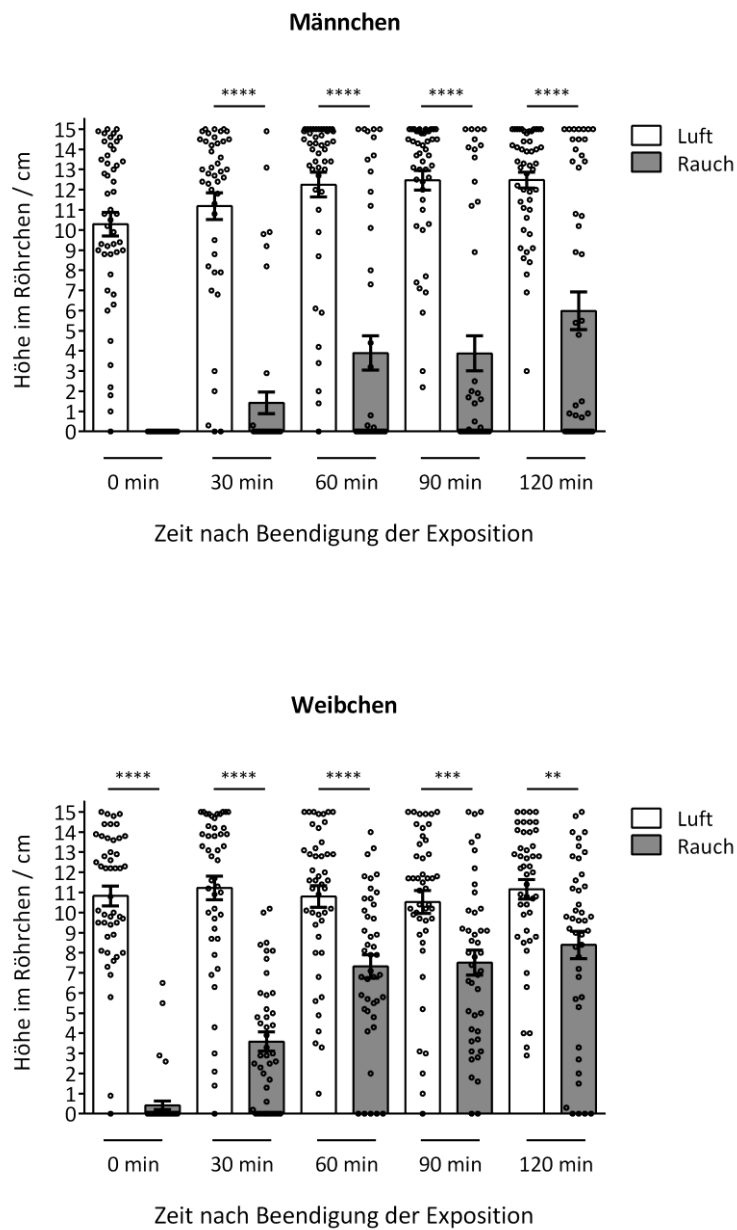
### **3.6.2 Eine Zigarettenrauchexposition von adulten Taufliegen reduziert die negative Geotaxis**

Wie in Kapitel 3.4 bereits erwähnt, induzierte eine Behandlung mit Zigarettenrauch eine Bewegungsunfähigkeit der Imagines. Um die Regeneration von dieser Zigarettenrauch-vermittelten Immobilisierung geschlechtsabhängig zu bestimmen, wurde die negative Geotaxis, die das intrinsische Verhalten der Taufliegen vertikale Flächen hochzuwandern widerspiegelt, direkt nach der Berauchung sowie 30, 60, 90 und 120 min nach Beendigung der Zigarettenrauchbehandlung innerhalb eines definierten Zeitfensters bestimmt (Abb. 3.23).

Im Zuge dieses Versuchsaufbaus wurde ermittelt, dass unbehandelte, männliche wie weibliche Taufliegen eine mittlere Höhe von etwa 11 cm erreichten.

Bei Exposition mit Zigarettenrauch wurde beobachtet, dass alle männlichen Tiere direkt nach Rauchexposition akinetisch waren. Jedoch regenerierten sich die Taufliegen mit der Zeit von der Zigarettenrauch-vermittelten Bewegungsunfähigkeit. Es wurde 30 min später eine mittlere Höhe von 1,4 cm ermittelt, zum Zeitpunkt 60 min und 90 min nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition wurde je eine Höhe von 3,9 cm im Röhrchen gemessen. Zum zuletzt analysierten Zeitpunkt (120 min) wurde eine Höhe von 6,1 cm im erreicht. Zum Zeitpunkt 0 min nach Rauchexpositionsende konnte keine statistische Analyse aufgrund fehlender Varianz durchgeführt werden. Die übrigen Zeitpunkte waren gemäß statistischer Analyse jeweils signifikant reduziert in Bezug auf die Luftkontrollgruppe. Im Laufe der Zeit konnte beobachtet werden, dass ein Teil der exponierten Taufliegen sensibler auf die Zigarettenrauchexposition reagierten, da diese noch zum zuletzt analysierten Zeitpunkt (120 min) noch durch den Zigarettenrauch betäubt waren, während andere sich von der Bewegungsunfähigkeit bereits partiell oder vollständig erholt hatten.

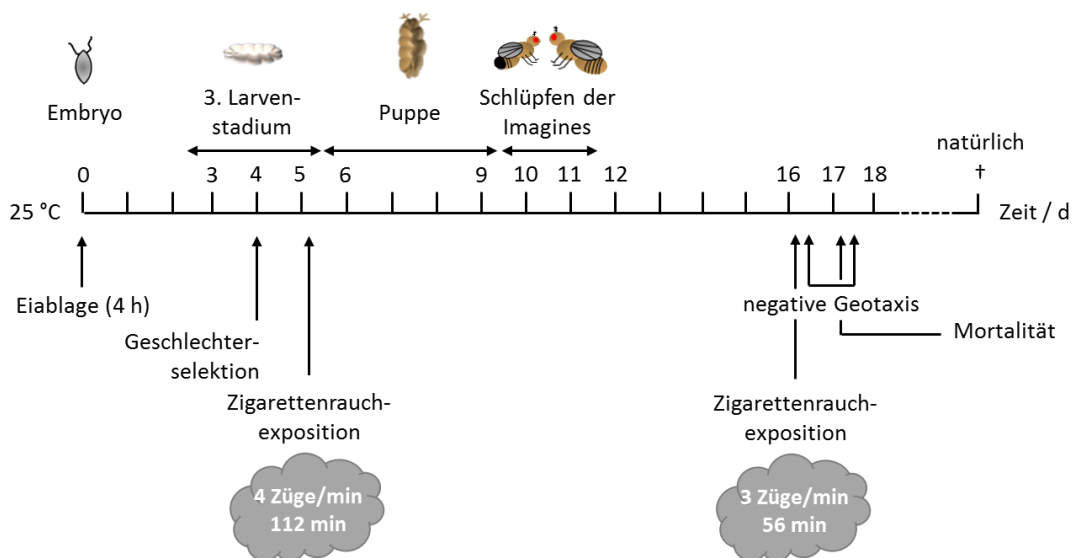
Bei den Weibchen waren im Gegensatz zu den männlichen Imagines einige wenige Tiere durch die Behandlung nicht vollständig bewegungsunfähig. Hier wurde eine mittlere Höhe von 0,4 cm unmittelbar nach Expositionsende gemessen. Wie bei den Männchen wurde eine mit der Zeit fortschreitende Regeneration von der Zigarettenrauch-induzierten Bewegungsunfähigkeit beobachtet. Zum Zeitpunkt 30 min nach Beendigung Zigarettenrauchexposition wurde eine mittlere Höhe von 3,6 cm im Röhrchen gemessen. Die erreichte Höhe stieg 60 min bzw. 90 min nach Zigarettenrauchexpositionsende weiter an (7,3 cm bzw. 7,5 cm). Die durchschnittliche Höhe zum zuletzt analysierten Zeitpunkt (120 min) betrug 8,4 cm. Die mittlere Höhe im Röhrchen war zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant reduziert in Relation zur Kontrolle. Eine Beobachtung von unterschiedlich sensiblen Gruppen konnte bei den Weibchen nicht beobachtet werden.



**Abb. 3.23: Negativer Geotaxis-Assay von adulten Taufiegen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition.** Jungfräuliche, adulte *Drosophila* wurden im Alter von 5 d mit Zigarettenrauch exponiert und die negative Geotaxis dieser direkt nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition sowie 30, 60, 90, 120 min später innerhalb eines Zeitfensters von 10 s bestimmt. Sowohl bei männlichen als auch weiblichen, Luft-exponierten Taufiegen wurde eine mittlere Höhe von etwa 11 cm im Röhrchen ermittelt. Bei Zigarettenrauchexposition waren männliche Imagines vollständig bewegungsunfähig. Die Beweglichkeit wurde im Verlauf der untersuchten Zeitpunkte partiell wiederhergestellt. Männliche Taufiegen erreichten 120 min nach Beendigung der Behandlung eine Höhe von 6,0 cm im Röhrchen. Bei Weibchen waren unmittelbar nach Fertigstellung der Exposition viele Taufiegen bewegungslos. Die Regeneration verlief jedoch schneller als bei männlichen Fliegen: Zum zuletzt analysierten Zeitpunkt (120 min) lag die Höhe bei 8,4 cm. MW  $\pm$  SEM. n = 42 - 48 Taufiegen pro Gruppe. Statistik (je Messzeitpunkt und Geschlecht): einseitig ungepaarter t-Test. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001. Wegen fehlender Varianz konnte zum Zeitpunkt 0 min bei den Männchen keine Statistik durchgeführt werden.

### 3.7 Design eines zweifachen Rauchexpositionsmodells einer *Drosophila*-Generation

Innerhalb der Metamorphose, die während des Puppenstadiums stattfindet, treten viele Umstrukturierungsprozesse auf. Diese werden unter anderem über epigenetische Mechanismen reguliert.<sup>129-136</sup> Dabei stellt sich die Frage, ob Modifikationen im Epigenom, die im Juvenilstadium beispielsweise durch eine Exposition mit Zigarettenrauch erworben worden sind, die Metamorphose überdauern und im Imaginalstadium einen Phänotyp verursachen, der sich von dem unbehandelten Tiere unterscheidet. Im Zuge dessen wurde überprüft, ob eine Behandlung von Imagines mit Zigarettenrauch, die bereits im juvenilen Stadium mit Zigarettenrauch in Kontakt gekommen waren (Gruppe 4), eine differente Antwort aufweisen als eine Gruppe, die nur einmalig eine Zigarettenrauchexposition, entweder als Larve (Gruppe 2) oder als Imago (Gruppe 3), widerfahren war. Kontrolltiere (Gruppe 1) wurden in keinem der beiden Entwicklungsstadien mit Zigarettenrauch konfrontiert. Aufgrund der Verwendung eines neuen Canton-S-Stamms wurde die Expositionsdauer bei der Larve auf 112 min verlängert und die Konzentration bei Imagines auf drei Züge/min erhöht. Nach Exposition mit Zigarettenrauch oder Luft wurde die Überlebensrate überprüft sowie die Regeneration von der Zigarettenrauch-induzierten Bewegungsunfähigkeit mittels eines negativen Geotaxis-Assays untersucht (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24: Experimenteller Ablauf der zweifachen Zigarettenrauchexposition während des larvalen und adulten Entwicklungsstadiums.** Nach Geschlechtern selektierte, 5 d alte Wildtyp-Larven wurden Zigarettenrauch bzw. Luft exponiert (112 min, vier Züge/min). Nach Vollendung der Metamorphose wurden 5 d alte, jungfräuliche Taufliegen Zigarettenrauch bzw. Luft ausgesetzt (56 min, drei Züge/min). Die negative Geotaxis wurde überprüft und die Überlebensrate der Tiere ermittelt. Die Tiere wurden konstant bei 25 °C gehalten.

### **3.8 Auswirkungen einer wiederholten Zigarettenrauchexposition auf die Fitness von *Drosophila***

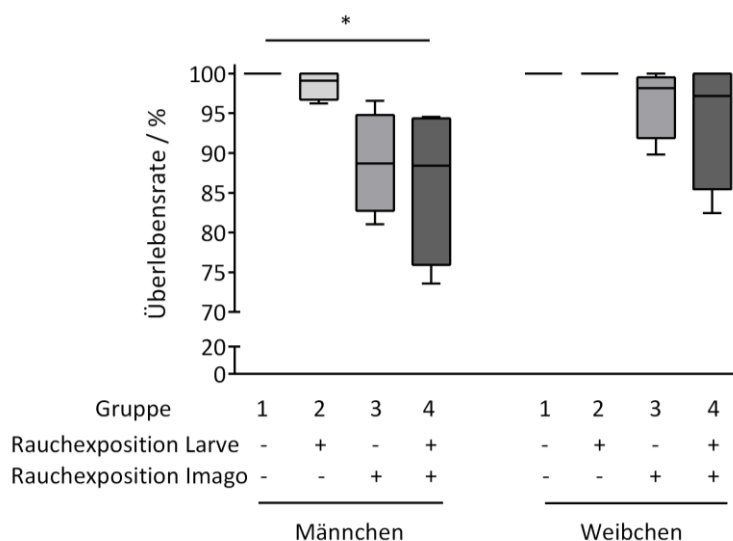
#### **3.8.1 Eine Zigarettenrauchexposition im Larval- und Adultstadium wirkt sich auf das Überleben von männlichen Taufliegen aus**

Die Überlebensrate wurde 24 h nach Expositionsende untersucht, da die Taufliegen nach der Exposition mit Zigarettenrauch teilweise lange bewegungsunfähig waren (Abb. 3.25). Weibliche Taufliegen waren bis zu 3 h infolge der Zigarettenrauchexposition a- bzw. hypokinetisch, während viele der männlichen Taufliegen teilweise über mehrere Stunden ihre Bewegungsfähigkeit nicht wiederherstellen konnten.

Innerhalb dieser Versuchsreihe konnte beobachtet werden, dass männliche Kontrolltaufliegen (Gruppe 1) von der Behandlung unbeeinflusst waren (100 %ige Überlebensrate in Relation zu den lebenden Taufliegen vor Beginn des Versuchs). Bei Taufliegen, die ausschließlich im Larvalstadium Zigarettenrauch exponiert worden waren (Gruppe 2), wurde eine 98,6 %ige Überlebensrate beobachtet in Bezug zu denen lebenden Tieren vor Beginn des Experiments. Bei Taufliegen mit einer einmaligen Zigarettenrauchexposition während des Imaginalstadiums (Gruppe 3) konnte eine Überlebensrate von 88,7 % relativ zu vor dem Versuchsbeginn ermittelt werden. Im Falle der Taufliegen, die in beiden Stadien mit einer Zigarettenrauchexposition konfrontiert worden sind (Gruppe 4), wurde eine Überlebensrate von durchschnittlich 86,2 % beobachtet in Vergleich zu lebenden Tieren vor Start des Versuchs. Diese erwies sich im Vergleich zur den Kontrollgruppe 1 als statistisch signifikant. In den einzelnen Versuchen wurde bei der einmalig als Imago Zigarettenrauch exponierten Gruppe 3 sowie bei der in beiden Entwicklungsphasen mit Zigarettenrauch in Kontakt gekommenen Gruppe 4 eine starke Streuung beobachtet.

Bei Kontrollen weiblicher Taufliegen (Gruppe 1) sowie Taufliegen, die einmalig während der juvenilen Entwicklungsphase mit Zigarettenrauch in Kontakt gekommen waren (Gruppe 2), wurde keine veränderte Überlebensrate ermittelt in Vergleich zu lebenden Tieren vor Start des Experiments. Bei Taufliegen, die nur als Imago mit Zigarettenrauch konfrontiert worden waren (Gruppe 3), war die Überlebensrate etwas reduziert (96,5 %) im Vergleich zu der Anzahl der lebenden Tiere vor der Berauchung. Die Anzahl überlebender weiblicher Taufliegen, die in beiden Entwicklungsstadien mit Zigarettenrauch exponiert worden waren, war ebenfalls verringert (94,2 %) relativ zu der Anzahl der lebenden Tiere vor Rauchexposition. Keine der Gruppen unterschied sich statistisch signifikant zu einer der anderen Gruppen. In den einzelnen Versuchen wurde bei der einmalig als Imago Zigarettenrauch exponierten Gruppe 3 sowie bei der in beiden Entwicklungsphasen mit Zigarettenrauch in Kontakt gekommenen Gruppe 4 eine hohe Varianz beobachtet.





**Abb. 3.25: Überlebensrate von Taufliegen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition, die bereits im Juvenilstadium Rauch bzw. Luft exponiert worden waren.** L3-Larven wurden Rauch- bzw. Luft-exponiert. Die hervorgehenden jungfräulichen Imagines wurden abermals Zigarettenrauch bzw. Luft ausgesetzt. Nach 24 h wurde die Anzahl an lebenden Taufliegen ermittelt. Adulte männliche Taufliegen, die in beiden Stadien Zigarettenrauch exponiert worden waren (Gruppe 4), wiesen im Vergleich zu den entsprechenden Luftkontrolltieren (Gruppe 1) eine signifikant reduzierte Überlebensrate auf. Eine signifikante Veränderung der Überlebensrate konnte bei den Weibchen in keiner der Gruppen in Relation zur Kontrolle beobachtet werden. Median  $\pm$  Min/Max.. n = 4 (mit 42 - 62 Taufliegen pro Gruppe). Statistik: *one-way* ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test (jeweils pro Geschlecht). \*p < 0,05.

### 3.8.2 Eine zweifache Zigarettenrauchexposition während des Larval- und Imaginalstadiums hat keinen Einfluss auf die negative Geotaxis

Die negative Geotaxis kann mit einem Aktivitätsspiegel verglichen werden. Im humanen System ist bekannt, dass eine *in utero*-Exposition des Fötus mit Zigarettenrauch mit einem erhöhten Risiko für das Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) korreliert.<sup>137</sup> Innerhalb des Modells, welches eine zweifache Exposition der Taufliege behandelt, wurde dahingehend die Geotaxis in den verschiedenen Gruppen untersucht. In diesem Fall wurden die Zeitpunkte 4 h sowie 24 h nach Beendigung der Applikation analysiert (Abb. 3.26), um die lange Betäubung der Taufliegen in beiden Geschlechtern weitestgehend zu umgehen (s. Abb. 3.23).

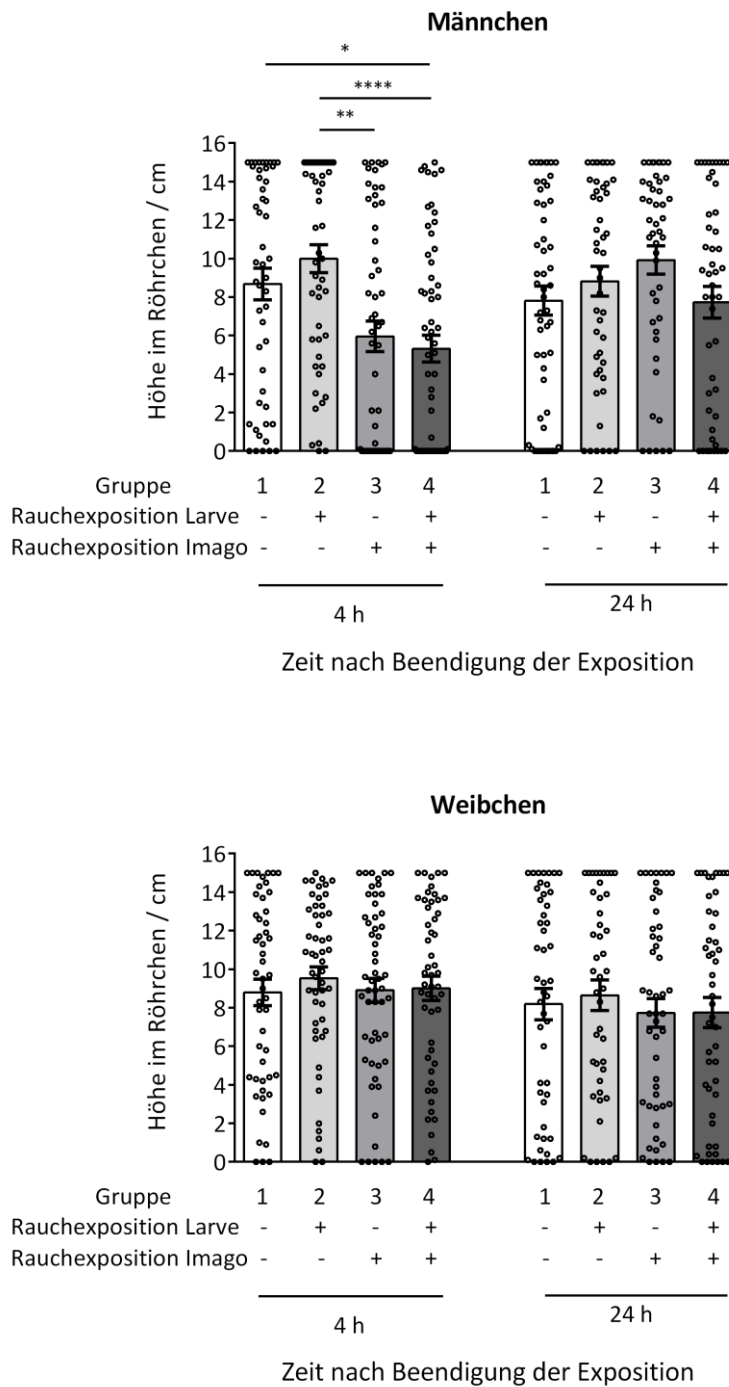
Bei der männlichen Kontrollgruppe 1 wurde 4 h nach Beendigung der Exposition eine mittlere Höhe von 8,7 cm im Röhrchen gemessen. Diese war damit geringer als der für die Etablierung des adulten Rauchmodells ermittelte Wert (Abb. 3.23). Lag eine Exposition ausschließlich während des Juvenilstadiums vor (Gruppe 2), so war die Höhe etwas erhöht (9,5 cm), wobei sich dieser

Unterschied als nicht signifikant zur Kontrolle erwies. War eine Exposition ausschließlich bei der Imago (Gruppe 3) durchgeführt worden, so wurde eine mittlere Höhe von 6,0 cm beobachtet, die sich statistisch signifikant von Taufliegen, die nur während des Larvalstadiums mit Zigarettenrauch exponiert worden waren (Gruppe 2), unterschied. Innerhalb dieser Gruppe waren einige Imagines bewegungsunfähig. Bei Taufliegen, die während beider Entwicklungsphasen mit Tabakrauch konfrontiert worden waren (Gruppe 4), wurde im Mittel eine Höhe von 5,3 cm im Gefäß gemessen. Auch hier wurde die Bewegungsunfähigkeit von einigen Taufliegen beobachtet. Die Höhe unterschied sich signifikant sowohl von der der Kontrolle als auch von der von nur im Larvalstadium berauchter Tiere.

24 h nach Expositionsende konnten Individuen, die nicht die am Tag zuvor durchgeführte Exposition überlebt haben, von den übrigen Taufliegen separiert werden. In der männlichen Kontrollgruppe 1 wurde eine mittlere Höhe von 7,8 cm im Geotaxisröhrchen erreicht und lag etwas niedriger als bei Ermittlung der Höhe 20 h zuvor. Bei Taufliegen, die nur eine einmalige Exposition im Juvenilalter (Gruppe 2) erfahren hatten, wurde eine durchschnittliche, erreichte Höhe von 8,8 cm gemessen. Diese war ebenfalls niedriger als die zuvor ermittelte Höhe. Bei Taufliegen, die nur im Imaginalstadium Zigarettenrauch exponiert worden waren (Gruppe 3), wurde eine erreichte Höhe von 9,9 cm im Röhrchen ermittelt. Imagines, die zwei Mal mit Zigarettenrauch behandelt worden waren (Gruppe 4), erreichten eine mittlere Höhe von 7,7 cm. Die erreichte Höhe der Taufliegen im Röhrchen unterschied sich bei keiner der untersuchten Gruppen signifikant von der der anderen.

Im Gegensatz zu den männlichen Taufliegen waren die Weibchen zum Zeitpunkt 4 h nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition nicht vollständig bewegungslos. Sowohl bei der Luftkontrollgruppe 1, als auch bei Imagines, die nur während der adulten Phase Zigarettenrauch ausgesetzt worden waren (Gruppe 3), sowie bei der Gruppe, die eine zweifache Zigarettenrauchexposition erfahren hatte (Gruppe 4), wurden vergleichbare mittlere Höhen im Röhrchen (8,8 cm bzw. 8,9 cm bzw. 9,0 cm) ermittelt. Die Taufliegen, die einmalig als Larven mit Zigarettenrauch in Kontakt gekommen waren (Gruppe 2), erreichten durchschnittlich eine Höhe von 9,9 cm im Geotaxisröhrchen. Es wurde in keiner der Gruppen ein Wert für die erreichte Höhe ermittelt, der sich statistisch signifikant zu einem der anderen unterschied.

Bei der Ermittlung der negativen Geotaxis 24 h wurde bei der Luftkontrolle (Gruppe 1) eine Höhe von 8,2 cm gemessen, die einmalig während der Larvalphase exponierten Tiere (Gruppe 2) erreichten eine Höhe von 8,6 cm. Bei ausschließlich während des adulten Entwicklungsstadiums behandelten Tiere (Gruppe 3) sowie den Taufliegen, die sowohl im Larval- als auch Imaginalstadium mit Zigarettenrauch in Kontakt gekommen waren (Gruppe 4), wurde eine durchschnittliche Höhe von 7,7 cm beobachtet. Auch zu diesem Zeitpunkt konnte keine statistisch signifikante Abweichung der Gruppen voneinander ermittelt werden.



**Abb. 3.26: Negativer Geotaxis-Assay von adulten Taufliiegen nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition, die zuvor im Larvalstadium Zigarettenrauch- bzw. Luft-exponiert worden waren.** Larven wurden Rauch oder Luft exponiert. Die hervorgehenden, jungfräulichen Taufliiegen wurden im Alter von 5 d Zigarettenrauch oder Luft exponiert und die negative Geotaxis 4 h sowie 24 h nach Expositionsende innerhalb von 10 s bestimmt. 4 h nach Expositionsende war ein signifikanter Anteil der männlichen Taufliiegen durch Zigarettenrauch bewegungslos. Die mittlere Höhe im Röhrchen unterschied sich zum Zeitpunkt 24 h bei keiner der untersuchten Gruppen signifikant voneinander. Bei weiblichen taufliiegen konnte keine signifikant veränderte Höhe im Röhrchen zu keinem der gewählten Zeitpunkte gefunden werden. MW  $\pm$  SEM. n = 49 - 59 Taufliiegen pro Gruppe. Statistik (je Messzeitpunkt): *one-way* ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

## 4 Diskussion

Viele ätiologische, pathogenetische und mechanistische Aspekte chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen wie *Asthma bronchiale* und der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) sind trotz jahrzehntelanger Forschung noch immer ungeklärt. Neben vielen anderen Faktoren übt besonders der Konsum von Tabakwaren einen starken Einfluss auf die Entwicklung von Asthma und COPD aus.<sup>71, 72, 138</sup> Doch gibt es auch Hinweise, dass nicht nur die Tabakkonsumenten selbst von den Auswirkungen des Rauchens betroffen sind: Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass parentales Zigarettenrauchen die Asthma-suszeptibilität der Nachkommen im späteren Leben signifikant erhöht.<sup>73-79</sup> Auch für COPD wird dergleichen vermutet.<sup>80</sup> Dabei ist die Exposition mit Zigarettenrauch bedingt durch den elterlichen Zigarettenkonsum während vulnerabler Zeitfenster von besonderem Interesse. Solche Zeitfenster sind bei Frauen primär während ihrer Embryogenese und bei Männern vor dem Eintritt in die Pubertät zu finden. Da in diesen vulnerablen Phasen die Entwicklung der Keimzellen betroffen ist, kann es zu epigenetischen Veränderungen im Erbgut dieser kommen, wodurch das erhöhte Risiko für die Entstehung von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen bedingt wird.

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* dient seit Jahren als Modellorganismus für die Erforschung bestimmter Aspekte chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen.<sup>38, 85, 86</sup> Mit diesem System können zwei ursächliche Komponenten für die Ausbildung dieser Krankheiten, die angeborene Immunantwort und die Umstrukturierung des Atemwegsepithels (*airway remodelling*), eingehend untersucht werden.<sup>38</sup> Um zukünftig auch die Auswirkungen von Tabakrauch in Hinsicht auf Dysfunktionen des Atemwegsepithels analysieren zu können, wurde ein *Drosophila*-Modell für eine Zigarettenrauchexposition während früher und somit besonders vulnerabler Entwicklungsphasen etabliert. Doch was sind vulnerable Entwicklungsphasen der Atemwege bei der Taufliege?

Im Gegensatz zu Säugern erfolgt die Entwicklung der Atemwege bei *Drosophila melanogaster* während der Embryogenese außerhalb des mütterlichen Organismus. Während der ersten Embryonalstadien entstehen zehn Paare trachealer Plakoden, die in die Körperkavität invaginieren und auf stereotype Weise ein weit verzweigtes Netzwerk bilden.<sup>88</sup> Terminale Äste, die für die Versorgung der umgebenden Organe und Gewebe zuständig sind, haben sich in ihrer Entwicklung als plastisch erwiesen, da die Anzahl der terminalen Äste sich aufgrund äußerer Einflussfaktoren wie beispielsweise Hypoxie verändern kann.<sup>88, 139</sup> Solche Veränderungen können während der gesamten larvalen Lebensphase einschließlich des dritten Larvenstadiums (L3) auftreten.<sup>139</sup> Aufgrund dieses Aspekts wird in der hier vorgelegten Arbeit die Phase der larvalen Entwicklung als Juvenilstadium definiert und als vulnerable Entwicklungsphase betrachtet.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur wenige Publikationen vor, die eine Zigarettenrauchexposition insbesondere im Larvenstadium von *Drosophila melanogaster* beschreiben.<sup>116, 140-143</sup> Aus diesem Grund wurde zunächst ein Rauchmodell *de novo* etabliert, bei dem der Fokus auf vulnerablen Entwicklungsphasen und einer geschlechtsspezifischen Betrachtung lag. Hierzu wurde eine hochentwickelte, kommerziell erhältliche Rauchexpositionsmaschine verwendet, die eine zuverlässige Parameterüberwachung und damit eine gezielte Reproduktion der experimentellen Bedingungen ermöglichte. Doch zunächst musste sichergestellt werden, dass der Zigarettenrauch tatsächlich in das Lumen der Tracheen gelangt und mit dem Atemwegsepithel interagiert. Dies wurde unter Zuhilfenahme spezifischer Marker überprüft. Über die Detektion des Nikotinmetaboliten Cotinin wurde eine Interaktion des Gewebes mit Zigarettenrauch verifiziert. Die Expressionsmessung der Gene *Cyp18a1* und *hsp70* im isolierten Atemwegsepithel diente ebenso der Überprüfung einer Aufnahme des Zigarettenrauchs in die Tracheen. Zudem wurden die Atemwegsepithelintegrität der Larve nach Zigarettenrauchexposition überprüft (s. Kapitel 4.1).

Der zweite Teil dieser Arbeit widmete sich basierend auf dem etablierten Rauchmodell der Frage, welche verhaltensbiologischen und pathologischen Folgen die Aufnahme von Tabakrauch über die Atemwege im weiteren Verlauf des Lebens der Taufliege hat (Kapitel 4.2). Diese Parameter werden in dieser Arbeit Fitnessparameter bezeichnet.

Im Zuge dieser Arbeit wurden ebenfalls Transkriptomprofile Zigarettenrauch-exponierter Atemwegsepithelien erstellt. Daher hatte der letzte Abschnitt dieser Arbeit zum Ziel die mittels der Transkriptomanalysen vorgefundenen, dysregulierten Prozesse auf ihre Relevanz bei der Entwicklung chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen zu überprüfen. Weiterhin sollte diskutiert werden, diese Prozesse Entwicklung morphologisch veränderter Atemwege begünstigen können. Abschließend soll hier ein Fazit gezogen werden, ob dieses Rauchmodell prinzipiell zur Untersuchung grundlegender Fragenstellungen chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen durch den Faktor Tabakrauch in direkt exponierten sowie späteren Generationen dienen kann (Kapitel 4.3).

## **4.1 Einfluss des Zigarettenrauchs auf die Physiologie**

### **4.1.1 Nikotinmetabolismus**

Nikotin ist ein sekundärer Pflanzenstoff, der die Pflanze als endogenes Insektizid vor Fressfeinden schützt. Wird Nikotin von Säugern aufgenommen, kann das Alkaloid im Zuge der Fremdstoffverstoffwechslung, dem Xenobiotikametabolismus, zu Cotinin umgesetzt und schließlich ausgeschieden werden. Bei *Drosophila melanogaster* ist derzeit nichts über den Nikotinmetabolismus

bekannt. Beim Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* konnte jedoch erfolgreich der Metabolit Cotinin nach längerer Zigarettenrauchexposition nachgewiesen werden.<sup>105</sup> Auch bei der Honigbiene *Apis mellifera*<sup>106</sup> sowie bei Larven des Tabakswärmers *Manduca sexta*<sup>119</sup> wurde nach oraler Gabe von Nikotin Cotinin als ein Stoffwechselprodukt gebildet. Es stellte sich daher die Frage, ob auch bei *Drosophila* Cotinin als Nikotinmetabolit gebildet wird und als spezifischer Zigarettenrauchbiomarker auch in dieser Arbeit genutzt werden kann.

Um eine Metabolisierung von Nikotin zu Cotinin zu überprüfen, wurde Nikotin in verschiedenen Konzentrationen an *Drosophila*-Larven über das Nährmedium verfüttert. Larven, denen Nährmedium mit der geringsten Nikotinkonzentration angeboten wurde, zeigten ein natürliches Fressverhalten und vergruben sich in das Medium. Währenddessen zeigten Larven, denen Medium angeboten wurde, welchem 20 mM und 50 mM Nikotin zugesetzt worden war, ein gänzlich anderes Verhalten. Sie mieden das Medium und hielten sich bewegungslos auf der Oberfläche auf. Mit Ausnahme sehr früher und sehr später Entwicklungsstadien verbringen *Drosophila*-Larven ihr Leben vergraben in ihrem Futtermedium. Ein Verlassen des Substrates entspricht einem instinktiven Vermeidungsverhalten als Reaktion auf bedrohliche Umweltbedingungen. Drei mögliche Aufnahmewege für das Alkaloid Nikotin kommen hierbei in Frage, die letztlich die Bewegungslosigkeit der Larven erklären können. Zum einen kann über Chemosensillen das Nikotin wahrgenommen werden. Zum anderen können die Larven das Alkaloid mit dem Nährmedium oral aufgenommen und über den Darm resorbiert haben, oder, als dritte Möglichkeit, wurde das Nikotin über das Integument resorbiert, was bereits als wichtiger Eintrittspfad für Insektizide beschrieben wurde.<sup>144</sup> Nach der Verfütterung des Nikotin-haltigen Mediums konnte Cotinin im Homogenat ganzer Larven nachgewiesen werden. Dabei nahmen die gemessenen Cotininkonzentrationen proportional zur eingesetzten Konzentration des Nikotins zu. Jedoch wurde nur bei der höchsten verwendeten Nikotinkonzentration eine statistisch signifikante Cotininmenge in Relation zu nicht mit Nikotin verfütterten Larven detektiert. Die vorliegenden Beobachtungen zeigen, dass *Drosophila*-Larven in der Lage sind, Nikotin zu Cotinin zu metabolisieren. Allerdings bewirken erst hohe Konzentrationen an Nikotin die Bildung signifikanter Cotininmengen. Möglicherweise liegt bei *Drosophila* ein anderer Primärmetabolit als Cotinin vor, zu dem das aufgenommene Nikotin umgesetzt wird. Hinweise darauf wurden bei Larven des Tabakswärmers *Manduca sexta* gefunden, bei dem nach oraler Gabe von Nikotin über eine Nikotin-N-Oxid-Zwischenstufe Cotinin-N-Oxid als Hauptmetabolit generiert wird.<sup>119</sup> Das Vorhandensein weiterer Nikotinmetabolite wurde in der hier vorliegenden Arbeit jedoch nicht analysiert.

Alternativ ist aber auch denkbar, dass die Umsetzung von Nikotin mit geringerer Geschwindigkeit verläuft als beispielsweise beim Menschen, bei dem die Halbwertszeit von Nikotin im Plasma etwa zwei Stunden beträgt.<sup>120</sup> Für Invertebraten ist die Metabolisierungsgeschwindigkeit jedoch unbekannt und vermutlich je nach Art und Entwicklungszeitpunkt variabel. Bei der Detektion des

Nikotinmetaboliten Cotinin wurde festgestellt, dass männliche Larven sich von weiblichen Larven in ihrer Fähigkeit Nikotin zu metabolisieren deutlich unterscheiden. Obwohl davon auszugehen ist, dass Larven beider Geschlechter, die ein vergleichbares Fressverhalten zeigen<sup>145</sup>, äquivalente Nikotinmengen aufgenommen haben, wiesen weibliche Larven mehrfach höhere Cotinin-konzentrationen als die männlichen Larven auf. Bei *Apis mellifera* konnten DU RAND *et al.* zeigen, dass ein hoher Energiebedarf für den Umsatz von Nikotin zu Cotinin besteht.<sup>106</sup> Auch der hier beobachtete verstärkte Abbau von Nikotin bei den Weibchen könnte so erklärt werden. Wie viele Arthropoden weisen weibliche adulte Taufliegen eine größere Körpermasse auf als Männchen und sie haben einen höheren Energiebedarf aufgrund der Produktion von Eiern<sup>146</sup>, was mit einer höheren Bereitstellung von Energiereserven einhergeht. Auch sind weibliche Larven schwerer als männliche<sup>147</sup>, weshalb die erhöhte Energiebereitstellung auch für dieses Entwicklungsstadium plausibel ist. Auch beim Menschen eliminieren interessanterweise Frauen, die Tabakprodukte konsumieren, das aufgenommene Nikotin effizienter als Männer.<sup>120</sup>

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob *Drosophila*-Larven nach einer einmaligen Zigarettenrauchexposition ebenfalls Cotinin bilden und somit Nikotin über den Rauch aufgenommen haben können. Obwohl zur Quantifizierung des Cotinins eine für humane Proben optimierte, sensitive ELISA-Methode verwendet wurde, konnte Cotinin in weiblichen Larven eindeutig infolge der Berauchung detektiert werden. Die bei *Drosophila* ermittelten Konzentrationen lagen jedoch unterhalb des vom Hersteller für die verwendete Methode angegebenen Grenzwerts von 5 ng. Gemäß Herstellerangaben enthält eine Zigarette 0,73 mg Nikotin. Für die Durchführung eines einstündigen Berauchungsexperiments wurden 24 Zigaretten verwendet, was einer Summe von 17,52 mg Nikotin vor der Verbrennung entspricht. Unter Vernachlässigung von Zersetzungsprozessen während der Lagerung der Zigarette, Veränderung der Konzentrationen durch den Verbrennungsprozess oder Adhäsion an Oberflächen gelangt maximal  $1,752 \cdot 10^{-9}$  g Nikotin/ $\mu$ l in die Rauchexpositionskammer. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird bei einer Berauchung das Nikotin vorrangig über die Atemwege aufgenommen (s. Kapitel 4.1.4). Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich vorgestellt (Kapitel 1.5), verfügen Larven über ein Paar anteriorer und ein Paar posteriorer Tracheenöffnungen, welche als Stigmen bezeichnet werden. Da die anterioren Tracheenöffnungen zum Zeitpunkt der Berauchung noch nicht geöffnet sind<sup>91</sup>, kann der Zigarettenrauch ausschließlich durch die posterioren Stigmen in die Tracheen gelangen. Die Menge an Nikotin, die final im larvalen Respirationssystem ankommt, kann durch die Vernachlässigung weiterer Aufnahmewege sowie Vereinfachungen bezüglich des Eintritts der Nikotinpartikel ausschließlich über den „Engpass“ posteriore Stigmen und der Verteilung innerhalb der Tracheen abgeschätzt werden. Da die Literatur keine expliziten Angaben zum Volumen larvaler Tracheen liefert, wurde für die weitere Abschätzung der aufgenommenen Nikotinmenge in das Atemwegsepithel das Atemwegsvolumen adulter

Taufliegen verwendet, welches  $1,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{l}$  beträgt.<sup>148</sup> Unter der Annahme, dass der Zigarettenrauch widerstandslos die Stigmen passiert, gelangen maximal 3,15 pg Nikotin in den Tracheen, welches vom Epithel resorbiert werden kann. Bei Analyse von zehn Larven sind damit maximal 31,15 pg Nikotin resorbiert worden. Ein weiterer Aspekt, der die marginale Menge an detektierbarem Cotinin erklären könnte, ist die Möglichkeit, dass analog zum Menschen mehrere Nikotinmetabolite existieren können<sup>120</sup>, die jedoch über die verwendete Methode nicht erfasst werden. Zusammengefasst hat sich die Detektion des Nikotinmetaboliten Cotinin als ungeeignet erwiesen, um als Marker für eine Zigarettenrauchexposition für beide Geschlechter zu dienen. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass die Taufliege durchaus in der Lage ist das Alkaloid Nikotin zu Cotinin umzusetzen und damit abzubauen.

#### 4.1.2 *Cyp18a1*-Expression

Beim Menschen katalysieren Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase (Cyp)-Enzyme der Familien 1 - 3 die Verstoffwechslung von Fremdstoffen ohne physiologische Funktion, ein Prozess, der als Xenobiotikametabolismus bezeichnet wird.<sup>12</sup> Das in diesen Prozess involvierte Enzym Cyp1a1 kommt vorwiegend im humanen Atemwegsepithel vor, ist aber auch in anderen extrahepatischen Geweben zu finden, wo es konstitutiv gebildet wird.<sup>12</sup> Die Substrate des Enzyms sind von planarer, hydrophober Natur und dahingehend setzt es auch Verbindungen wie die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH) um. Diese stellen einen wesentlichen Bestandteil des Tabakrauchs dar und sind in einer Vielzahl an Verbindungen hier vorhanden.<sup>11</sup> Daher wird stellvertretend für die PAH Benzo[*a*]pyren (B[*a*]p) als Leitsubstanz verwendet.<sup>12</sup> Eingeatmete, exogene PAH gelangen passiv über Diffusion in eine Epithelzelle<sup>149</sup>, bilden im Nukleus einen trimeren Komplex mit dem endogenen PAH-Rezeptor *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) und dem Translokator *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT).<sup>14</sup> Der Komplex bindet an die *xenobiotic response element* (XRE)-Konsensussequenz des DNA-Strangs und induziert die Transkription von *Cyp1a1*, welches wiederum den Abbau von PAH katalysiert.<sup>14</sup> Somit kann eine verstärkte Transkription des Gens als Biomarker für die Aufnahme von Tabakrauch in die Atemwege genutzt werden, sofern andere potentielle Quellen auszuschließen sind.

*Cyp18a1* weist nach einem Proteinsequenzabgleich mittels *flybase*<sup>1</sup> bei *Drosophila melanogaster* die höchste Homologie zum humanen Cyp1a1 auf. Das für *Cyp18a1* kodierende Gen *Cyp18a1* wurde daher ausgewählt, um als potentieller Biomarker für das Rauchmodell zu fungieren. Ergänzend zur Analyse des Nikotin-Cotinin-Metabolismus wurde daher die Expression des Gens *Cyp18a1* in der Taufliege nach Exposition mit Zigarettenrauch gemessen.



#### 4.1.2.1 *Cyp18a1* als Komponente des Xenobiotikametabolismus bei *Drosophila*

*Cyp18a1* ist vor allem am Katabolismus des Steroidhormons 20-Hydroxyecdysone (20E) beteiligt und spielt somit eine tragende Rolle bei der Metamorphose der Larve zum erwachsenen Insekt.<sup>121, 122</sup> Eine Rolle im Xenobiotikametabolismus ist bisweilen nicht beschrieben, aber es existieren Hinweise auf die Funktion von Cyp im Allgemeinen als Fremdstoff metabolisierende Enzyme. Beispielsweise wird berichtet, dass Taufliegen, die resistent gegenüber dem Neonikotinoid Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) sind, eine gesteigerte, basale *Cyp6a2*-Expression aufweisen.<sup>150</sup> Dass auch PAH zu den Cyp-aktivierenden Substanzen bei *Drosophila melanogaster* gehören könnten, legt eine Untersuchung bei einer B[a]p-sensitiven *Drosophila simulans*-Mutante nahe, die eine erhöhte Cyp-Aktivität bei Exposition mit B[a]p aufweist.<sup>151</sup> Studien mit *Drosophila* haben eine Reihe von Genen identifiziert, die durch Xenobiotika aktiviert werden, wozu auch *Cyp18a1* gehört.<sup>152, 153</sup> Außerdem verfügt *Drosophila* sowohl über einen zum AhR homologen Transkriptionsfaktor (Spineless)<sup>154</sup>, ein Homolog zum Protein ARNT (Tango)<sup>155</sup> als auch über eine XRE-ähnliche Sequenz in der Promotorregion des *Cyp6b1*-Gens<sup>156</sup>, was darauf hinweist, dass es sich bei dem Xenobiotikametabolismus um einen konservierten Prozess zwischen Mensch und Taufliege handelt. Die Summe dieser Aspekte deutet mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass *Cyp18a1* bei *Drosophila* ebenfalls eine Komponente des Xenobiotikametabolismus sein kann. Daher kann seine Expression stellvertretend für die Aufnahme von Zigarettenrauch durch die Taufliege quantifiziert werden.

#### 4.1.2.2 *Cyp18a1* bei ganzen Larven

Für die Etablierung des Rauchexpositionsmodells wurde zunächst die basale *Cyp18a1*-Expression bei ganzen Larven bestimmt. *Cyp18a1* wird besonders in der späten Phase der larvalen Entwicklung infolge des Anstiegs von 20E reguliert.<sup>121, 122</sup> Um hier möglichst einheitliche, experimentelle Bedingungen zu schaffen, wurden die Zigarettenrauchexpositionsversuche mit Larven durchgeführt, die aus synchronisierten Eiablagen hervorgingen und sich im dritten Entwicklungsstadium etwa sieben Stunden vor der Verpuppung befanden. Auf diese Weise können entwicklungsabhängige 20E- und darauf zurückzuführende *Cyp18a1*-Schwankungen ausgeschlossen werden.

Des Weiteren ist bekannt, dass auch der intrinsische zirkadiane Rhythmus Auswirkungen auf die Expression Cyp-Genen und Synthese von Cyp-Enzymen hat.<sup>157-160</sup> Da alle Versuche stets zur gleichen Tageszeit durchgeführt wurden, können durch den zirkadianen Rhythmus beeinflusste Expressionsschwankungen von *Cyp18a1* ebenfalls ausgeschlossen werden.

Eine Exposition der *Drosophila*-Larve mit Tabakrauch hatte eine deutliche Erhöhung der *Cyp18a1*-Expression im gesamten Organismus zur Folge. Larven beider Geschlechter reagierten dabei gleichermaßen auf die Exposition. Die Aktivierung der *Cyp18a1*-Expression weist darauf hin, dass das *Drosophila*-eigene Cyp-Gen in seiner Funktion dem humanen *Cyp1a1*-Gen äquivalent sein und eine

Rolle im Abbau exogener Schadstoffe innehaben kann. An dieser Stelle ist es jedoch noch nicht möglich zu sagen, auf welche Weise die Larven den Zigarettenrauch aufgenommen und detektiert haben. Um aber ein der beim Menschen nahekommendes Modell für die Erforschung der Folgen von Zigarettenrauch auf das Atemwegsepithel zu erhalten, ist eine Aufnahme in die Atemwege zwingend erforderlich (s. Kapitel 4.1.4).

#### 4.1.2.3 *Cyp18a1* bei *Drosophila*-Imagines

Ebenfalls wurden innerhalb dieser Arbeit die *Cyp18a1*-Expressionslevel bei adulten Tieren ermittelt. Die Datenbank *flybase*<sup>1</sup> gab bereits Hinweise darauf, dass konstitutives *Cyp18a1* allgemein wenig, jedoch stärker im Kopf als in anderen Geweben exprimiert wird. Aufgrund dessen wurde die Genexpression im Kopf separat analysiert, während Thorax und Abdomen zusammen untersucht wurden. Insgesamt lag der Expressionsspiegel um etwa den Faktor zwei niedriger als bei den Larven (0,5x im Vergleich zur Luftkontrolle). Bei kumulativer Betrachtung der Expression in Kopf, Thorax und Abdomen ist demnach eine vergleichbare *Cyp18a1*-Transkriptmenge wie in ganzen Larven vorzufinden. Gleichzeitig wurde jedoch auch eine halb so hohe Zigarettenrauchkonzentration wie im Rauchmodell für die *Drosophila*-Larven verwendet, sodass die verminderte relative Expression von *Cyp18a1* mit der applizierten Zigarettenrauchdosis vermutlich abhängig vom Entwicklungsstadium ist. Die geringere Zigarettenrauchdosis war hierbei auf die sensiblere Reaktion der Imagines auf den Rauch zurückzuführen (s. auch Kapitel 3.4).

*Cyp18a1* konnte in Köpfen von berauchten Tieren beider Geschlechter sowie im Thorax-Abdomen-Homogenat von männlichen Imagines direkt nach Expositionsende detektiert werden. Bei Weibchen hingegen wurde eine Erhöhung von *Cyp18a1* im Thorax-Abdomen-Homogenat erst nach Beendigung der Exposition gemessen.

Die erhöhte *Cyp18a1*-Expression im Kopf im Vergleich zum übrigen Korpus korreliert gleichzeitig mit zwei potentiellen Induktionswegen. Da bei den Larven der Zigarettenrauch über die Stigmen aufgenommen wird (s. Kapitel 4.1.4), erfolgt die Aufnahme von Zigarettenrauch bei adulten Tieren wahrscheinlich auch über die in diesem Stadium Spirakel genannten Öffnungen des Trachealtraktes. Diese sind in neun Paaren bilateral symmetrisch am Thorax und am Abdomen verteilt.<sup>94</sup> Erst nach dem Eindringen des Zigarettenrauchs in den Fliegenkorpus über die Spirakel kann dieser über Diffusion, unterstützt durch Muskelkontraktionen wie die Bewegung der Flügel<sup>90</sup>, in andere Bereiche des Korpus wie zum Beispiel in den Thorax oder Abdomen gelangen, wie es auch bei den Weibchen beobachtet wurde. Diese Annahme müsste sich aber auch in einer verzögerten und/oder weniger starken Expression in den Köpfen äußern. Dies könnte unter anderem durch die in Relation zum übrigen Gewebe vielen Tracheen bzw. Luftsäcke in den Köpfen kompensiert werden.

Die *Cyp18a1*-Expression wird möglicherweise nicht nur im Kopf über den Kontakt der dort befindlichen Luftsäcke mit Zigarettenrauch induziert. Da die im Zigarettenrauch befindlichen PAH

Pheromon-ähnliche Molekülstrukturen besitzen und erwiesenermaßen als endokrine Disruptoren auch Pheromon-abhängige Prozesse stören können<sup>161, 162</sup>, ist denkbar, dass PAH auch über sensorische Neuronen, die an den Maxillarpalpen und Antennen je am Kopf zu finden sind<sup>163</sup>, erkannt werden. Aufgrund der vermutlich indirekten Beteiligung von *Cyp18a1* an der Pheromonsynthese<sup>164</sup> ist möglich, dass auch PAH von sensorischen Neuronen am Kopf detektiert werden und zur Induktion von *Cyp18a1* im Kopf direkt beitragen können.

#### 4.1.2.4 Sexueller Dimorphismus bei der *Cyp18a1*-Expression

Im Zuge der Transkriptomanalysen der Tracheen von *Drosophila*-Larven wurde infolge einer Exposition mit Zigarettenrauch eine verstärkte Expression einer Vielzahl von *Cyp*-Genen detektiert. Dabei wurden zwischen Männchen und Weibchen Unterschiede in der Erhöhung der Expression vieler *Cyp* beobachtet. Beim Menschen konnte in verschiedenen Studien beobachtet werden, dass Raucherinnen eine stärkere Induktion von *Cyp1a1* aufweisen als Raucher.<sup>165, 166</sup> Und auch bei weiblichen *Drosophila*-Larven konnte mittels der qRT-PCR eine deutlich stärkere Aktivierung des *Cyp18a1*-Gens festgestellt werden.

Aber bereits bezüglich der basalen *Cyp*-Expression bei adulter *Drosophila melanogaster* sind geschlechtsspezifische Unterschiede bekannt.<sup>152, 167</sup> Beispielsweise handelt es sich bei *Cyp312a1* um ein Gen, welches stärker bei Männchen im Vergleich zu Weibchen exprimiert wird.<sup>167</sup> Diese Expressionsunterschiede zwischen den Geschlechtern sind gemäß der Studie möglicherweise auf hormonabhängige Prozesse zurückzuführen.<sup>167</sup> Auch der Xenobiotikametabolismus, welcher gemäß der Indizien aus dieser Arbeit vermutlich auch bei der Taufliede *Cyp*-Gene involviert, wurde bei *Drosophila* bereits von LEGOFF *et al.* als geschlechtsspezifisches Merkmal bezeichnet.<sup>152</sup> Jedoch erzeugt ein Xenobiotikum bei verwandten Genen kein gleich gerichtetes Expressionsprofil, vielmehr ist die Expression charakteristisch für das Gen im jeweiligen Geschlecht und abhängig vom Substrat.<sup>152</sup> Da viele Gene, die durch Xenobiotika wie Atrazin und Phenobarbital induziert werden, den Hormonmetabolismus kontrollieren<sup>152</sup>, könnten Hormone wie 20E wiederum für die geschlechtsspezifische, Tabakrauch-induzierte Genexpression mitverantwortlich sein. Beim Menschen kommen bestimmte Sexualhormone in charakteristischen Mengen für das jeweilige Geschlecht vor. Auch bei frisch geschlüpften *Drosophila*-Imagines unterscheiden sich die Spiegel des Steroidhormons Ecdyson, dem Vorläufer von 20E, zwischen Männchen und Weibchen voneinander.<sup>168</sup> Die Titer wurden jedoch bei *Drosophila*-Larven bisher nicht bestimmt. In Larven von anderen Insektenarten gibt es jedoch Belege, dass sich durchaus die Ecdysontiter zwischen Männchen und Weibchen zu einigen Zeitpunkten der larvalen Entwicklung voneinander unterscheiden.<sup>169-171</sup> Es ist denkbar, dass unterschiedliche Hormontiter ursächlich für die beobachtete, geschlechtsabhängige Induktion von *Cyp18a1* im Atemwegssystem von *Drosophila*-Larven sind. Da weibliche Larven trotz synchronisierter Eiablage später in das Puppenstadium übergehen<sup>147</sup>, könnte der vorliegende Unterschied zwischen

den Geschlechtern anteilig aber auch durch den unterschiedlichen Entwicklungsstand herrühren, welcher unterschiedliche Ecdysontiter bedingt<sup>121</sup>.

### 4.1.3 *hsp70*-Expression

Während *Cyp18a1* für die Verwendung als Zigarettenrauch-spezifischer Biomarker etabliert wurde, diente das Gen *Hitzeschockprotein 70 kDa (hsp70)* als universeller Stresssensor, da es durch zellschädigende Bedingungen wie hohe Temperaturen oder Strahlung vermehrt exprimiert wird.<sup>123</sup> Aber auch infolge von oxidativem Stress, der unter anderem mit der Inhalation von Zigarettenrauch einhergeht<sup>15</sup>, wird Hsp70 vermehrt synthetisiert<sup>123</sup>, da es als Chaperon für die Rückfaltung degradierter Proteine zuständig ist<sup>19</sup>. Daher wurde untersucht, ob das für Chaperon kodierende Gen *hsp70* auf Zigarettenrauch auch bei *Drosophila* mit einer Expressionszunahme reagiert.

#### 4.1.3.1 *hsp70* bei ganzen Larven

Direkt im Anschluss an eine Zigarettenrauchexposition war eine Zunahme der *hsp70*-Transkripte im gesamten Larvenhomogenat nachweisbar. In der Tat handelt es sich bei *hsp70* um ein sehr sensibles, schnell aktivierbares Gen<sup>172, 173</sup>, das eine unmittelbare schützende Wirkung bei zellulärem Stress erfüllt. Ein Zug an einer Zigarette enthält bis zu 10<sup>15</sup> Oxidantien, zu denen kurzlebige Hydroxylradikale und auch langlebige Semichinonradikale gehören.<sup>15</sup> Zusätzlich werden durch den Fremdstoff-metabolismus reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) generiert. So kommt es beispielsweise bei der Cyp-katalysierten Umsetzung von PAH wie B[a]p, welches bei der unvollständigen Verbrennung von Tabakrauch entsteht, zu einer metabolischen Aktivierung von B[a]p, bei der Radikale gebildet werden.<sup>13</sup> Diese konfrontieren ihrerseits den Organismus mit zusätzlichem oxidativen Stress. Dieser „Ansturm“ an ROS ist vermutlich für die starke Zunahme von *hsp70*-Transkripten verantwortlich.

Auch in NL9-Zellen, einer Lungenfibroblastenzellkulturlinie, wird die Hsp70-Synthese durch Zigarettenrauch aktiviert.<sup>174</sup> Von der Vielzahl an Inhaltsstoffen des Tabakrauchs aktivieren unter anderem Nikotin und Kohlenstoffmonoxid die Transkription von *hsp70* in Nagern.<sup>175, 176</sup> Auch *in vitro* konnte YANG *et al.* zeigen, dass Hsp70 in humanen Bronchialepithelzellen durch die Anwesenheit des PAH B[a]p induziert wird.<sup>177</sup> Dies legt nahe, dass innerhalb des in dieser Arbeit verwendeten *Drosophila*-Modellsystems ebenfalls mehrere Komponenten im Tabakrauch die *hsp70*-Expression induzieren können.

#### 4.1.3.2 *hsp70* bei *Drosophila*-Imagines

Die *hsp70*-Expression der Imagines war im Vergleich zum Larvenhomogenat um etwa 50 % reduziert, wobei die Expression im Kopf und im restlichen Körper (Thorax und Abdomen zusammengefasst) individuell betrachtet wurde. Bei Betrachtung der Gesamtexpression von *hsp70* in beiden

Homogenaten der adulten Taufliege ist die Expression ähnlich zu der Expression im gesamten Larvenhomogenat (s. Abb. 3.21). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die erwachsenen Taufliegen einer geringeren Rauchdosis ausgesetzt wurden, kann daraus geschlossen werden, dass erwachsene Taufliegen eine stärkere Aktivierung von *hsp70* nach einer Zigarettenrauchexposition zeigen dürften. Dies deutet auf unterschiedliche Sensibilitäten gegenüber Zigarettenrauch in den beiden Entwicklungsphasen hin. Nach derzeitigem Kenntnisstand vergleicht nur eine weitere Studie das larvale und das adulte Entwicklungsstadium direkt miteinander, jedoch bei Konfrontation mit Anoxie.<sup>178</sup> Dabei wird dem Metabolismus eine tragende Rolle bei den unterschiedlichen Sensibilitäten der einzelnen Entwicklungsstadien gegenüber Anoxie zugeschrieben.<sup>178</sup> Möglicherweise ist auch bei einer Zigarettenrauchexposition der Metabolismus für die in dieser Arbeit detektierten Expressionsunterschiede zwischen Larve und Imago mitverantwortlich. Aber auch verschiedene Zustände des Immunsystems können die unterschiedlichen Sensibilitäten zwischen Larve und Imago bedingen. So liegt beispielsweise bei den Larven der Stechmücke *Anopheles gambiae* nach einer Infektion mit verschiedenen Bakterien eine stärkere Immunantwort vor als bei fünf Tage alten, adulten Tieren.<sup>179</sup> Unter anderem sind die Genexpressionen von verschiedenen, immunrelevanten Genen des Toll-, des *immune deficiency* (IMD)- und des Januskinase/*signal transducer and activator of transcription* (Jak/STAT)-Signalwegs verändert. Aber auch mit oxidativem Stress assoziierte Gene sowie *Cyp*-Gene, die in die Ecdysteroidbiosynthese involviert sind, variieren in ihrer Expression.<sup>179</sup> Die Auswirkungen von Zigarettenrauch, dem durch den Eintrag von Mikroorganismen<sup>180</sup> und Lipopolysaccharid (LPS)<sup>181</sup> inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben wird, sind damit möglicherweise abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstadium. Durch eine stärkere Aktivierung mit oxidativem Stress assoziierter Gene ist das larvale Entwicklungsstadium von *Drosophila* möglicherweise ebenfalls weniger sensibler gegenüber die Auswirkungen von Zigarettenrauch als Imagines, wie es auch innerhalb dieser Arbeit beobachtet wurde.

Möglicherweise ist die relativ zu den Larven stärker induzierte *hsp70*-Expression bei den Imagines auch durch die Dosis (Zugzahl während der Zigarettenrauchexposition) bedingt. Die Dosis wird als aufgenommene Menge pro Körpergewicht definiert, wobei höhere Dosen stärkere Auswirkungen haben. Es ist bekannt, dass *Drosophila*-Imagines ein Bruchteil des Körpergewichtes der Larven aufweisen.<sup>182</sup> Eine aufgenommene, höhere Rauchdosis im Organismus adulter Tieren könnte damit eine stärkere Induktion von *hsp70* bei den Imagines im Vergleich zu Larven bedingen (bei Extrapolation der kumulativen Genexpression auf die Zigarettenrauchdosis angewendet bei der Larve).

Da bei Larven der Zigarettenrauch nachweislich durch die Stigmen in das Innere der Tracheen gelangt (s. Kapitel 4.1.4), kann dergleichen auch bei Imagines angenommen werden. Erwachsene Taufliegen verfügen im Gegensatz zu Larven über neun Spirakelpaare, die sich lateral am Abdomen und Thorax

befinden. Des Weiteren ist der Sauerstoffbedarf der Imagines aufgrund ihrer fliegenden Fortbewegungsweise deutlich höher als der der Larven und folglich bedürfen Imagines eines höheren Luftaustausches. Im gleichen Zeitraum nehmen Imagines somit eine höhere Rauchdosis in ihre Tracheen auf als Larven, was zu einer stärkeren *hsp70*-Reaktion führt, die in erster Linie auf das Epithel der Atemwege zurückzuführen ist.

Anders als bei Larven wiesen Imagines eine zeitlich verzögerte *hsp70*-Expressionserhöhung infolge einer Zigarettenrauchexposition im Vergleich zur Luftkontrolle auf. Möglicherweise verursacht die Regulation über die Spirakel vermittelte Umgebungsluftzufuhr die beobachtete, verzögerte Expression von *hsp70*. Die Imagines können ihre Spirakel durch Muskelkontraktionen verschließen, um so den Feuchtigkeitshaushalt, den Sauerstoffbedarf sowie den Kohlenstoffmonoxidausstoß zu steuern.<sup>183-185</sup>

Eine Öffnung wird daher besonders beim Fliegen beobachtet, um die Sauerstoffzufuhr zu erhöhen.<sup>185</sup>

HEYMANN und LEHMANN wiesen nach, dass adulte Taufiegen zehn Minuten bei artifiziellem Verschluss sämtlicher Spirakel überleben.<sup>184</sup> CALLIER *et al.* hingegen fanden in ihren Experimenten, dass adulte Taufiegen anoxische Bedingungen, was prinzipiell mit einem vollständigen Verschluss der Spirakel gleichgesetzt werden kann, mehrere Stunden überleben.<sup>178</sup> Da die Arbeitsgruppen verschiedene Stämme verwendet haben, ist die Diskrepanz zwischen den beiden Studien möglicherweise genetisch bedingt. Aber auch andere Faktoren, wie beispielsweise die fehlende Regulation des Feuchtigkeitshaushaltes, die bei Anoxie prinzipiell möglich sein sollte, bei artifiziellem Verschluss wie bei HEYMANN und LEHMANN<sup>184</sup> hingegen nicht, mögen dafür verantwortlich sein. Nichtsdestotrotz weisen beide Studien darauf hin, dass Imagines eine beeinträchtigte Sauerstoffzufuhr durchaus für einen gewissen Zeitraum tolerieren können. Mit großer Wahrscheinlichkeit verschließen die Taufiegen auch während der durchgeführten Zigarettenrauchexposition zeitweise ihre Spirakel. Der Zigarettenrauch gelangt dann verzögert in den Respirationstrakt und eine Erhöhung der Genexpression würde erst verspätet einsetzen. Unter anderem können Imagines eine beeinträchtigte Sauerstoffzufuhr auch durch Deregulierung ihres Metabolismus überleben.<sup>178</sup> Bei Verschluss ihrer Spirakel während einer Zigarettenrauchexposition ist möglicherweise die verminderte Metabolismusrate ebenfalls ursächlich für die verzögerte Expression von *hsp70*.

#### 4.1.3.3 Sexueller Dimorphismus bei der *hsp70*-Expression

Bei ganzen Larven, im Atemwegsepithel der Larve, in den Köpfen sowie im Thorax und Abdomen adulter Taufiegen wurde infolge der Exposition mit Zigarettenrauch jeweils eine stärkere *hsp70*-Expression bei den Männchen als bei den Weibchen beobachtet.

Durch den oxidativen Stress, den der Zigarettenrauch mit sich bringt<sup>15</sup>, werden Chaperone wie Hsp70 aktiviert<sup>123</sup>. Auch in dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Zigarettenrauch in verschiedenen Geweben und Stadien von *Drosophila* die Expression von *hsp70* induziert. Dabei wurde beobachtet, dass Männchen nach einer Exposition mit Tabakrauch *hsp70* stärker exprimieren als Weibchen.

Dabei sind mehrere Gründe denkbar, warum sich die Zigarettenrauch-induzierte Expression zwischen den Geschlechtern voneinander unterscheidet. Unter anderem wurde bereits in der Literatur über eine geschlechtsspezifische Induktion von Hsp70 bei adulten Taufliegen berichtet: Bei Konfrontation mit thermalen Stress zeigt sich, dass bei *Drosophila*-Imagines die Männchen stärker Hsp70 synthetisieren als die Weibchen.<sup>186</sup> Auch in Küken der Schwanengans *Anser cygnoides* wird durch thermischen Stress eine stärker ausgeprägten *hsp70*-Expression in der Lunge wie auch im Cerebellum bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen beobachtet.<sup>187</sup> Möglicherweise reagieren Weibchen generell weniger sensibel auf eine Zigarettenrauchexposition. Bei *Drosophila* ist bereits bekannt, dass weibliche Imagines ein effizienteres Abwehrsystem gegen ROS besitzen, da die Aktivität von antioxidativen Enzymen wie Superoxiddismutase (Sod) und Katalase (Cat) bei Weibchen erhöht ist.<sup>188</sup> In dieser Arbeit wurden ebenfalls Hinweise auf einen effizienteren Abwehrmechanismus bei den Weibchen gefunden, da im Zuge der Quantifizierung des GFP-Signals in den Atemwegen der transgenen Reporterlinie *hsp70*-GFP tendentiell höhere GFP-Basallevel in den Atemwegen weiblicher Larven beobachtet wurden (s. Abb. 3.9). Dies deutet darauf hin, dass bei Weibchen die Kapazität mit oxidativem Stress umzugehen intrinsisch bereits höher ist als bei *Drosophila*-Männchen. Dahingegen wurden nach einer Zigarettenrauchexposition jedoch vergleichbare Fluoreszenzintensitätslevel bei beiden Geschlechtern detektiert, sodass dies auf eine stärkere Aktivierung von *hsp70* durch Zigarettenrauch bei den Männchen hinweist. Dies konnte durch die Genexpressionsdaten von *hsp70* bestätigt werden. Beim Menschen besitzt *hsp70* eine Funktion beim Schutz vor einer akuten Lungenschädigung durch die Inhibition der Caspase-abhängigen Apoptose.<sup>189</sup> Eine Expression von *hsp70* könnte auch im respiratorischen Epithel der Larve durch Zigarettenrauch hervorgerufen werden, damit der Atemwegstrakt geschützt wird. Zigarettenrauch hat bekanntermaßen auch eine Nekrose-induzierende Wirkung inne.<sup>190</sup> Eine Studie konnte dabei zeigen, dass *hsp70* infolge von Nekrosen, nicht jedoch Apoptosen generiert wird.<sup>191</sup> Es ist denkbar, dass die höhere Transkriptmenge von *hsp70* in den Atemwegen der männlichen Larven im Vergleich zu den Weibchen auch daher resultiert, dass bei den Männchen vorwiegend nekrotische, bei den Weibchen hingegen vermehrt apoptotische Prozesse in den Atemwegen nach Zigarettenrauchexposition auftreten. Die Transkriptomanalysen unterstützen diese These, da nur bei Weibchen vermehrt Gene durch Zigarettenrauch moduliert wurden, die mit der Apoptose assoziiert werden (s. Abb. 3.13).

Ist eine Vielzahl von Zellen nekrotisch, so kann sich dies in verringerten Überlebensraten äußern. Eine reduzierte Überlebensrate hingegen wurde ausschließlich bei männlichen Larven und Imagines beobachtet (s. Abb. 3.9). Dies unterstreicht wiederum die Hypothese, dass *Drosophila*-Männchen sensibler auf Zigarettenrauch reagieren. Bedingt durch das höhere Körpergewicht weiblicher *Drosophila* im Vergleich zu männlicher<sup>192, 193</sup> unterscheiden sich die aufgenommenen Rauchmengen

pro Kilogramm Körpergewicht (Dosen) vermutlich nach der Berauchung trotz identischer Bedingungen während der Zigarettenrauchexposition. Männliche Larven sind daher möglicherweise effektiv höheren Rauchdosen ausgesetzt.

#### 4.1.4 Der Atemwegstrakt als Eintrittspforte für Zigarettenrauch

Die zentrale Frage, die sich im Laufe der Arbeit entwickelte, war, ob das Atemwegsepithel in direktem Kontakt mit dem Zigarettenrauch steht. Zum einen war denkbar, dass Zigarettenrauch die Integrität der Atemwege verändert und sollte daraufhin als Ausleseparameter genutzt werden. Zum anderen sollte sich bei Kontakt der Atemwege mit dem Tabakrauch die Genexpression spezifisch in diesen reguliert werden. Besonders für eine zukünftige Nutzung des Modells für die Untersuchung von Fragestellungen, die den Einfluss von Zigarettenrauch auf chronisch-entzündliche Atemwegserkrankungen betreffen, ist dies wichtig zu hinterfragen.

##### 4.1.4.1 Die Integrität des Atemwegsepithels

Mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung des Atemwegsepithels wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Zigarettenrauchexposition die Atemwegsepithelintegrität verändert. Es ist bekannt, dass die Bronchiepithelzellgewebe bei Tabakkonsumenten eine erhöhte Permeabilität aufweist, welche infolge der verminderten Synthese von Bestandteilen der *Adherens Junctions* wie E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin hervorgerufen wird.<sup>52</sup> Ebenso liegen in Atemwegszellen Proteinlevel von Komponenten der *Tight Junctions* wie *zonula occludens 1* (ZO-1) durch Zigarettenrauch vermindert und vor.<sup>54</sup> Die Integrität von Zellverbänden wird bei *Drosophila* durch *Septate Junctions* vermittelt, die eine analoge Funktion zu *Tight Junctions* beim Menschen einnehmen.<sup>124</sup> Indizien für eine veränderte Zellintegrität fanden sich durch die in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen. In dieser lagen die Etablierung des planaren Zellpolarität (PCP)-Signalwegs, der auch *Septate Junctions*-Proteine beinhaltet, sowie die Zelladhäsion als durch Zigarettenrauch dysregulierte biologische Prozesse in den Tracheen weiblicher Larven vor (s. Abb. 3.14). Jedoch konnten keine morphologischen Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte nach einer Berauchung festgestellt werden. Dies zeigt, dass die hier verwendeten Parameter, also eine einmalige Exposition mit Zigarettenrauch mit 24 Zigaretten innerhalb einer Stunde, nicht unmittelbar zu einer Veränderung der Atemwegsepithelintegrität führt und somit keine Schäden an den larvalen Atemwegen entstehen.

##### 4.1.4.2 *Cyp18a1* und *hsp70* im Atemwegsepithel

Drei mögliche Aufnahmewege von Zigarettenrauch kommen bei einer Zigarettenrauchexposition von Larven in Frage. Zum einen kann der Zigarettenrauch mit der Außenluft über die larvalen Tracheenöffnungen, den Stigmen, in die Atemwege eintreten und, anteilig unterstützt von Muskelkontraktionen, passiv durch Diffusion im Atemwegssystem verteilt werden. Zum anderen



können insbesondere gasförmige Bestandteile und Aerosole aus dem Zigarettenrauch über die Kutikula resorbiert werden. Die dritte Möglichkeit ist eine orale Aufnahme von Rauchbestandteilen, die sich auf der Oberfläche des Nährmediums abgelagert haben.

Um den Beitrag des respiratorischen Epithels bei der Expression von *Cyp18a1* sowie *hsp70* nach Kontakt mit Zigarettenrauch in Relation zum verbleibenden Larvenkorpus nachvollziehen zu können, wurden die Transkriptmengen des Atemwegsepithels und des restlichen, larvalen Homogenats quantifiziert.

Eine *Cyp18a1*-Synthese wurde bereits von GUITTARD *et al.* in verschiedenen Organen der Taufliegenlarve nachgewiesen, jedoch wurde diese nicht in den Atemwegen untersucht.<sup>121</sup> Da Epithelien die erste Kontaktfläche für Xenobiotika darstellen, denen der Körper ausgesetzt ist, ist es nicht verwunderlich, dass Xenobiotika metabolisierende Enzyme insbesondere in epithelialen Geweben vorkommen.<sup>194</sup> *Cyp18a1* wird innerhalb dieser Arbeit eine Funktion im Xenobiotika-metabolismus zugeschrieben (s. Kapitel 4.1.2.1). Entsprechend konnte in dieser Arbeit auch in den Tracheen der *Drosophila*-Larve eine basale *Cyp18a1*-Expression detektiert werden, die nach einer Zigarettenrauchexposition um ein Vielfaches erhöht war.

Auch in der Studie von KREBS *et al.* war das Hsp70-Basallevel bei *Drosophila*-Larven in diversen Organen kaum detektierbar, das Chaperon wurde aber verstärkt nach thermischen Stress gebildet.<sup>195</sup> Doch auch hier wurde das Atemwegssystem nicht in Hinsicht auf die Hsp70-Synthese untersucht.<sup>195</sup> Für das Atemwegsepithel, welches in Kontakt mit der Umwelt und damit auch ROS steht, ist das Vorkommen von Chaperonen, die gegen oxidativen Stress wirken<sup>123</sup>, nur logisch. Auch mittels der vorliegenden Arbeit konnte Vergleichbares wie bei KREBS *et al.*<sup>195</sup> festgestellt werden: Während die konstitutive Expression von *hsp70* nur marginal war, wurde nach Zigarettenrauchexposition eine starke Zunahme der *hsp70*-Transkripte in den Atemwegen beobachtet.

Weil im verbleibenden, tracheenfreien Homogenat ebenfalls eine Zigarettenrauch-induzierte Erhöhung der *Cyp18a1*- und *hsp70*-Transkripte gemessen wurde, kann eine Resorption von Zigarettenrauch über die Kutikula oder den Darm nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die gemessene, verstärkte *Cyp18a1*- und *hsp70*-Expression könnten aber auch auf in der Larve verbliebene Tracheenfragmente zurückzuführen sein, da eine vollständige Separation der Atemwege vom umgebenen Gewebe technisch nicht umsetzbar ist. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sich Weibchen direkt nach der Zigarettenrauchexposition aktiver verhalten als männliche Larven (s. Abb. 3.17). Die erhöhten *Cyp18a1*-Niveaus sowie die starke Varianz dessen im verbleibenden Larvenmaterial der Weibchen könnten daher aufgrund eines stärker vorhandenen Fressverhaltens resultieren (s. auch Kapitel 4.1.1), da Weibchen weniger sediert waren (s. Abb. 3.17). Diese könnte wiederum mit einer erhöhten Aufnahme abgelagerter Partikel über das Medium einhergehen.

Anders als bei *Cyp18a1* handelt es sich bei *hsp70* um einen sehr sensitiven Stresssensor<sup>172</sup>, der durch verschiedenste Stimulantien wie oxidativen Stress, im Zigarettenrauch enthaltene Giftstoffe oder aber auch die Handhabung der Larven vor dem Experiment aktiviert werden kann und vermutlich in einem geringen Maße ebenfalls zur Expressionserhöhung im verbleibenden Larvenhomogenat beiträgt. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse jedoch, dass der Zigarettenrauch das Lumen der Atemwege erreicht, die Tracheen an der Aufnahme von Zigarettenrauch in den Organismus maßgeblich beteiligt sind und andere mögliche Aufnahmewege keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Im Anschluss an den Nachweis einer erfolgreichen Aufnahme des Zigarettenrauchs in die Atemwege der Larve wurde die Verteilung des Rauchs im tubulären System der Tracheen untersucht. Hierzu wurde die *Cyp18a1*- und *hsp70*-Expression gesondert in der anterioren und in der posterioren Hälfte der Tracheen betrachtet, um die Reichweite des Zigarettenrauchs in den Tracheentrakt hinein zu überprüfen. Die *hsp70*-Transkriptmenge war am kaudalen Ende der Larve, also im posterioren Bereich, am stärksten und nahm entlang der posterior-anterioren Achse ab. Dahingegen war die *Cyp18a1*-Expression im anterioren Tracheenabschnitt etwa zweifach höher als im posterioren Teil.

*Drosophila* weist keine aktive Atmung auf und der Eintritt der Umgebungsluft über die Stigmen und die Verteilung der Luft im Atemwegssystem erfolgt zwar größtenteils passiv über Diffusionsvorgänge, wird jedoch durch Muskelkontraktionen bei der Fortbewegung der Larve unterstützt. Der Durchbruch der anterioren Tracheenöffnungen durch die Kutikula findet erst im späten L3-Stadium der larvalen Entwicklung statt.<sup>91</sup> Folglich sind die anterioren Tracheenöffnungen zum Zeitpunkt der Rauchexposition noch verschlossen und der Zigarettenrauch tritt ausschließlich über die posterioren Spirakel in die Atemwege ein. Dadurch entsteht vermutlich ein Rauchkonzentrationsgradient, bei dem posterior mehr Zigarettenrauch vorhanden ist und die Konzentration in Richtung anteriorer Stigmen abnimmt. Dies wiederum wird durch die *hsp70*-Expression widergespiegelt, die ebenfalls posterior stärker war als anterior. Mit Hilfe eines transgenen Taufliengenstamms (*hsp70*-GFP-Reporterstamm), bei dem eine GFP-Synthese an die *hsp70*-Promotoraktivierung gekoppelt ist, konnte die lokale, vorwiegend auf die Atemwege beschränkte *hsp70*-Expression visualisiert und die Reaktion des Atemwegsepithels auf Proteinebene bestätigt werden. Des Weiteren ermöglichte diese *hsp70*-gekoppelte GFP-Fluoreszenz eine Lokalisierung der *hsp70*-Expression im Verlauf der Tracheen. Auf diese Weise wurde festgestellt, dass in der posterioren Hälfte der Tracheenstränge die *hsp70*-Expression eine deutlich stärkere Induktion erfuhr als im anterioren Bereich. Mittels der Quantifizierung der Fluoreszenzintensität des gesamten Atemwegsepithels konnte nachgewiesen werden, dass bei Männchen relativ mehr GFP nach einer Zigarettenrauchexposition synthetisiert wurde als bei Weibchen, bezogen auf die von GFP ausgehende Hintergrundfluoreszenz. Diese

Beobachtung bestätigt, dass nur ein aktives Spirakelpaar im posterioren Bereich zum Zeitpunkt der Analyse vorhanden ist<sup>91</sup>, über das der Tabakrauch in den Organismus eintritt. Ebenfalls unterstreicht diese Beobachtung, dass der Zigarettenrauch vorwiegend passiv innerhalb des Atemwegstraktes der Larven verteilt wird.

Das Vorhandensein einer einzigen Öffnung in das Atemwegssystem ähnelt der Situation in der Säugerylunge, wo die Außenluft bzw. der Zigarettenrauch durch einen einzigen Zugang sowohl ein- als auch ausgeatmet wird. Das aufgenommene Volumen wird jedoch nicht bei jedem Atemzug vollständig ausgetauscht, das Residualvolumen und zumeist auch das expiratorische Reservevolumen verbleiben in den distalen Arealen der Lunge. Bei *Drosophila*-Larven dringt der aufgenommene Zigarettenrauch passiv wahrscheinlich sowohl in die distalen, feinsten Tracheenverzweigungen als auch in die anterior gelegenen Tracheenregionen ein. Hier kann er vermutlich nicht oder schlechter wieder abgeleitet werden, wodurch der Zigarettenrauch in diesen Bereichen sich anreichern würde. Dies könnte die beobachtete, stärkere *Cyp18a1*-Aktivierung im anterioren Bereich erklären. Durch die geringe Lebensdauer einer Vielzahl an ROS wird eine Akkumulation von Zigarettenrauch in diesen Bereich jedoch keinen Einfluss auf die *hsp70*-Expression haben. Dies bedingt sich durch die hohe Reaktivität einer Vielzahl an ROS, die sich somit vermutlich nur in geringem Maße den anterioren Tracheenbereich erreichen und sich dort anreichern. Auch die gemachten Beobachtungen unterlegen diese Überlegung (s. Abb. 3.6).

Für die *Cyp18a1*-Transkriptmenge in den anterioren und posterioren Tracheenbereichen, die entgegengesetzt dem Rauchkonzentrationsgradienten auftreten, ist noch eine weitere Erklärung denkbar. Das Atemwegssystem von *Drosophila* setzt sich sowohl aus Epithelzellen<sup>88, 89</sup> als auch aus Stammzellen und epitacheal residierenden, endokrinen Inkazellen zusammen<sup>196-199</sup>. Die Inkazellen sind in sieben Paaren vorwiegend an der posterioren Seite der Tracheen lokalisiert<sup>199</sup>, aber aufgrund ihrer geringen Anzahl dürften sie vermutlich nur wenig zu der *Cyp18a1*-Expression beitragen. Larvale Tracheen verfügen über zwei Arten von Stammzellen: Zum einen gibt es ruhende Epithelzellen (Tracheoblasten), die an den primären Tracheenverzweigungen lokalisiert sind, und zum anderen existieren funktionelle Epithelzellen mit einem Stammzellcharakter, dem Progenitorpotential, welche sich hingegen auf den Dorsalstrang des zweiten Thorakalsegments konzentrieren.<sup>197, 198, 200</sup> Während des L3-Stadiums, in dem auch die Berauchung der Larven stattfand, werden die letztgenannten Zellen zu einer massiven Proliferation angeregt<sup>198, 200, 201</sup> und könnten zusätzlich zu der hohen *Cyp18a1*-Expressionszunahme in der anterioren Tracheenhälfte beitragen.

Die Proliferation von trachealen Stammzellen wird durch Ecdyson induziert.<sup>201</sup> Die Schwankungen des Hormonhaushaltes während der Larvenentwicklung sind gut untersucht und für die Steuerung der Häutungen und der Metamorphose entscheidend.<sup>118</sup> Ecdyson wird in die Zelle hinein transportiert und intrazellulär von Rezeptoren erkannt, die daraufhin in den Nukleus translozieren und die

Expression von Zielgenen aktivieren.<sup>202</sup> Aufgrund ähnlicher chemischer Strukturen ist es denkbar, dass nicht nur Hormone wie Ecdyson und 20E, sondern auch PAH über den Ecdysonrezeptor in den Nukleus gelangen und somit die *Cyp18a1*-Expression induzieren. Tatsächlich ist bekannt, dass PAH als endokrine Disruptoren, als Xenoestrogene, wirken<sup>203</sup> und gibt Hinweise darauf, dass PAH aus Zigarettenrauch möglicherweise auch in der Larve an Hormonrezeptoren binden können.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass *Drosophila* nicht nur physiologisch vergleichbar auf eine Zigarettenrauchexposition reagiert wie Säugern, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass primär das Atemwegsepithel mit dem Tabakrauch interagiert. Damit kristallisiert sich die Taufliege als ideales Modell heraus, um die Auswirkungen von Zigarettenrauch auf das Atemwegsepithel zu untersuchen.

## 4.2 Auswirkungen auf die Fitness

In der Populationsgenetik beschreibt die Fitness ein Maß für den genetischen Beitrag, den ein Individuum zur nächsten Generation zusteuert, beziehungsweise die Anzahl der Nachkommen, die ein Individuum hervorbringt. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wird die Fitness aber als die Widerstandsfähigkeit eines Organismus definiert. Zigarettenrauch ist dafür bekannt, dass dieser zahlreiche adverse Wirkungen auf einen Organismus hat und die Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen wie beispielsweise Mikroorganismen<sup>63</sup> verringert. Bei *Drosophila* wurde hierzu zuvor untersucht, ob die Atemwegsepithelintegrität durch eine Exposition mit Zigarettenrauch verändert wurde. Doch obwohl keinerlei morphologische Veränderungen der Atemwege infolge einer Zigarettenrauchexposition beobachtet wurden (s. Abb. 3.10), ist trotzdem denkbar, dass die Fitnessparameter lokomotorische Aktivität der Larven bzw. der negative Geotaxis der Imagines aufgrund der Vielzahl toxischer Verbindungen im Zigarettenrauch<sup>11</sup> verändert werden. Ebenso wurde die Überlebensrate der Tiere nach Konfrontation mit Zigarettenrauch in beiden Entwicklungsstadien überprüft (Kapitel 4.2.1), welcher ebenfalls als Fitnessparameter diente. Abschließend wurde untersucht, ob eine larvale Zigarettenrauchexposition Auswirkungen auf die Fitness während der adulten Lebensphase hat (Kapitel 4.2.2).

## 4.2.1 Fitness bei einmaliger Zigarettenrauchexposition

### 4.2.1.1 Überlebensrate von Larven und Imagines

Zigarettenrauch enthält eine Vielzahl an Verbindungen, von denen ein überwiegender Teil toxisch ist.<sup>11</sup> Um zu bestimmen, inwieweit sich der Zigarettenrauch auf die Überlebensrate auswirkt, wurde bei *Drosophila*-Larven die Viabilität der verschiedenen Entwicklungsstadien nach Zigarettenrauchexposition untersucht. Es zeigte sich, dass einige männliche Larven bereits während der Rauchprozedur starben. Dies war jedoch nicht bei den Weibchen der Fall. Dieser Unterschied zwischen den Geschlechtern könnte darin begründet sein, dass die weiblichen Larven ein höheres Gewicht als männliche Larven haben.<sup>147</sup> Infolgedessen reichern Weibchen geringere Mengen an Rauch pro Mikrogramm Körpergewicht an (geringere Rauchdosis) und zeigen deshalb bei gleichen Bedingungen während einer Exposition mit Tabakrauch eine höhere Resilienz als Männchen. Ein solcher Unterschied ist bereits zwischen Larven und Imagines in Kapitel 4.1.3.3 thematisiert worden. In der Tat wurde von BAINTON *et al.* eine letale Wirkung von hohen Nikotinkonzentrationen auf *Drosophila* beschrieben.<sup>113</sup> Jedoch kann wie bereits in Kapitel 4.1.1 erörtert, die Wirkung von Nikotin nicht als alleinige Ursache für eine reduzierte Überlebensrate der Männchen angesehen werden. Aufgrund der Vielzahl toxischer Verbindungen, die mit dem Tabakrauch<sup>11</sup> in den Organismus gelangen, sind diese in ihrer Gesamtheit vermutlich verantwortlich für die verminderte Überlebensrate der männlichen Larven. Nichtsdestotrotz nimmt Nikotin wahrscheinlich eine Rolle bei der Beeinflussung der Überlebensrate ein. Nikotin weist eine hohe Toxizität bei Menschen auf<sup>204</sup>, der Nikotinmetabolit Cotinin ist jedoch geringer toxisch als die Ausgangsverbindung<sup>205</sup>. Der erhöhte Umsatz von Nikotin zu Cotinin, der bei weiblichen Larven beobachtet wurde (s. Abb. 3.1), könnte zur erhöhten Überlebensfähigkeit von Weibchen beitragen, da infolge des verstärkten Nikotinabbaus die toxischen Auswirkungen des Alkaloids weniger zum Tragen kommen könnten.

Es ist aber auch möglich, dass ein geschlechterspezifisches Abwehrsystem besteht. So ist von adulten Taufliegen bekannt, dass weibliche Imagines ROS effizienter eliminieren können (s. auch Kapitel 4.1.3.3).<sup>188</sup> Doch auch Gene, die vermutlich in den Xenobiotikametabolismus involviert sind, werden zwischen männlichen und weiblichen Taufliegen unterschiedlich induziert.<sup>152</sup> Dies unterstützt die hier angestellten Überlegungen, dass auch die Larven abhängig vom Geschlecht die durch den Zigarettenrauch eingetragenen, exogenen Verbindungen unterschiedlich effizient eliminieren können (s. auch Kapitel 4.1.1, Kapitel 4.1.2.4 und Kapitel 4.1.3.3).

Aus männlichen, mit Zigarettenrauch konfrontierten Larven entwickelten sich weniger Puppen, während bei den Weibchen sogar eine leichte Steigerung der Puppenanzahl beobachtet wurde. Hierfür sind mehrere Gründe denkbar.

Zigarettenrauchextrakt wirkt auf A549-Zellen, einer humanen alveolären Typ II-Bronchialepithelzelllinie, in geringen Konzentrationen apoptotisch, in höheren Konzentrationen induziert es jedoch Nekrosen.<sup>128</sup> Auch hier kann die Dosis als eine vom Körpergewicht abhängige Variable ausschlaggebend für die stark reduzierte Verpuppungsrate bei den Männchen sein. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass innerhalb dieser Arbeit mit der Apoptose assoziierten Gene bei Weibchen verstärkt dysreguliert wurden, nicht jedoch bei männlichen Larven. Zusammengenommen gibt dies Hinweise darauf, dass vermehrt nekrotischer Zelltod im respiratorischen Epithel von männlichen Larven eingegangen wird, der in einer verringerten Anzahl an gebildeten Puppen bei Zigarettenrauch-exponierten Männchen münden kann.

PAH stellen an sich inerte Verbindungen dar. Erst im Laufe der Zeit, in der der Xenobiotikametabolismus bereits eingeleitet wurde, kommt es zu einer metabolischen Aktivierung der ursprünglichen Verbindungen.<sup>13</sup> Prinzipiell kann daher die verminderte Überlebensrate der männlichen Larven eine Spätfolge der Exposition mit Zigarettenrauch sein, weil durch die Detoxifizierung von Komponenten wie PAH zytotoxische Metabolite entstehen. Die schädigenden Auswirkungen des Zigarettenrauchs kommen möglicherweise zeitlich verzögert zum Tragen und würden sich dann in einer verminderten Verpuppungsrate äußern.

Zigarettenrauch interferiert in das endokrine System.<sup>206</sup> Da es sich bei der Metamorphose ebenfalls um einen hormonabhängigen Prozess handelt, ist es denkbar, dass der Zigarettenrauch auch in diesen interveniert. Erhöhte Konzentrationen des Hormons 20E leiten eine Metamorphose ein, jedoch ist Cyp18a1 ein essentielles Enzym, um 20E im Organismus wieder abzubauen.<sup>121, 122</sup> Diesem Enzym wird in dieser Arbeit eine Rolle im Xenobiotikametabolismus zugesprochen, da *Cyp18a1* infolge einer Rauchexposition vermehrt exprimiert wird. Wird Cyp18a1 verringert synthetisiert oder ist es gar nicht vorhanden, so kommt es aufgrund des fehlenden Abbaus von 20E zur Letalität während des Überganges in das Puppenstadium.<sup>121, 122</sup> Möglicherweise kommt es infolge der Exposition mit Tabakrauch vorwiegend zu einem Einsatz von Cyp18a1 in den Fremdstoffmetabolismus anstelle des Hormonkatabolismus. Dies könnte beispielsweise bedingt durch eine höhere Bindungsaffinität von PAH als von 20E an das Enzym sein. Tatsächlich besitzen PAH wie B[a]p eine hohe Bindungsaffinität zu aus der Rattenleber stammendes Cyp1a1.<sup>207</sup> Dadurch würden die im Zuge der Entwicklung erhöhten 20E-Titer möglicherweise nicht abgebaut und könnten sich prinzipiell letal auswirken.

Humanes Cyp1a1 besitzt eine planare, aktive Bindungstasche und bindet vor allem an Verbindungen mit einer passenden Konformation wie PAH.<sup>208</sup> Eine Abweichung von dieser Konformation könnte sich in einer geringeren Substrataffinität oder in einer verminderten Umsatzrate äußern. 20E hingegen weist eine verdrehte Konformation am Gonangerüst auf<sup>209</sup>, was eine im Vergleich zu PAH geringeren Substratumsatz zur Folge haben könnte. Sollte eine Konkurrenz zwischen PAH und 20E

um die Bindungsstelle von Cyp18a1 herrschen, so kann die fehlende Reduktion der Puppenanzahl in der Zigarettenrauchexpositionsgruppe bei den Weibchen daraus resultieren, dass die weiblichen Larven trotz synchronisierter Eiablage etwas später in das Puppenstadium übergehen als männliche<sup>147</sup>. Infolgedessen tritt der Anstieg von 20E bei den Weibchen zeitlich verzögert auf. Eine Konkurrenz zwischen PAH und 20E um die Bindungstasche von Cyp18a1 würde dann bei den Weibchen nur eine untergeordnete Rolle spielen, da zum Zeitpunkt der Berauchung das Enzym bei den Weibchen vermutlich nur die Eliminierung von PAH zur Aufgabe hat. Bei den Männchen hingegen hat Cyp18a1 aufgrund ihres früheren Eintritts in das Puppenstadium möglicherweise simultan eine Funktion im Katabolismus von 20E.

Die mit Zigarettenrauch exponierten Weibchen zeigten eine erhöhte Verpuppungsrate als die Luftexpositionsgruppe. Beim Hefepilz *Candida albicans* konnte nachgewiesen werden, dass die Exposition mit Zigarettenrauchkondensat die Chitinbiosynthese aktiviert.<sup>210</sup> Sollte dies bei *Drosophila* ebenfalls der Fall sein, würde dies die erhöhte Verpuppungsfrequenz bei den Weibchen erklären. Dafür spricht auch, dass auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen nach Zigarettenrauchexposition die Expression von *sgs3* (*salivary gland secretion 3*) reduziert vorlag. Die Synthese von Sgs3 wird wiederum mit dem Anstieg von 20E verringert<sup>211</sup>, welches wiederum die Metamorphose einleitet. Dies deutet darauf hin, dass eine Exposition mit Tabakrauch bei Weibchen verstärkt die Verpuppung veranlasst.

Des Weiteren wurde die Überlebensrate der adulten Taufliegen nach Zigarettenrauchexposition überprüft. Wie männliche Larven wiesen auch männliche, adulte *Drosophila* eine verminderte Überlebensrate nach einer Rauchexposition auf. Dahingegen waren die Weibchen unbeeinflusst von der Konfrontation mit Tabakrauch. Ursächlich hierfür können die Größe der Tiere sein und somit unterschiedliche Dosen der aufgenommenen Toxine. Ebenso kann das bereits diskutierte ROS-Abwehrsystem<sup>188</sup> und der sich zwischen Männchen und Weibchen unterscheidende Fremdstoffmetabolismus<sup>152</sup> ursächlich für die Beobachtung sein (s. auch Kapitel 4.1.2.4 und Kapitel 4.1.3.3).

#### **4.2.1.2 Lokomotorische Aktivität von Larven und Imagines**

Die Lungenfunktion, die bei chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen beeinträchtigt ist<sup>212</sup>, kann als Fitnessparameter betrachtet werden. Ebenfalls steht die physikalische Aktivität von Erkrankten im direkten Zusammenhang mit der Lungenfunktion.<sup>213, 214</sup> Und auch durch Tabakkonsum wird die Lungenfunktion beim Menschen vermindert.<sup>212, 215, 216</sup> Aufgrund dessen wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, ob die Lokomotoraktivität (bei Larven) bzw. die negative Geotaxis (bei Imagines) nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition sich voneinander unterscheiden.

Es wurde beobachtet, dass männliche, unbehandelte Larven eine verringerte lokomotorische Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Weibchen aufwiesen. Jedoch verringert sich allgemein

die lokomotorische Aktivität zum Ende des dritten Larvenstadiums.<sup>217</sup> Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass dies durch die unterschiedlichen Entwicklungsphasen bedingt wird, da Weibchen trotz synchronisierter Eiablage etwas später in das nächste Entwicklungsstadium übergehen als die männlichen Larven<sup>147</sup>.

Im Zuge Exposition mit Zigarettenrauch kam es zu einer Verminderung der Aktivität bei beiden Geschlechtern. Möglicherweise wird dies durch den Tabakbestandteil Nikotin bedingt, da das Alkaloid eine sedierende Wirkung auf adulte Taufliegen hat.<sup>113</sup> Auch bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* ist eine reduzierte lokomotorische Aktivität bei oraler Aufnahme von Nikotin in höheren Konzentrationen bekannt.<sup>218</sup> Jedoch scheint aufgrund der geringen Menge an Nikotin, die final durch die Larven resorbiert wird (s. Kapitel 4.1.1), als alleiniger Auslöser für die verminderte Lokomotorik unwahrscheinlich, jedoch möglicherweise mitverantwortlich. Auch das Verhalten der Larven nach oraler Applikation von Nikotin unterlegt dies ebenfalls (s. Kapitel 4.1.1).

Entsprechend zur lokomotorischen Aktivität bei den Larven wurde die negative Geotaxis nach Zigarettenrauch- bzw. Luftexposition bei den Imagines ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass bei den männlichen Luftkontrollen die erreichte, mittlere Höhe im Röhrchen im Laufe des Versuchs anstieg. Dieser Anstieg ist vermutlich durch die allgemein erhöhte Aktivität während des Tagesverlaufs bedingt.<sup>219-221</sup> Infolge einer Zigarettenrauchexposition kam es zu einer vollständigen Bewegungslosigkeit der Taufliegen, die sich langsam von dieser erholten. Dabei bildeten sich zwei Populationen aus, die auf unterschiedlich starke Sensibilitäten gegenüber einer Exposition mit Zigarettenrauch zwischen den Individuen hinweisen. Ein derartiger Effekt ist auch bei Mäusen bekannt und wird anteilig auf genetische Faktoren zurückgeführt.<sup>222</sup>

Bei den weiblichen, Luft-exponierten Imagines war die durchschnittliche, erreichte Höhe im Röhrchen etwas geringer als die der Männchen. Auch eine Studie an *Drosophila suzukii* zeigt, dass jungfräuliche Weibchen weniger aktiv als Männchen sind.<sup>223</sup> Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Konfrontation mit Zigarettenrauch einige Weibchen im Gegensatz zu den Männchen nicht bewegungslos waren. Auch die Regeneration der Bewegungsfähigkeit erfolgte etwas schneller. Im Gegensatz zu den Männchen konnte jedoch keine Bildung unterschiedlich sensibler Taufliegenpopulationen beobachtet werden.

Bei adulten Taufliegen konnte bereits von BAINTON *et al.* gezeigt werden, dass die Exposition mit dem Zigarettenrauchbestandteil Nikotin eine biphasische Antwort hervorruft: Bei geringeren Dosen wird eine Stimulation beobachtet, welche sich durch hyperaktives Verhalten äußert.<sup>113</sup> Mit steigenden Dosen jedoch verhalten sich die behandelten Taufliegen erst hypo- und dann akinetisch, wobei der Neurotransmitter Dopamin diese Antwort vermittelt.<sup>113</sup> Eine derartig biphasische Antwort wurde auch hier mittels einer Zigarettenrauchexposition beobachtet, da männliche Taufliegen bei



zehnminütiger Exposition mit Zigarettenrauch in höher gelegenen Abschnitten der Röhren zu finden waren (Daten nicht gezeigt), nach einstündiger Exposition jedoch bewegungslos am Boden waren. PRANGE *et al.* führten eine chronische Exposition von adulten Taufiegen mit Zigarettenrauch durch, welche ebenfalls die lokomotorische Aktivität reduzierte.<sup>86</sup> Nichtsdestotrotz ist die alleinige Wirkung von Nikotin innerhalb des hier verwendeten Versuchsaufbaus wie auch bei den Larven unwahrscheinlich aufgrund der geringen Menge an resorbiertem Nikotin (s. Kapitel 4.1.1). Vielmehr scheint der beobachtete Versuchsausgang ebenso wie bei den Larven ein Resultat des kumulativen Effektes vieler Verbindungen, die im Zigarettenrauch zu finden sind<sup>11</sup>, zu sein.

Obwohl das Atemwegsepithel, welches verstärkt in Kontakt mit Zigarettenrauch gekommen ist, keine veränderte Integrität aufwies, beeinflusste der Tabakrauch die Aktivität und die Überlebensrate. Dabei waren die Auswirkungen besonders bei männlichen Tieren zu beobachten. Diese Daten zeigen zum einen, dass Zigarettenrauch trotz des intakten respiratorischen Epithels die Fitness von *Drosophila* beeinflussen kann. Zum anderen wird durch diese Ergebnisse auch hervorgehoben, dass die geschlechtsspezifischen Auswirkungen von Zigarettenrauch auch auf verhaltensbiologischer und pathologischer Ebene zu beobachten sind.

#### 4.2.2 Fitness bei zweimaliger Zigarettenrauchexposition

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob im Larvalstadium durch Zigarettenrauch verursachte Effekte über die Metamorphose hinaus in das adulte Entwicklungsstadium persistieren und eine veränderte Antwort bei erneuter Exposition während des Imaginalstadiums hervorruft. Dies wird möglicherweise über epigenetische Mechanismen vermittelt. Untersuchungen dieser Art stellen einen relevanten Aspekt dar, um das Vorliegen potentiell generationsübergreifender Effekte abzusehen, da auch diese epigenetisch vermittelt werden können<sup>224</sup>. Dafür wurden die Auswirkungen von Zigarettenrauch auf im Larvalstadium mit Zigarettenrauch in Kontakt gekommenen Imagines in Hinsicht auf die Fitness analysiert. Dabei wurden vier Gruppen untersucht:

Gruppe 1 – Taufiegen, die weder als Larve noch als Imago Zigarettenrauch exponiert worden sind  
(unbehandelte Gruppe),

Gruppe 2 – Taufiegen, die im Larvalstadium Zigarettenrauch und im Imaginalstadium Luft exponiert worden sind,

Gruppe 3 – Taufiegen, die im Larvalstadium Luft und im Imaginalstadium Zigarettenrauch exponiert worden sind,

Gruppe 4 – Taufiegen, die als Larve und als Imagines mit Zigarettenrauch konfrontiert worden sind.

#### 4.2.2.1 Überlebensrate

Bei der Untersuchung, ob das Überleben adulter Taufliegen durch eine vorangegangene Zigarettenrauchexposition im Larvalstadium bei erneuter Konfrontation mit Zigarettenrauch beeinflusst wurde, konnte beobachtet werden, dass bereits die einfach behandelten Gruppen 2 und 3 der Männchen ein tendenziell reduziertes Überleben aufwiesen. Die Gruppe der zweifach exponierten Taufliegen (Gruppe 4) wies die geringste Überlebensrate auf im Vergleich zur unbehandelten Gruppe 1 bei den Männchen auf. Bei den Weibchen wurden vergleichbare, jedoch weniger stark ausgeprägte Tendenzen beobachtet. Dies bestätigt, dass eine Exposition mit Zigarettenrauch während der larvalen Entwicklung über die Metamorphose hinweg persistiert und einen Einfluss auf die Sensibilität bei erneuter Konfrontation nehmen kann. Des Weiteren verifizieren diese Ergebnisse die höhere Sensibilität der männlichen Tiere gegenüber Zigarettenrauch.

#### 4.2.2.2 Negative Geotaxis

Als zweiter Ausleseparameter wurde das negative Geotaxisverhalten vier Stunden und 24 Stunden nach Exposition mit Zigarettenrauch analysiert.

Zum zuerst analysierten Zeitpunkt (4 h) wurde bei den Männchen in der dritten und vierten Gruppe ein vermindertes, negativ geotaktisches Verhalten beobachtet, welches bereits in Kapitel 4.2.1.2 diskutiert wurde. Männliche Taufliegen, die nur im Larvalstadium mit Zigarettenrauch behandelt wurden (Gruppe 2), wiesen hingegen ein verstärkt negatives geotaktisches Verhalten zu beiden analysierten Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 auf. Die verstärkte negative Geotaxis wurde auch bei der dritten Gruppe nach Regeneration, also zum zweiten Zeitpunkt (24 h), beobachtet. Interessanterweise wies die zweimalig Zigarettenrauch exponierte Gruppe 4 ein Tag nach Rauchexposition ein vergleichbares negatives Geotaxisverhalten wie die Kontrollgruppe 1 auf. (24 h). Es ist denkbar, dass durch die vorherige Exposition mit Zigarettenrauch eine Desensibilisierung eingetreten. Bei den Weibchen hingegen wurde zu keinem der beiden, analysierten Zeitpunkte eine veränderte Geotaxis beobachtet. Möglicherweise stellt dieses Ergebnis bereits eine erste Korrelation zum Menschen dar, da epidemiologische Studien zeigen, dass eine pränatale Exposition mit Zigarettenrauch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten des Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndroms (ADHS) bei Kindern mit sich trägt.<sup>137</sup>

Bei *Drosophila* ist eine ähnliche Studie zu dem hier durchgeführten Versuch gemacht worden, die die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen bestätigt.<sup>193</sup> Dabei konnte VELAZQUEZ-ULLOA zeigen, dass Taufliegen, die während ihrer Larvalentwicklung mit Nikotin behandelt wurden, weniger auf eine erneute Nikotinexposition anprechen, als diejenigen, die zuvor nicht mit dem Alkaloid in Kontakt gekommen waren. In dieser Publikation wird der  $\alpha 7$ -Untereinheit des nikotineren Acetylcholinrezeptor (nAChR) eine Rolle bei der Vermittlung dieser Desensibilisierung zugeschrieben.<sup>193</sup> Und auch beim Menschen ist bekannt, dass eine chronische Nikotinadministration

zu einem verminderten Ansprechen der nAChR führt.<sup>225</sup> In humanen Zellkulturen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von *CHRNA7* (*human  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit*) mit dem Methylierungsgrad des Promotors in Zusammenhang steht.<sup>226</sup> Hierbei scheint unter anderem die *de novo*-Methyltransferase Dnmt1 die Methylierung am Locus zu vermitteln.<sup>226</sup> Der Tabakbestandteil Nikotin kann wiederum die *Dnmt1*-Expression in verschiedenen Gehirnarealen inhibieren.<sup>227</sup> Dies suggeriert eine mögliche epigenetische Komponente des beobachteten Effekts. Tatsächlich wurde auch innerhalb dieser Arbeit das für die  $\alpha 7$ -Untereinheit kodierende Gen in den Tracheen männlicher Larven infolge einer Rauchexposition dereguliert.

In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, welche pathologischen und verhaltensbiologischen Auswirkungen eine Zigarettenrauchexposition auf *Drosophila* hat. Dabei zeigte sich, dass die Überlebensrate infolge des Kontakts mit Tabakrauch sowie die Aktivität sowohl von Larven als auch Imagines stark reduziert vorlag. Dabei äußerte sich ein sexueller Dimorphismus, wobei männliche Individuen sensibler auf eine Zigarettenrauchexposition reagierten. Im nachfolgenden Schritt wurden bereits im Larvalstadium mit Zigarettenrauch exponierte Taufliegen abermals im Erwachsenenalter mit Rauch konfrontiert. Hierbei konnten nicht nur die vorangegangenen Ergebnisse bestätigt werden, vielmehr wurde beobachtet, dass die Tiere stärker oder weniger stark zu einfach-exponierten Tieren reagierten. Dies könnte bereits ein erster Hinweis auf epigenetische Modifikationen sein, die durch die Exposition der Larven mit Zigarettenrauch eingeführt worden sind.

#### 4.2.2.3 Epigenetik als potentieller Mechanismus?

Bei Säugern kommt es im Verlauf der Embryogenese zu einer Reprogrammierung des Epigenoms, bei der epigenetische Signaturen, die unter anderem durch Umwelteinflüsse erworben worden sind, rückgängig gemacht werden.<sup>224, 228</sup> Doch scheinen einige Loci, die mit neurologischen und metabolischen Erkrankungen assoziiert werden, diesem Reprogrammierungsprozess zu entgehen.<sup>229</sup> Auch bei *Asthma bronchiale* gibt es Hinweise darauf, dass epigenetische Mechanismen eine erhöhte Suszeptibilität dieser Lungenerkrankung vermitteln.<sup>230, 231</sup> Aufgrund dessen stellt sich die Frage, inwieweit die Taufliege eine Untersuchung derartiger Effekte zulässt. Als holometaboles Insekt durchläuft *Drosophila melanogaster* prinzipiell gleich zwei Phasen epigenetischer Reprogrammierung. Auch bei *Drosophila* wird, wie bei Säugern<sup>228</sup>, während der Embryogenese die Methylierung des Genoms dezimiert<sup>232</sup>. Aber auch der Acetylierungsstatus spielt bei der Taufliege eine tragende Rolle während dieser Entwicklungsphase.<sup>129</sup> Weit weniger untersucht ist jedoch die Metamorphose, bei der es ebenfalls zu massiven Veränderungen kommt, die unter anderem auch epigenetisch vermittelt werden. So konnte in der Großen Wachsmotte *Galleria mellonella* gezeigt werden, dass es zwischen Larven- und Puppenstadium zu einer Aktivierung von Histonmodulierenden Enzymen wie Histondeacetylasen (HDAC) und Histonacetyltransferasen (HAT)

kommt, die mit einer epigenetischen Reprogrammierung während der Metamorphose assoziiert werden kann.<sup>233</sup> CARRÉ *et al.* konnten auch bei *Drosophila* der HAT Gcn5 eine essentielle Rolle während der Metamorphose sowie der Oogenese nachweisen: Ein Nullallel von *Gcn5* führt zu einer verlängerten, wandernden Phase bei Larven, die zur Bildung abnormaler Puppen und Letalität während des Präpuppenstadiums führt.<sup>129</sup> Dahingegen erzeugt ein heterozygoten Allel von *Gcn5* missgebildete Imagines, die kurz nach dem Schlüpfen sterben.<sup>129</sup> Bei weiblichen Taufliegen, die durch Kreuzungen *Gcn5*-defizient in ihren Keimzellen sind, wird die Oogenese bereits in einem frühen Stadium gehemmt.<sup>129</sup> All die Effekte von *Gcn5* werden einer Wechselwirkung mit dem Ecdysonmetabolismus zurückgeführt.<sup>129</sup> Neben Acetylierungen scheinen aber auch der Methylierungsgrad<sup>131, 132</sup>, *non-coding (nc)* RNA<sup>133</sup>, *Polycomb Group (PcG)*-assoziierte Proteine<sup>134, 135</sup> sowie weitere Chromatin modellierende Proteine<sup>136</sup> einen Einfluss auf die Metamorphose zu nehmen, sodass auch hier von einer epigenetischen Umstrukturierung während der Puppenphase bei *Drosophila* gesprochen werden kann.

Epigenetische Signaturen wie Methylierungen und die Modellierung von Chromatinstrukturen haben einen Einfluss auf die Pathogenese chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen.<sup>234</sup> Und auch ist bekannt, dass Zigarettenrauch das Epigenom verändern kann.<sup>235-237</sup> Somit ist denkbar, dass eine durch Zigarettenrauch veränderte, epigenetische Landschaft für eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der Entwicklung von chronisch-entzündlichen Lungenerkrankungen verantwortlich ist. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass bei *Drosophila* im Larvalstadium eingeführte Effekte über die Metamorphose hinweg persistieren. Eine erneute Konfrontation nach der Metamorphose hatte deutlich veränderte Auswirkungen zur Folge als eine einmalige Exposition im Erwachsenenalter. Dies wiederum deutet auf eine mögliche Einführung epigenetischer Signaturen im *Drosophila*-Genom, die die Metamorphose überdauern. Um was für Markierungen es sich auf molekularer Ebene genau handelt, inwieweit die Auswirkungen auch in späteren Generationen zu beobachten sind und über welche Mechanismen diese vermittelt werden, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

### **4.3 Relevanz regulierter Signalwege bei der Entwicklung chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen und eines morphologisch veränderten Atemwegsepithels bei *Drosophila***

Um die Fragestellung zu beleuchten, welchen Einfluss Tabakrauch auf die Genexpression der respiratorischen Epithelzellen hat, wurden die Transkriptome der larvalen Atemwege entschlüsselt und miteinander verglichen. Dabei wurden vier Gruppen voneinander unterschieden:

- 1) Atemwege männlicher Larven, die konstant in einer Luftumgebung gehalten wurden,
- 2) Atemwege männlicher Larven, die Zigarettenrauch ausgesetzt wurden,
- 3) Atemwege weiblicher Larven, die konstant in einer Luftumgebung gehalten wurden und
- 4) Atemwege weiblicher Larven, die Zigarettenrauch ausgesetzt wurden.

Im Zuge vergleichender Transkriptomanalysen wurde zunächst die Gesamtheit aller durch Zigarettenrauch differentiell regulierter Gene im Atemwegsepithel beider Geschlechter ermittelt. Anschließend wurden den differentiell regulierten Genen durch die DAVID-Software<sup>102, 103</sup> biologische Prozesse zugeordnet, welche in der Zigarettenrauch- im Vergleich zur Luftexpositionsgruppe verändert vorlagen. Neben Genen, die mit dem Xenobiotikametabolismus und der Antwort auf oxidativen Stress assoziiert werden (s. Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.1.3), erfuhren auch Gene, die mit der Entwicklung der Atemwege assoziiert werden, durch Tabakrauch eine Veränderung in ihrer Expression. Dabei ist durchaus bekannt, dass eine Tabakrauchexposition die Lungenentwicklung beeinflussen kann.<sup>238</sup> Aber auch die G-Protein gekoppelte Rezeptor (GPCR)-Signalgebung, die Apoptose und die Telomererhaltung waren durch eine Exposition mit Zigarettenrauch verändert. Eine Modulation dieser Prozesse durch eine Tabakrauchexposition wurde auch *in vitro* in humanen Bronchialepithelzellen oder *in vivo* bei Rauchern selber ebenso beobachtet.<sup>230, 239-241</sup> Die Exposition mit Tabakrauch stellt aber auch einen bekannten Risikofaktor für die Entstehung chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen infolge des begleitenden oxidativen Stress und der Aktivierung des Immunsystems dar.<sup>43, 71, 72</sup> Die in den larvalen Atemwegen durch Zigarettenrauch am stärksten modulierten Signalwege stehen in erstaunlicher Übereinstimmung mit Prozessen, die auch bei der Pathogenese von Asthma und COPD eine entscheidende Rolle spielen.<sup>28, 40-42, 242-263</sup> Aufgrund dieser Korrelation wurden diverse Prozesse betrachtet, um ihre Relevanz bei der Ausbildung morphologisch aberranter Atemwege bei der Tauflyege feststellen zu können. Damit soll in diesem Teil der Arbeit diskutiert werden, ob *Drosophila* für die Untersuchung von Zigarettenrauch-induzierten Veränderungen im Atemwegsepithel zulässig ist und somit als Modellsystem für die Beantwortung grundlegender Fragestellungen, die das Zigarettenrauch-induzierte *airway*

*remodelling* bei chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen betreffen, verwendet werden kann.

Zigarettenrauch kann auch direkt auf epigenetischer Ebene in verschiedene Prozesse intervenieren.<sup>235-237</sup> Aber auch indirekt kann die epigenetische Landschaft im Genom von *Drosophila* verändert werden, wie beispielsweise durch das Hsp90-System.<sup>264</sup> Daher soll im letzten Abschnitt dieser Arbeit ein Fazit gezogen werden, ob *Drosophila* auch als potentiell *in vivo*-Modell für die Untersuchung von Auswirkungen des Tabakkonsums auf die Atemwegsentwicklung und -funktion auch in nachfolgenden Generationen in Frage kommt.

#### 4.3.1 Xenobiotikametabolismus und oxidative Stressantwort

Wie bereits erwähnt, stellen Cyp-Enzyme einen elementaren Bestandteil des Xenobiotikametabolismus dar.<sup>12</sup> Doch auch Glutathion-S-Transferasen (Gst) sind ebenfalls involviert in die Metabolisierung von Fremdstoffen<sup>12</sup>, die mit dem Zigarettenrauch in den Organismus gelangen<sup>11</sup>. Während Cyp-Enzyme jedoch das Xenobiotikum in Phase I des Xenobiotikametabolismus funktionalisieren, konjugieren Phase II-Enzyme wie Gst hydrophile Verbindungen an das zu exkretierende Substrat, um es auf diese Weise gallengängig zu machen.<sup>12</sup>

Tabakrauch ist ein bekannter Risikofaktor für die Entwicklung von *Asthma bronchiale* und COPD.<sup>71, 72</sup> Jedoch ist derzeit nur wenig verstanden, über welche Mechanismen diese erhöhte Suszeptibilität vermittelt wird. Interessanterweise stehen verschiedene Komponenten des Xenobiotikametabolismus, die auch im Zuge einer Exposition mit Zigarettenrauch aktiviert werden, im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen. Dabei kommt es bei Vorliegen eines MspI- oder Ile/Val-Polymorphismus in dem Gen *Cyp1a1* zu einer erhöhten Enzymaktivität, die sich mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer COPD niederschlägt.<sup>40</sup> Eine verstärkte Synthese von *Cyp1a1* wurde auch bei einem murinen Asthmodell beobachtet, bei denen die Mäuse zuvor mit dem Allergen Toluoldiisocyanat sensibilisiert wurden.<sup>243</sup> Ebenfalls trägt eine erhöhte Aktivität von Epoxidhydrolase 1 (Ephx1), ein Phase I-Enzym, welches auch in den Katabolismus von PAH involviert ist, bei simultanen Vorliegen eines Ile105Val-Polymorphismus von *Gstp1*, der die Aktivität des Enzyms mindert, zu einem erhöhten Asthmarisiko bei.<sup>242</sup> Erklärungsgebend für diese Beobachtungen ist, dass im Verlauf des Xenobiotikametabolismus der Körper mit oxidativen Stress konfrontiert wird, da Radikale als Metabolite gebildet werden können.<sup>13</sup> Es wird bereits vermutet, dass diese reaktiven Metabolite die Pathogenese von Asthma und COPD fördern können.<sup>40, 242, 243</sup> Dies steht auch im Einklang mit Polymorphismen von Gst-Enzymen, die die antioxidative Kapazität im Atemwegsepithel reduzieren, wodurch wiederum die zelluläre Redoxhomöostase beeinträchtigt und die Pathogenese von Atemwegserkrankungen gefördert wird.<sup>41, 42, 243</sup> Daher werden besonders *Gstm1*, *Gstp1* und *Gstt1* als Asthmasuszeptibilitätsgene betrachtet.<sup>38</sup> Dies unterlegt wiederum die

tragende Rolle eines funktionsfähigen Xenobiotikametabolismus und einer adäquaten Antwort auf oxidativen Stress bei der Aufrechterhaltung der Lungenhomöostase.

Im Zuge einer für Asthma und COPD charakteristischen Entzündungsantwort<sup>265</sup> wird der Transkriptionsfaktor *nuclear factor  $\kappa$  light chain enhancer in B cells* (NF- $\kappa$ B) aktiviert, der die Expression zahlreicher proinflammatorischer Gene einleitet<sup>266</sup>. Auch die Induktion von *Cyp1a1* wird durch NF- $\kappa$ B vermittelt.<sup>267</sup> Dies zeigt, dass nicht nur die Cyp-Enzyme durch die Generation von ROS eine Inflammation bedingen können<sup>16,20</sup>, sondern es wird auch verdeutlicht, dass die Entzündungsreaktion durch die Synthese von Cyp-Proteinen selbstverstärkend wirken kann.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Gene in den Atemwegen von *Drosophila*-Larven durch Zigarettenrauch moduliert werden, die mit dem Xenobiotikametabolismus, dem Glutathionmetabolismus und der oxidativen Antwort assoziiert werden. Zum Xenobiotikametabolismus wurden jedoch ausschließlich für Phase II-Enzyme kodierende Gene wie *Sulfotransferase 4 (St4)* zugeordnet. Möglicherweise ist das Fehlen von Cyp-Enzymen zu dieser Zuordnung aufgrund ihrer noch nicht validierten Funktion im Xenobiotikametabolismus bei *Drosophila* zu erklären. Auch PRANGE *et al.* konnten zeigen, dass bei *Drosophila* verschiedene *Gst* infolge einer Zigarettenrauchexposition differentiell reguliert werden.<sup>86</sup> Bei *Drosophila* ist eine Regulation von *Gst* bedingt durch den Xenobiotikametabolismus bereits bekannt<sup>268</sup> und ist daher auch in diesem Modell ursächlich für das modulierte Vorkommen anzusehen. Als Teil der Abwehrreaktion gegen exogene Substanzen haben diese Enzyme mutmaßlich eine direkte, tragende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit und der Integrität des Atemwegsepithels inne. *Gst* können bekanntermaßen auch bei *Drosophila* die C-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalkaskade modulieren.<sup>269</sup> Diese Signalgebung ist wiederum mit dem für die Immunantwort zuständigen NF- $\kappa$ B-Signalweg IMD über die Kinase *transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) activated kinase 1* (Tak1) assoziiert.<sup>270</sup> Die IMD-Signalkaskade führt wiederum bei chronischer Aktivierung zu Umstrukturierungsprozessen in den Atemwegen.<sup>85</sup> Somit ist denkbar, dass auch eine veränderte *Gst*-Expression zu morphologisch aberranten Atemwegen bei *Drosophila* führen kann. Inwiefern *Cyp18a1*, dessen Humanhomolog durch NF- $\kappa$ B aktiviert werden kann<sup>267</sup>, bei der Atemwegsumstrukturierung mitwirkt, verbleibt ungeklärt und bedarf weiterer Studien.

Leukotrien-C<sub>4</sub>-Synthase, eine *Gst*, oder verschiedene Cyp-Enzyme sind ebenfalls an der Synthese proinflammatorischer Eicosanoide wie Leukotriene bzw. 20-Hydroxyeicosatetraensäure beteiligt.<sup>271-273</sup> Diesen polyungesättigten Fettsäuren wird eine entscheidende Rolle beim *airway remodelling* bei *Asthma bronchiale* und COPD zugesagt.<sup>274, 275</sup> Obwohl bei *Drosophila* keine C<sub>19</sub>-Fettsäuren und länger wie Eicosanoide gefunden wurden<sup>276</sup>, zeigten SCARPATI *et al.*, dass durchaus orthologe Enzyme bei *Drosophila* existieren, die zu den in die Eicosanoidsynthese involvierten Enzymen vergleichbare katalytische Zentren aufweisen<sup>277</sup>. Daher vermuten die Autoren, dass ein zur

Eicosanoidsynthese funktionelles Äquivalent auch bei der Taufliege existiert.<sup>277</sup> Dies lässt wiederum vermuten, dass durchaus im Zuge der Lipidsynthese proinflammatorische Verbindungen generiert werden können, die auch einen Einfluss auf das Respirationssystem bei *Drosophila* nehmen könnten. Dass die Synthese von verschiedenen Lipiden relevant ist für ein funktionsfähiges Atemwegsepithel, zeigt auch das Asthmasuszeptibilitätsgen *Orosomuroid 1-like (ORMDL)*. Wird dieses in den Tracheen von Taufliegenlarven überexprimiert, kommt es zu einer veränderten Lipidzusammensetzung im Atemwegsepithel.<sup>278</sup> Dabei wird unter anderem Ceramid 36:2 vermehrt gebildet<sup>278</sup>, dem in einem Asthmadmodell bei Meerschweinchen eine proinflammatorische Funktion zugeschrieben wird<sup>279</sup>. Ebenso wird bei Überexpression von *ORMDL* bei Taufliegenlarven die Anzahl und die Länge terminaler Tracheenäste, die das funktionelle Analogon zu den Alveoli beim Menschen darstellen, reduziert, wodurch der Sauerstoffaustausch beeinträchtigt wird.<sup>280</sup> Daher ist denkbar, dass die Vielzahl an regulierten Cyp- und Gst-Enzymen zu einer veränderten Fettsäurezusammensetzung im Atemwegsepithel führen und in einem morphologisch auffälligen Atemwegsepithel münden könnten.

Durch den den Zigarettenrauch begleitenden, oxidativen Stress<sup>15</sup> oder sekundär durch die Biotransformation entstehenden ROS<sup>13</sup> kann es zur Entfaltung von Proteinen kommen. Die Konformation der durch ROS denaturierten Proteine kann dann wiederum durch das Hsp70-System wiederhergestellt werden.<sup>16, 19, 20, 22, 281</sup> Neben seiner Induzierbarkeit durch Zigarettenrauch<sup>174</sup> wird dieses Chaperon auch vermehrt im Lungenepithel bei Vorliegen einer chronisch-entzündlichen Erkrankung detektiert.<sup>28, 244, 245</sup> Die Konzentration korreliert bei Asthmatikern unabhängig von Packungsjahren, Geschlecht und Alter mit dem Schweregrad der Erkrankung<sup>245</sup>, und auch bei Vorliegen einer COPD wurde eine Assoziation zwischen Schweregrad und Hsp70-Spiegel beobachtet<sup>28</sup>. Dabei sekretieren Lymphozyten, Alveolarmakrophagen und Epithelzellen infolge des Inflamationsprozesses Hsp70.<sup>245, 282</sup> Bedingt durch seine duale Rolle als Chaperon und Chemokin, induziert das „Chaperokin“<sup>283</sup> Hsp70 über die *Toll-like*-Rezeptoren TLR2 und TLR4 die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und dem Interleukin IL-6 (homolog zu *unpaired* (*upd*)-Liganden, s. auch Kapitel 4.3.2).<sup>283, 284</sup> Auf diese Weise wird die Entzündungsantwort zusätzlich gefördert. Möglicherweise ist *hsp70* ebenfalls bei der Vermittlung der Immunantwort, die innerhalb dieser Arbeit durch Zigarettenrauch reguliert vorgefunden wurde, von Bedeutung.

### 4.3.2 Angeborene Immunantwort: Die Jak/STAT-Signalgebung

Bei dem hier vorgestellten *Drosophila*-Rauchmodell wurde im larvalen Atemwegssystem die angeborene Immunantwort, unter anderem die Jak/STAT-Signalkaskade, durch Zigarettenrauch moduliert. Mit der Inhalation von Tabakrauch gelangen eine Vielzahl an Bakterien in die Lunge, wie



das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*<sup>180</sup>, sowie LPS, welches im Zigarettenrauch zu finden ist und nicht infolge des Verbrennungsprozesses inaktiviert wird<sup>181</sup>. Daher stellt das angeborene Immunsystem in der Tat einen zentralen Angriffspunkt von Tabakrauch dar und es werden die NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden aktiviert. Im Zuge des Entzündungsprozesses ausgeschüttete, proinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-6 und IL-13 induzieren wiederum die Jak/STAT-Signalgebung.<sup>285, 286</sup> Auch ROS, wie sie auch im Zigarettenrauch zu finden sind<sup>15</sup>, aktivieren die den Zelltod einleitende JNK-Kaskade.<sup>287</sup> Die darauffolgende Zellproliferation wird mittels der Jak/STAT-Kaskade induziert<sup>286</sup>, wodurch der Signalweg eine Rolle bei der Geweberegeneration spielt. Als konservierte Signalgebung ist der Jak/STAT-Signalweg ebenfalls bei *Drosophila* aktiv und nimmt ähnliche Funktionen ein.<sup>288</sup> Auch hier ist dieser unter anderem Teil der Immunantwort und wird ebenso durch die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade IMD mobilisiert.<sup>289</sup> Doch ebenso wird dieser über die JNK-Signalgebung kontrolliert.<sup>290-293</sup> Primär wird die Kaskade jedoch durch eine septische Verletzung, eine Virusinfektion oder zellulären Stress aktiviert und fördert die Regeneration verletzter Gewebe.<sup>294</sup> Für Asthmatiker oder an COPD Erkrankte ist eine starke und permanente Immunantwort des Atemwegsepithels durch eine hohe Kolonisation mit Mikroorganismen charakteristisch.<sup>295, 296</sup> Dabei spielen die Kaskaden des angeborenen Immunsystems wie NF- $\kappa$ B und JNK eine zentrale Rolle bei der Pathogenese, ebenso wie die Jak/STAT-Signalgebung.<sup>253-255</sup> Bronchialbiopsien von Patienten mit atopischem und allergischem Asthma zeigen, dass STAT6, ein an der Jak/STAT-Signalgebung beteiligtes zytoplasmatisches Protein, vermehrt synthetisiert wird.<sup>297</sup> Umgekehrt wurde in einem murinen STAT6<sup>-/-</sup>-Asthmamodell beobachtet, dass nach der Sensibilisierung mit und zusätzlicher Applikation von Ovalbumin eine verringerte Eosinophilie, eine verminderte Inflammation, weniger Mukus produzierende Zellen und eine reduzierte Atemwegshyperreagibilität (AHR) auftrat.<sup>255</sup> Inzwischen wird STAT6 auch mit einer erhöhten Asthmasuszeptibilität assoziiert.<sup>38</sup> Eine Hochregulation der Jak/STAT-Liganden *upd2* und *upd3* wurde durch Zigarettenrauchexposition innerhalb dieser Arbeit beobachtet. Eine im Atemwegssystem durch Zigarettenrauch induzierte, erhöhte Expression der Liganden *upd2* und *upd3* bei *Drosophila* wurde durch eine weitere Studie bestätigt.<sup>86</sup> Eine ektopische Überexpression von *upd3* in den Atemwegen von *Drosophila*-Larven führt wiederum zu einer Verdickung des Atemwegsepithels sowie zur Verringerung des luftleitenden Durchmessers des Dorsalstrangs.<sup>298</sup> Die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der Expression von Ligandengen deutet damit auf eine Aktivierung der Jak/STAT-Kaskade, möglicherweise bedingt durch die Einleitung von Reparaturprozessen, in den Atemwegen der Larve hin, die potentiell auch zu morphologisch veränderten Atemwegsstrukturen führen können.

### 4.3.3 Entwicklungs-assoziierte Prozesse: Der kanonische Wnt-Signalweg

Gemäß der Transkriptomanalyse führte eine Zigarettenrauchexposition zu einer Modulation von verschiedenen mit der Entwicklung assoziierten Signalwegen, unter anderem zu einer starken Deregulation von Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs. Dieser ist auch bei der Pathogenese chronisch-entzündlicher Lungenerkrankungen involviert.<sup>247-252</sup> Dabei kommt es zu einer Deregulation des kanonischen Wnt-Signalwegs, der einer Inflammationsantwort, der Umstrukturierung der Atemwege und einer AHR entgegenwirkt.<sup>299</sup> Gleichzeitig wird die reduzierte Expression des Rezeptors *Frizzled 4 (Fzd4)* mit einem beeinträchtigten Reparaturvermögen in den Alveolen von COPD-Patienten assoziiert.<sup>300</sup> Ebenso können durch das verminderte Vorkommen dieses Rezeptors Typ II-Pneumozyten nicht mehr zu Typ I-Pneumozyten transdifferenzieren, was ebenfalls mit einer verminderten Geweberegeneration in Verbindung steht.<sup>300</sup> Dies hebt die aberrante Reparaturantwort hervor, die in einem chronisch-entzündlichen Atemwegsepithel vorherrscht.

Eine Zigarettenrauchexposition führt beim Menschen zu einer Hochregulation von Wnt-Inhibitoren wie den *secreted frizzled-related* Rezeptoren *Sfrp2* oder den Dickkopfrezeptoren *Dkk1*, *Dkk3* und *Dkk4*, die zur Antagonisierung des Signalwegs führen.<sup>53</sup> Im Einklang dazu werden agonistisch wirkende, intrazelluläre Mediatoren wie  $\beta$ -Catenin und der Transkriptionsfaktor *transcription factor 7-like 1 (Tcf7l1)* dereguliert.<sup>53</sup> Doch auch *Wnt3a*, ein Wnt-Ligand, wird vermindert synthetisiert.<sup>247</sup> Insgesamt kommt es zu einer Inhibition der Zelldifferenzierung, welche das Reparaturvermögen des Epithels beeinträchtigt.<sup>53, 247</sup>

Im Zuge der hier durchgeführten Transkriptomanalyse wurden auch in den Atemwegen von *Drosophila*-Larven Inhibitoren des Wnt-Signalwegs wie *off-track (otk)* und *naked (nkd)* nach Konfrontation mit Zigarettenrauch vermehrt exprimiert, während andere Komponenten wie verschiedene Wnt-Liganden wie *Wnt4*, *Wnt6* und *Wnt10* besonders bei den Männchen stark dereguliert wurden. Tatsächlich gibt es auch in der Literatur Belege über eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs in den Atemwegen von *Drosophila*-Larven nach Zigarettenrauchexposition.<sup>298</sup> Auch eine genetische Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs führt zu strukturellen Veränderungen in den Atemwegen.<sup>278</sup> Außerdem führt eine Aktivierung von Jak/STAT ebenfalls zu einer Deregulierung der Wnt-Kaskade im Atemwegsepithel von *Drosophila*.<sup>278</sup> Damit stellt die Jak/STAT-Signalkaskade auch ein Bindeglied zwischen Immun- und Entwicklungsprozessen bei einer Rauchexposition von *Drosophila* dar. Da auch innerhalb dieser Arbeit sowohl die Aktivierung der Jak/STAT-Kaskade als auch die Abregulation des Wnt-Signalwegs beobachtet wurde, ist eine Interaktion zwischen diesen Signalwegen auch in diesem Modell möglich.

Es wird vermutet, dass bereits eine aberrante Entwicklung der Atemwege und der Immunantwort die Pathogenese von *Asthma bronchiale* bedingen, weshalb Asthma auch als Entwicklungskrankheit bezeichnet wird.<sup>246</sup> Der Wnt-Signalweg ist beim Menschen während der Embryogenese an der Lungenentwicklung beteiligt. Hier ist der Signalweg unter anderem für die Entwicklung der peripheren Atemwege der Lunge und für die Zelldifferenzierung relevant.<sup>301</sup> Bei *Drosophila* ist die Kaskade ebenfalls essentiell für die Atemwegsentwicklung und dirigiert während der Embryogenese die Migration der Tracheenäste entlang der anterior-posterioren Achse.<sup>302</sup> Daher ist auch ein frühzeitiger Einfluss dieser Kaskade bei der Zigarettenrauch-induzierten Manifestation struktureller Veränderungen in den Atemwegen auch bei *Drosophila* denkbar. Zusätzlich ist über das im Zytoplasma vorliegende Protein Dishevelled (Dsh) auch eine Kommunikation mit der JNK-Signalkaskade gegeben.<sup>303</sup> Auf diese Weise ist ein Austausch zwischen Entwicklungs- und Immunprozessen möglich, die für die Entwicklung aberranter Atemwegsstrukturen und eines dysfunktionalen Immunsystems durchaus relevant sein könnte. Dies gibt Hinweise darauf, dass auch durch die Modifizierung der kanonischen Wnt-Kaskade eine aberrante Reparaturantwort vorliegt, die eine Umstrukturierung des Atemwegsepithels bedingen kann. Besonders spannend wäre die Analyse der Effekte einer Zigarettenrauchexposition auf ein bereits bestehendes, aberrantes Atemwegsepithel, welches zum Beispiel mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems erhalten wird, um auf diese Weise das bei *Asthma bronchiale* und COPD vorgeschädigte Atemwegsepithel zu simulieren.

#### 4.3.4 GPCR-vermittelte Signalgebung

Mittels der Transkriptomanalyse wurden im Zigarettenrauch-exponierten Atemwegsepithel viele deregulierte Gene vorgefunden, die der GPCR-Signalkaskade zugeordnet werden können. Dabei wurde besonders im Atemwegsepithel männlicher Larven eine starke Abregulation beobachtet. Die GPCR-Signalgebung spielt unter anderem eine Rolle bei der Immunität, bei Entwicklungsprozessen, der Signaltransduktion und bei der Zelladhäsion.<sup>304, 305</sup> Eine Herabregulation von GPCR-assoziierten Proteinen ist dabei charakteristisch für eine Signalabschaltung nach einem Stimulationsreiz. Diese kann unmittelbar infolge einer Degradation des jeweiligen Rezeptors erfolgen.<sup>306</sup> Bei länger anhaltender Signaleinwirkung kann jedoch zusätzlich als schützende Maßnahme die Neusynthese gehemmt werden, welches sich in einer Reduktion von mRNA äußert.<sup>306</sup> Die Tatsache, dass eine stärkere Deregulation im männlichen Geschlecht beobachtet wurde, würde ebenfalls die bisherigen Vermutungen der erhöhten, aufgenommenen Zigarettenrauchdosis von männlichen *Drosophila*-Larven unterstützen.

Da bei Säugern die GPCR die größte Klasse an Oberflächenrezeptoren darstellen<sup>307</sup>, spielt diese Signalkaskade eine zentrale Rolle bei zahlreichen Erkrankungen, unter anderem bei chronischen Inflammationsprozessen der Atemwege<sup>257</sup>. Ein bekannter GPCR ist der  $\beta$ -Adrenorezeptor Adrb2, der

auch in der glatten Atemwegsmuskulatur zu finden ist. Eine Studie mit monozygoten Zwillingspaaren zeigt, dass Raucher eine geringere  $\beta$ -Adrenorezeptordichte auf den Lymphozyten besitzen als der nicht Tabak-konsumierende Zwillingspartner<sup>308</sup> und unterlegt, dass diese Beobachtung unabhängig vom Genom ist. Doch besonders bei der Behandlung chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen nehmen die GPCR eine besondere Funktion ein, da zahlreiche Therapeutika zur Behandlung von *Asthma bronchiale* diese Rezeptoren adressieren, um die Inflammationsantwort zu hemmen.<sup>257</sup> Auch *Adrb2* stellt eine dieser Zielstrukturen dar, da es aufgrund der Bindung des Hormons Adrenalin und anderer Agonisten wie dem Medikamentenwirkstoff Salbutamol zur Bronchodilatation kommt. Weiter hinweisend für die zentrale Rolle der GPCR bei der Pathogenese chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen ist, dass das für den  $\beta$ 2-Adrenorezeptor kodierende Gen *Adrb2* ebenfalls als Asthmasuszeptibilitätsgen gilt.<sup>38</sup> *Adrb2*-Polymorphismen wie Arg16Gly und Gln27Glu werden mit einer stärkeren Agonisten-stimulierten Deregulation von *Adrb2* assoziiert, die sich wieder in einem erhöhten Risiko für Asthma niederschlägt bzw. mit dem Schweregrad der Erkrankung in Zusammenhang steht.<sup>309</sup>

Das *Adrb2*-Homolog bei *Drosophila*, Octopamin- $\beta$ 2-Rezeptor (*Oct $\beta$ 2R*), wird auch in den Tracheen exprimiert<sup>310</sup> und wurde auch in dieser Arbeit nach einer Zigarettenrauchexposition dereguliert vorgefunden. Obwohl die Rolle dieses Rezeptors in den Tracheen noch nicht verstanden ist, ist ein Beitrag zu einem aberrantem Atemwegssystem nicht ausgeschlossen. Wie *Adrb2*<sup>311</sup> wird auch *Oct $\beta$ 2R* in immunkompetenten Zellen und Organen wie Hämocyten sowie Fettkörper exprimiert<sup>312</sup> und kann potentiell zur Inflammationsantwort beitragen. Dies gibt Hinweise darauf, dass eine Zigarettenrauchexposition, welche eine Inflammationsantwort induziert<sup>43</sup>, über die GPCR-vermittelte Signalgebung zu einem veränderten Atemwegsepithel bei *Drosophila* führen kann.

### 4.3.5 Apoptose

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein wichtiges Instrument für den Erhalt der zellulären Homöostase und daher ein evolutionär hochkonservierter Mechanismus. Beim Menschen wie auch bei der Taufliege tritt er physiologisch bei Entwicklungsprozessen und bei Zellalterung auf<sup>313</sup>, ist aber auch in pathologische Prozesse eingebunden. So ist zum Beispiel im Zusammenhang mit oxidativem Stress bekannt, dass apoptotische Vorgänge induziert werden<sup>314</sup>, da aufgrund der adversen Wirkungen von ROS Proteinsequenzen verändert werden und die zelluläre Homöostase irreversibel gestört werden kann. Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch mittels der Transkriptomanalyse im Zigarettenrauch-exponierten Atemwegsepithel Gene vermehrt gefunden wurden, die mit der Apoptose assoziiert werden. Dies war jedoch nur bei den Weibchen der Fall.

Zigarettenrauch trägt durch die vielen ROS, die dieser mit sich führt, zum Zelltod der Atemwegsepithelzellen bei. Dabei wird bei A549-Zellen durch niedrigere Konzentrationen an

Zigarettenrauchextrakt die Apoptose eingeleitet, während höhere Konzentrationen hingegen Nekrose induzieren.<sup>128</sup> Bei Vorliegen einer chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankung wird die Apoptose in zweierlei Hinsicht dysreguliert: Im Zuge des Entzündungsprozesses kommt es zur Rekrutierung von Eosinophilen<sup>299</sup>, die selber dazu in der Lage sind ROS zu generieren. Aufgrund der hohen Belastung mit exogenen und endogenen ROS, leiten Epithelzellen verstärkt die Apoptose ein.<sup>315</sup> Der zweite pathologische Apoptosevorgang betrifft die Eosinophilen selber. Da Eosinophile gekennzeichnet sind durch eine erhöhte Überlebensrate infolge der Verminderung der Apoptose<sup>256</sup>, können sie auf diese Weise über einen längeren Zeitraum zur Inflammation beitragen.

Eine durch oxidativen Stress bedingte Apoptose vermittelt durch die Exposition mit dem Radikalbildner Paraquat konnte auch in einer anderen Studie insbesondere bei *Drosophila*-Weibchen verstärkt nachgewiesen werden.<sup>314</sup> Gleichzeitig sterben weniger Weibchen als Männchen bei Behandlung mit Paraquat.<sup>314</sup> Die Apoptose ist daher ein unabdingliches Instrument, den Organismus vor den schädlichen Auswirkungen dysfunktionaler Zellen zu bewahren.<sup>314</sup> Auch oxidativer Stress schädigt die Zellen. Daher deutet diese Studie<sup>314</sup> auf die Apoptose als einen gegen ROS wirkenden, effizienteren Abwehrmechanismus bei weiblichen Taufliegen hin. Die geringere Suszeptibilität von Weibchen gegenüber Zigarettenrauch wird auch durch die geringere Menge an *hsp*-Transkripten nach Zigarettenrauchexposition im Vergleich zu Rauch-exponierten Männchen bestätigt, die innerhalb dieser Arbeit beobachtet wurde. Da Hitzeschockproteine wiederum effiziente Inhibitoren der Apoptose sind<sup>316</sup>, kann die verminderte Expression von *hsp70*, die sich im Zuge dieser Arbeit bei Weibchen im Vergleich zu Männchen abzeichnete, ebenfalls zu einer verstärkten Apoptoserate bei den Weibchen beitragen (s. auch Kapitel 4.1.3.3). Als stärker aktivierten Abwehrmechanismus schützt die Apoptose vermutlich weibliche Taufliegen daher effizienter als männliche *Drosophila* vor den schädlichen Auswirkungen des Tabakrauchs, welche möglicherweise mehr nekrotische Prozesse aufweisen.

Auch im Verlauf der Metamorphose kommt es zu einer Vielzahl an Umstrukturierungen im gesamten Organismus. Dabei kommt es zu einem Verlust vieler Larvenzellen.<sup>317</sup> *Drosophila*-Larven, die defizient an *Death regulator Nedd2-like Caspase (DRONC)*, homolog zu Caspase-9, eine Caspase, welche für die Apoptose zuständig ist, sind, leiten die Metamorphose nicht ein.<sup>318</sup> Dies zeigt, dass die Apoptose elementar für den Übergang in das nächste Entwicklungsstadium ist.<sup>318</sup> Auch die trachealen Metamere 6 - 10 gehen im Zuge der Metamorphose durch apoptotische Prozesse verloren.<sup>198</sup> Daher ist es denkbar, dass eine Dysregulierung der Apoptose in den Atemwegen zu morphologisch veränderten Strukturen nicht nur in der Larve, sondern auch in der adulten Taufliege führen kann.

### 4.3.6 Telomererhaltung

Zuletzt wurde ausschließlich im Tracheentranskriptom von aus männlichen Larven stammenden Tracheen Gene dysreguliert vorgefunden, die laut DAVID<sup>102, 103</sup> mit der Telomerase-vermittelten Telomererhaltung assoziiert werden. Telomere stellen dabei die Enden von Chromosomen dar und garantieren die Stabilität der DNA. Aufgrund der Verkürzung und damit Destabilisierung linearer DNA mit jedem Replikationszyklus helfen Telomerasen durch ihre reverse Transkriptaseaktivität die Stabilität der Telomere zu bewahren.<sup>319-321</sup> Jedoch stellt *Drosophila* einer der wenigen Organismen dar, dem es an Telomerasen fehlt, stattdessen werden hier die Telomere durch Retrotransposonen bewahrt.<sup>319-321</sup> Möglicherweise ist diese inhaltlich nicht korrekte Zuordnung für den Modellorganismus *Drosophila* dem nicht existierenden GO-Term „Retrotransposon-vermittelte Telomererhaltung“ zuzuschreiben. Zugeordnete Gene wie *radiation sensitive 50 (rad50)* sind dabei durchaus für den Erhalt der Telomere verantwortlich. Studien an *rad50*-Nullmutanten von *Drosophila* belegen, dass eine Defizienz zu einer stark erhöhten Mortalitätsrate zum Ende der Metamorphose hin führt.<sup>322</sup> Die Pharate sind von einem Phänotyp gekennzeichnet, der auch eine erhöhte Apoptoserate widerspiegelt.<sup>322</sup> Die Hochregulation von *rad50*, die innerhalb dieser Arbeit in den Atemwegen männlicher Larven detektiert wurde, deutet daher eher auf eine Gegenregulation hin, und steht auch im Einklang mit dem nicht dysregulierten Prozess der Apoptose bei Männchen. Studien zeigen, dass Raucher verkürzte Telomere besitzen.<sup>241</sup> Auch sind verkürzte Chromosomenenden charakteristisch für Personen, die an *Asthma bronchiale* oder an einer COPD erkrankt sind.<sup>260-262</sup> Die Telomerlänge wiederum spiegelt das „biologische Alter“ wider. Vermutlich wird die Länge der Chromosomenenden durch die permanente Zellproliferation bedingt. Diese wiederum findet aufgrund der für ein chronisch-entzündetes Atemwegsepithel charakteristischen Gewebeschädigung durch die andauernde Inflammation und der erhöhten Belastung mit oxidativem Stress statt. Eine stetige Zellproliferation kann auf diese Weise die erhöhte Apoptoserate kompensieren.<sup>323</sup> Gleichzeitig wird jedoch auch vermutet, dass die Zellseneszenz und die Exposition mit Zigarettenrauch die erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion bedingt und auf diese Weise Inflammationsprozesse fördert.<sup>323</sup> Interessanterweise wurden in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) diverse Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) im *Rad50*-II13-Lokus bei Menschen mit Asthma in Verbindung gebracht, wobei unter anderem das SNP rs2244012 von *rad50* mit dieser Erkrankung assoziiert wird.<sup>324</sup> Jedoch ist die Funktion von *Rad50* bei *Asthma bronchiale* bisher nicht bekannt.<sup>324</sup> Daher ist vorstellbar, dass eine Imbalance dieses Systems bei *Drosophila* sowohl die Anfälligkeit gegenüber Infektionen erhöhen und dadurch in einem morphologisch auffälligen Atemwegsepithel münden kann.

Die Transkriptomanalyse sollte Aufschluss darüber geben, inwiefern durch Zigarettenrauch modulierte Gene und Signalwege zu der Entwicklung morphologisch auffälliger Atemwege bei *Drosophila* beitragen. Dabei lagen eine Vielzahl an Kaskaden verändert vor, die nicht nur zum *airway remodelling* bei der Taufliege beitragen. Diese Signalgebungen sind auch bekannt bei chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen eine Rolle zu spielen. Damit zeigt sich, dass die Taufliege einen idealen Organismus darstellt, um die Auswirkungen von Zigarettenrauch auf die Entstehung und die Entwicklung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen der Atemwege wie Asthma und COPD zu untersuchen.

#### **4.3.7 Ist *Drosophila* potentiell dazu in der Lage, Zigarettenrauch-induzierte Effekte über mehrere Generationen hinweg zu vermitteln?**

Da die Exposition der elterlichen bzw. großelterlichen Generation mit Tabakrauch bei den Nachkommen zu einem erhöhten Risiko von Asthma<sup>73-79</sup> und vermutlich auch COPD<sup>80</sup> führt, sind möglicherweise epigenetische Mechanismen für diese erhöhte Suszeptibilität mitverantwortlich<sup>224</sup>. Erst bei Auftreten einer erhöhter Suszeptibilität ab der dritten Filialgeneration ( $f_3$ ) kann eine epigenetische Komponente hierfür als zweifelsfreie Ursache in Betracht gezogen werden, da beim Rauchen während der Schwangerschaft die erste ( $f_1$ ) und zweite Filialgeneration ( $f_2$ , hier in Gestalt der Keimzellen in der  $f_1$ -Generation) noch in direktem Kontakt mit dem Zigarettenrauch standen. Erste Hinweise darauf ergeben sich durch die Studie von REHAN *et al.* an Ratten, die zeigt, dass bei perinataler Nikotinapplikation die  $f_3$ -Generation eine reduzierte Lungenfunktion und einen erhöhten Atemwegswiderstand aufweist.<sup>325</sup>

Obwohl die hier vorgelegte Arbeit keinen Einblick in die epigenetische Regulation von Genen und Mechanismen geben kann, belegen die Ergebnisse anderer Studien, dass Rauch epigenetische Signaturen im Genom setzt: So ist beispielsweise bekannt, dass Zigarettenrauch zur Hypomethylierung des *Cyp1a1*-Promotors und zu einer verstärkten Transkription des Gens beim Menschen führt.<sup>235-237</sup> Ein verstärktes *Cyp18a1*-Expressionslevel wurde auch innerhalb dieser Arbeit detektiert. Wie zuvor bereits in Kapitel 4.3.1 diskutiert, bedingt die verstärkte Expression von *Cyp18a1* möglicherweise ein morphologisch auffälliges Atemwegsepithel in der Taufliege. Ob sich dies jedoch auch auf weitere Generationen auswirkt, obliegt weiterer Untersuchungen.

Neben der direkten Einflussnahme des Zigarettenrauchs auf das Epigenom, ist ebenfalls denkbar, dass eine durch Rauch veränderte Genexpression einen Einfluss auf die Chromatinstruktur hat. So wurde innerhalb dieser Arbeit neben dem Chaperon *hsp70* auch weitere Faltungshelfer wie *hsp90* im *Drosophila*-Respirationssystem verstärkt exprimiert. Hsp90 dient als Chaperon bei der AhR-vermittelten Bindung von PAH.<sup>326</sup> Bei Kindern mit Asthma liegen erhöhte Hsp90-Proteinmengen vor.<sup>327</sup> Aufgrund der Fähigkeit dieses Chaperons die Chromatinstruktur zu verändern, wird eine

generationsübergreifende Vererbung über diesen Mechanismus vermutet<sup>264</sup>, der sowohl beim Menschen als auch bei der Taufliege zum Tragen kommen könnte. In der Tat werden Chromatinzustände bei *Drosophila* auch meiotisch vererbt und können auf diese Weise ein epigenetisches Gedächtnis bilden<sup>328</sup>, beim Menschen ist diese Art der Vererbung derzeit noch nicht bekannt. Jedoch vermitteln vermutlich ähnliche Mechanismen die Vererbung<sup>264</sup>. Möglicherweise werden generationsübergreifende Effekte bei *Drosophila* und auch beim Menschen über das Hsp90-Chaperon eingeführt.

Ebenso wurden innerhalb dieser Arbeit dysregulierte Gene detektiert, die mit der Telomererhaltung in Verbindung stehen. Bei *Drosophila* wird bei Stämmen, die defizient an der *de novo*-Methyltransferase *Dnmt2* sind, ein Verlust von telomerischen Clustern verzeichnet.<sup>329</sup> Dieser Verlust geht mit einer reduzierten Telomerintegrität am 2R- und 3R-Chromosom einher.<sup>329</sup> Bei Einkreuzen dieser aberranten Chromosomen in einen Wildtyp-Hintergrund, der funktionell aktives *Dnmt2* besitzt, zeigt sich, dass der Verlust am 3R-Chromosom über zwölf Generationen hinweg persistiert.<sup>329</sup> *Dnmt2* wird auch in den Transkriptomanalysen dereguliert vorgefunden. Möglicherweise kann durch das hier vorgestellte Rauchmodell auch über diesen Mechanismus ein generationsübergreifender Effekt eingeleitet werden. Auch *hsp70* liegt auf diesem Chromosom und könnte vom Verlust telomerischer Cluster betroffen sein.

Interessanterweise wurden mittels der durchgeführten Transkriptomanalyse auch Gene detektiert, die mit der Reproduktion assoziiert werden (Abb. 3.13), obwohl das betrachtete Organ nicht die Gonaden waren. Dies steht mit dem Design der Auswertungssoftware DAVID<sup>102, 103</sup> in Zusammenhang, da in die Analyse nicht integriert werden kann, welches Organ Gegenstand der Betrachtung ist. Dadurch bezieht die Software sämtliche bekannte Literatur in die Auswertung ein. Nichtsdestotrotz ist durchaus möglich, dass auch die Reproduktion in der ganzen Larve durch die Zigarettenrauchexposition moduliert wird, da viele Gene pleiotrope Funktionen in verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien übernehmen können. Die umgekehrte Situation, dass die Pleiotropie der Gene in anderen Organen Auswirkungen auf das Atemwegssystem hat, kann mit dem in dieser Arbeit verwendeten Aufbau ausgeschlossen werden. Diese Aussage wird aufgrund dessen getroffen, da die Tracheen als der erste Eintrittsort des Zigarettenrauchs in den Organismus identifiziert wurde (s. Abb. 3.7 und Abb. 3.8) und eine nach Ende der Zigarettenrauchexposition zeitnahen Transkriptomanalysen durchgeführt wurden. Besonders der Prozess der Reproduktion ist interessant in Hinsicht auf generationsübergreifende Studien, da dies Hinweise auf Auswirkungen des Zigarettenrauchs auf die Keimbahnzelllinie gibt. Innerhalb dieser Arbeit konnte kein Einfluss einer Zigarettenrauchexposition im Larvalstadium auf die Fertilität der hervorgehenden Imagines beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Doch wirkt sich die Zigarettenrauchexposition von *Drosophila*-Larven nachweislich mutagen auf die Spermatozyten aus.<sup>141</sup> Die Injektion von



Zigarettenrauchfiltrat in adulte Männchen wirkt ebenfalls mutagen auf Spermatozyten sowie Spermatogonien.<sup>143</sup> Dies ist auch noch in nachfolgenden Generationen zu beobachten.<sup>143</sup> Ebenfalls ist ein Großteil der Imagines auch lange Zeit nach der Behandlung steril.<sup>143</sup> Auch dies deutet darauf hin, dass Zigarettenrauch über die Generationen hinweg Auswirkungen haben kann. Jedoch geben die Transkriptomanalysen dieser Arbeit lediglich Hinweise auf potentielle Einflüsse des Zigarettenrauchs auf das Reproduktionssystem. Eine Aussage diesbezüglich bedarf weiterer Studien.

#### 4.4 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte nicht nur gezeigt werden, dass Zigarettenrauch nicht nur über die Atemwege von der Larve aufgenommen, sondern auch dass auch auf verhaltensbiologischer und pathologischer Ebene die Taufliege auf die Exposition mit Zigarettenrauch vergleichbar zu anderen Systemen reagiert. Die im Zuge der Transkriptomanalyse durch Zigarettenrauch modulierten Prozesse sind auch bekannt dafür, bei chronischen Entzündungen der Atemwege reguliert zu werden und potentiell auch bei *Drosophila* zum Tabakrauch-induzierten *airway remodelling* beitragen. Obwohl bereits bekannt ist, dass *Drosophila* ein etabliertes Modell für die Untersuchung von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen darstellt<sup>38, 85, 86</sup>, konnte mittels dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Taufliege ein ideales Modell darstellt *in vivo* den Einfluss des Risikofaktors Zigarettenrauchexposition auf die Entstehung dieser Erkrankungen zu analysieren. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass eine Zigarettenrauchexposition im Larvalstadium über die Metamorphose hinaus wirksam ist und einen Einfluss auf die Fitness der adulten Taufliege hat. Viele Prozesse und Mechanismen wurden durch die Transkriptomanalyse isolierter Atemwege ermittelt, die nicht nur zu einer Umstrukturierung der Atemwege bei *Drosophila* führen können, sondern ebenfalls das Potential haben, generationsübergreifend Auswirkungen auf das Atemwegsepithel zu haben. Im Fokus nachfolgender Studien liegt auf der Anpassung des Rauchmodells, sodass morphologisch veränderte Atemwege auftreten, die Tragweite dieses Effekts auf die nächsten Generationen zu analysieren und Gene und Mechanismen zu ermitteln, die diese bedingen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Thurmond, J., Goodman, J. L., Strelets, V. B., Attrill, H., Gramates, L. S., Marygold, S. J., Matthews, B. B., Millburn, G., Antonazzo, G., Trovisco, V., Kaufman, T. C., Calvy, B. R. & Flybase Consortium. FlyBase 2.0: the next generation. *Nucleic Acids Res.* **47**, D759 - D765 (2019).
2. Bank, T. W. Curbing the epidemic: governments and the economics of tobacco control. *Tob. Control* **8**, 196 - 201 (1999).
3. Swindle, E. J., Collins, J. E. & Davies, D. E. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 23 - 34 (2009).
4. Lloyd, C. M. & Marsland, B. J. Lung homeostasis: influence of age, microbes, and the immune system. *Immunity* **46**, 549 - 561 (2017).
5. Grubor, B., Meyerholz, D. K. & Ackermann, M. R. Collectins and cationic antimicrobial peptides of the respiratory epithelia. *Vet. Pathol.* **43**, 595 - 612 (2006).
6. Campbell, H. K., Maiers, J. L. & DeMali, K. A. Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp. Cell Res.* **358**, 39 - 44 (2017).
7. Rezaee, F. & Georas, S. N. Breaking barriers. New insights into airway epithelial barrier function in health and disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 857 - 569 (2014).
8. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 432 - 438 (2001).
9. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. & Akira, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.* **162**, 3749 - 3752 (1999).
10. Greene, C. M. & McElvaney, N. G. Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **53**, 418 - 427 (2005).
11. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **83**, 1 - 1438 (2004).
12. Marquardt, H., Schäfer, S. G. & Barth, H. *Toxikologie*. (3. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2013).
13. Briedé, J. J., Godschalk, R. W. Ö., Emans, M. T. G., de Kok, T. M. C. M., van Agen, E., van Maanen, J., van Schooten, F.-J. & Kleinjans, J. C. S. *In vitro* and *in vivo* studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[*a*]pyrene metabolism. *Free Radic. Res.* **38**, 995 - 1002 (2004).
14. Vohr, H.-W. *Toxikologie Band 1. Grundlagen der Toxikologie*. (1. Aufl., Wiley-VCH, Heidelberg, 2010).

15. Cantin, A. M. Cellular response to cigarette smoke and oxidants: adapting to survive. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **7**, 368 - 375 (2010).
16. Liberek, K., Lewandowska, D. & Ziętkiewicz, S. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J.* **27**, 328 - 335 (2008).
17. Marimoto, R. I. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.* **22**, 1427 - 1438 (2008).
18. Pratt, W. B., Morishima, Y., Peng, H. M. & Osawa, Y. Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **235**, 278 - 289 (2010).
19. Tower, J. Heat shock proteins and *Drosophila* aging. *Exp. Gerontol.* **46**, 355 - 362 (2011).
20. Stricher, F., Macri, C., Ruff, M. & Muller, S. HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy* **9**, 1937 - 1954 (2013).
21. Wang, F., Bonam, S. R., Schall, N., Kuhn, L., Hammann, P., Chaloin, O., Madinier, J.-B., Briand, J.-P., Page, N. & Muller, S. Blocking nuclear export of HSPA8 after heat shock stress severely alters cell survival. *Sci. Rep.* **8**, 16820 (2018).
22. Donovan, M. R. & Marr, M. T., II. dFOXO activates large and small heat shock protein genes in response to oxidative stress to maintain proteostasis in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **291**, 19042 - 19050 (2016).
23. Larsen, M. C., Angus, W. G. R., Brake, P. B., Eltom, S. E., Sukow, K. A. & Jefcoate, C. R. Characterization of CYP1A1 and CYP1B1 expression in human mammary epithelial cells: role of the aryl hydrocarbon receptor in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Cancer Res.* **58**, 2366 - 2374 (1998).
24. Wen, X. & Walle, T. Preferential induction of CYP1B1 by benzo[a]pyrene in human oral epithelial cells: impact on DNA adduct formation and prevention by polyphenols. *Carcinogenesis* **26**, 1774 - 1781 (2005).
25. Harrigan, J. A., McGarrigle, B. P., Sutter, T. R. & Olson, J. R. Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following *in vitro* (tissue slice) and *in vivo* exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol. In Vitro* **20**, 426 - 438 (2006).
26. Pavek, P. & Dvorak, Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr. Drug Metab.* **9**, 129 - 143 (2008).
27. Gould, N. S., Min, E., Gauthier, S., Martin, R. J. & Day, B. J. Lung glutathione adaptive responses to cigarette smoke exposure. *Respir. Res.* **12** (2011).
28. Dong, J., Guo, L., Liao, Z., Zhang, M., Wang, T., Chen, L., Xu, D., Feng, Y. & Wen, F. Increased expression of heat shock protein 70 in chronic obstructive pulmonary disease. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 885 - 893 (2013).
29. Vayssier-Taussat, M., Camilli, T., Aron, Y., Meplan, C., Hainaut, P., Polla, B. S. & Weksler, B. Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H1293 - H1300 (2001).

30. Gould, N. S., Min, E., Gauthier, S., Chu, H. W., Martin, R. & Day, B. J. Aging adversely affects the cigarette smoke-induced glutathione adaptive response in the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 1114 - 1122 (2010).
31. Yang, J. & Tower, J. Expression of *hsp22* and *hsp70* transgenes is partially predictive of *Drosophila* survival under normal and stress conditions. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **64**, 828 - 838 (2009).
32. Kwak, H. C., Kim, H. C., Oh, S. J. & Kim, S. K. Effects of age increase on hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male C57BL/6 mice. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 857 - 864 (2015).
33. Yun, K. U., Oh, S. J., Oh, J. M., Kang, K. W., Myung, C. S., Song, G. Y., Kim, B.-H. & Kim, S. K. Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats. *Arch. Toxicol.* **84**, 939 - 946 (2010).
34. Charradi, K., Elkahoui, S., Limam, F. & Aouani, E. High-fat diet induced an oxidative stress in white adipose tissue and disturbed plasma transition metals in rat: prevention by grape seed and skin extract. *J. Physiol. Sci.* **63**, 445 - 455 (2013).
35. Busse, P. J., Birmingham, J., Calatroni, A., Manzi, J., Goryachokovsky, A., Fontela, G., Federman, A. & Wisnivesky, J. The effect of aging on sputum inflammation and asthma control. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 1808 - 1818 (2017).
36. John-Schuster, G., Günter, S., Hager, K., Conlon, T. M., Eickelberg, O. & Yildirim, A. Ö. Inflammaging increases susceptibility to cigarette smoke-induced COPD. *Oncotarget* **2016**, 21 (2016).
37. Patel, S., Custovic, A., Smith, J. A., Simpson, A., Kerry, G. & Murray, C. S. Cross-sectional association of dietary patterns with asthma and atopic sensitization in childhood - in a cohort study. *Pediatr. Allergy Immunol.* **25**, 565 - 571 (2014).
38. Roeder, T., Isermann, K. & Kabesch, M. *Drosophila* in asthma research. *Am. J. Respir. Crit. Care* **179**, 979 - 983 (2009).
39. Salam, M. T., Lin, P.-C., Avol, E. L., Gauderman, W. J. & Gilliland, F. D. Microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase P1, traffic and childhood asthma. *Thorax* **62**, 1050 - 1057 (2007).
40. Wang, C.-D., Chen, N., Huang, L., Wang, J.-R., Chen, Z.-Y., Jiang, Y.-M., He, Y.-Z. & Ji, Y.-L. Impact of CYP1A1 polymorphisms on susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 942958 (2015).
41. Piacentini, S., Polimanti, R., Simonelli, I., Donno, S., Pasqualetti, P., Manfellotto, D. & Fuciarelli, M. Glutathione S-transferase polymorphisms, asthma susceptibility and confounding variables: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 3299 - 4313 (2013).
42. Faramawy, M. M., Mohammed, T. O., Hossaini, A. M., Kashem, R. A. & Abu Rahma, R. M. Genetic polymorphism of GSTT1 and GSTM1 and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J. Crit. Care* **24**, e7 - e10 (2009).
43. van der Vaart, H., Postma, D. S., Timens, W. & Ten Hacken, N. H. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* **59**, 713 - 721 (2004).

44. Miller, E. J., Nagao, S., Carr, F. K., Noble, J. M. & Cohen, A. B. Interleukin-8 (IL-8) is a major neutrophil chemotaxin from human alveolar macrophages stimulated with staphylococcal enterotoxin A (SEA). *Inflamm. Res.* **45**, 386 - 392 (1996).
45. Saetta, M., Turato, G., Baraldo, S., Zanin, A., Braccioni, F., Mapp, C. E., Maestrelli, P., Cavallisco, G., Papi, A. & Fabbri, L. M. Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1016 - 1021 (2000).
46. Leopold, P. L., O'Mahony, M. J., Lian, X. J., Tilley, A. E., Harvey, B.-G. & Crystal, R. G. Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS One* **4**, e8157 (2009).
47. Tilley, A. E., Walters, M. S., Shaykhiev, R. & Crystal, R. G. Cilia dysfunction in lung disease. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 379 - 406 (2015).
48. Pierson, T., Learmonth-Pierson, S., Pinto, D. & van Hoek, M. L. Cigarette smoke extract induces differential expression levels of beta-defensin peptides in human alveolar epithelial cells. *Tob. Induc. Dis.* **11** (2013).
49. Rems, L., Viano, M., Kasimova, M. A., Miklavčič, D. & Tarek, M. The contribution of lipid peroxidation to membrane permeability in electroporation: a molecular dynamics study. *Bioelectrochemistry* **125**, 46 - 57 (2019).
50. Shaykhiev, R., Otaki, F., Bonsu, P., Dang, D. T., Teater, M., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Harvey, B. G. & Crystal, R. G. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 877 - 892 (2011).
51. Forteza, R. M., Casalino-Matsuda, S. M., Falcon, N. S., Valencia Gattas, M. & Monzon, M. E. Hyaluronan and layilin mediate loss of airway epithelial barrier function induced by cigarette smoke by decreasing E-cadherin. *J. Biol. Chem.* **287**, 42288 - 42298 (2012).
52. Nishida, K., Brune, K. A., Putcha, N., Mandke, P., O'Neal, W. K., Shade, D., Srivastava, V., Wang, M., Lam, H., An, S. S., Drummond, M. B., Hansel, N. N., Robinson, D. N. & Sidhaye, V. K. Cigarette smoke disrupts monolayer integrity by altering epithelial cell-cell adhesion and cortical tension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **313**, L581 - L591 (2017).
53. Wang, R., Ahmed, J., Wang, G., Hassan, I., Strulovici-Barel, Y., Hackett, N. R. & Crystal, R. G. Down-regulation of the canonical Wnt  $\beta$ -catenin pathway in the airway epithelium of healthy smokers and smokers with COPD. *PLoS One* **6**, e14793 (2011).
54. Schamberger, A. C., Mise, N., Jia, J., Genoyer, E., Yildirim, A. Ö., Meiners, S. & Eickelberg, O. Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor- $\beta$ . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 1040 - 1052 (2014).
55. Runas, K. A. & Malmstadt, N. Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers. *Soft matter* **11** (2015).
56. <http://www.deeprancenow.com/stop-smoking.php>. (Zugriff am: 28.11.2019)
57. Tilley, A. E., Harvey, B. G., Heguy, A., Hackett, N. R., Wang, R., O'Connor, T. P. & Crystal, R. G. Down-regulation of the Notch pathway in human airway epithelium in association with smoking and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 457 - 466 (2009).

58. Amatngalim, G. D., Broekman, W., Daniel, N. M., van der Vlugt, L. E., van Schadewijk, A., Taube, C. & Hiemstra, P. S. cigarette smoke modulates repair and innate immunity following injury to airway epithelial cells. *PLoS One* **11**, e0166255 (2016).
59. Kim, Y.-S., Hong, G., Kim, D. H., Kim, Y. M., Kim, Y.-K., Oh, Y.-M. & Jee, Y.-K. The role of FGF-2 in smoke-induced emphysema and the therapeutic potential of recombinant FGF-2 in patients with COPD. *Exp. Mol. Med.* **50**, 150 (2018).
60. Lams, B. E. A., Sousa, A. R., Rees, P. J. & Lee, T. H. Immunopathology of the small-airway submucosa in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 1523 (1998).
61. Xu, X., Dockery, D. W., Ware, J. H., Speizer, F. E. & Ferris, B. G., Jr. Effects of cigarette smoking on rate of loss of pulmonary function in adults: a longitudinal assessment. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 1345 - 1348 (1992).
62. Prokhorov, A. V., Emmons, K. M., Pallonen, U. E. & Tsoh, J. Y. Respiratory response to cigarette smoking among adolescent smokers: a pilot study. *Prev. Med.* **25**, 633 - 640 (1996).
63. Bagaikar, J., Demuth, D. R. & Scott, D. A. Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection. *Tob. Induc. Dis.* **4**, 12 (2008).
64. Ahn, K. S. & Aggarwal, B. B. Transcription factor NF- $\kappa$ B: a sensor for smoke and stress signals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1056**, 218 - 233 (2005).
65. Garbin, U., Fratta Pasini, A., Stranieri, C., Cominacini, M., Pasini, A., Manfro, S., Lugoboni, F., Mozzini, C., Guidi, G., Faccini, G. & Cominacini, L. Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation. *PLoS One* **4**, e8225 (2009).
66. [www.lungeninformationsdienst.de](http://www.lungeninformationsdienst.de). (Zugriff am: 18.01.2020)
67. Zein, J. G. & Erzurum, S. C. Asthma is different in women. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **15**, 28 (2015).
68. Barnes, P. J. Sex differences in chronic obstructive pulmonary disease mechanisms. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 813 - 824 (2016).
69. van Eerdewegh, P., Little, R. D., Dupuis, J., del Mastro, R. G., Falls, K., Simon, J., Torrey, D., Pandit, S., McKenny, J., Braunschweiger, K., Walsh, A. A., Liu, Z. G., Hayward, B., Folz, C., Manning, S. P., Bawa, A., Aracino, L., Thackston, M., Benchekroun, Y., Capprell, N., Wang, M., Adair, R., Feng, Y., Dubois, J., FitzGerald, M. G., Huang, H., Gibson, R., Allen, K. M., Pedan, A., Danzig, M. R., Umland, S. P., Egan, R. W., Cuss, F. M., Rorke, S., Clough, J. B., Holloway, J. W., Holgate, S. T. & Keith, T. P. Association of ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* **418**, 426 - 430 (2002).
70. Zhou, D. C., Zhou, C. F., Toloo, S., Shen, T., Tong, S. L. & Zhu, Q. X. Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene polymorphisms with the risk of COPD: an updated meta-analysis of 2,644 cases and 4,803 controls. *Mol. Biol. Rep.* **42**, 409 - 422 (2015).
71. Thomson, N. C., Chaudhuri, R. & Livingston, E. Asthma and cigarette smoking. *Eur. Respir. J.* **24**, 822 - 833 (2004).

72. Lundbäck, B., Lindberg, A., Lindström, M., Rönmark, E., Jonsson, A. C., Jönsson, E., Larsson, L.-G., Andersson, S., Sandström, T. & Larsson, K. Not 15 but 50 % of smokers develop COPD? - Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir. Med.* **97**, 115 - 122 (2003).
73. Agabiti, N., Mallone, S., Forastiere, F., Corbo, G. M., Ferro, S., Renzoni, E., Sestini, P., Rusconi, F., Ciccone, G., Viegi, G., Chellini, E., Piffer, S. & Group, S. C. The impact of parental smoking on asthma and wheezing. *Epidemiology* **10**, 692 - 698 (1999).
74. Gilliland, F. D., Li, Y.-F. & Peters, J. M. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163** (2001).
75. Dai, X., Dharmage, S. C., Lowe, A. J., Allen, K. J., Thomas, P. S., Perret, J., Waidyatillake, N., Matheson, M. C., Svanes, C., Welsh, L., Abramson, M. J. & Lodge, C. J. Early smoke exposure is associated and lung function deficits in adolescents. *J. Asthma* **54**, 662 - 669 (2017).
76. Li, Y.-F., Langholz, B., Salam, M. T. & Gilliland, F. D. Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma. *Chest* **127**, 1232 - 1241 (2005).
77. Lodge, C. J., Braback, L., Lowe, A. J., Dharmage, S. C., Olsson, D. & Forsberg, B. Grandmaternal smoking increases asthma risk in grandchildren: a nationwide Swedish cohort. *Clin. Exp. Allergy* **48**, 167 - 174 (2018).
78. Magnus, M. C., Haberg, S. E., Karlstad, O., Nafstad, P., London, S. J. & Nystad, W. Grandmother's smoking when pregnant with the mother and asthma in the grandchild: the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Thorax* **70**, 237 - 243 (2015).
79. Svanes, C., Koplin, J., Skulstad, S. M., Johannessen, A., Bertelsen, R. J., Benediktsdottir, B., Braback, L., Elie Carsin, A., Dharmage, S., Dratva, J., Forsberg, B., Gislason, T., Heinrich, J., Holm, M., Janson, C., Jarvis, D., Jogi, R., Krauss-Etschmann, S., Lindberg, E., Macsali, F., Malinowski, A., Modig, L., Norback, D., Omenaas, E., Waatevik Saure, E., Sigsgaard, T., Skorge, T. D., Svanes, O., Toren, K., Torres, C., Schlunssen, V. & Gomez Real, F. Father's environment before conception and asthma risk in his children: a multi-generation analysis of the Respiratory Health In Northern Europe study. *Int. J. Epidemiol.* **46**, 235 - 245 (2017).
80. Hylkema, M. N. & Blacquièrre, M. J. Intrauterine effects of maternal smoking on sensitization, asthma, and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **6**, 660 - 662 (2009).

81. 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. C., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor Miklos, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H.-J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, F. 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, M. W., 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., Deslattes Mays, A., 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, H.-H., Ibegwam, C., Jalali, M., Dalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmer, 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., Mette, 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., Plaazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S. T., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D. C., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Sidén-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.-R., 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. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185 - 2195 (2000).
82. Fortini, M. E., Skupski, M. P., Boguski, M. S. & Harharan, I. K. A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *J. Cell Biol.* **150**, F23 - F29 (2000).
83. Wangler, M. F. & Bellen, H. J. In vivo animal modeling: *Drosophila*. in *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (Editoren: Jalali, M., Saldanha, F. Y. L. & Jalali, M.) 211 - 234 (1. Aufl., Elsevier Inc. Academic Press, London, UK 2017).
84. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401 - 415 (1993).
85. Fehrenbach, H., Wagner, C. & Wegmann, M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res.* **367**, 551 - 569 (2017).
86. Prange, P., Thiemann, M., Bhandari, A., Mishra, N., Sinha, A., Häslner, R., Rosenstiel, P., Uliczka, K., Wagner, C., Yildirim, A. Ö., Fink, C. & Roeder, T. A *Drosophila* model of cigarette smoke induced COPD identifies Nrf2 signaling as an expedient target for intervention. *Aging* **10**, 2122 - 2135 (2018).
87. Rühle, H. Das larvale Tracheensystem von *Drosophila melanogaster* Meigen und seine Variabilität. *Zeit wissenschaftl. Zool.* **141**, 159 - 245 (1932).
88. Ghabrial, A., Luschnig, S., Metzstein, M. M. & Krasnow, M. A. Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 623 - 647 (2003).



89. Whitten, J. M. The post-embryonic development of the tracheal system in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* **s3 - s98**, 123 - 150 (1957).
90. Wigglesworth, V. B. *The principles of insect physiology*. (2. Aufl., Methuen & Co., London, UK, 1942).
91. Manning, G. & Krasnow, M. A. Development of the *Drosophila* tracheal system. in *The Development of Drosophila melanogaster* (Editoren: Bate, M. & Martinez Arias, A.) Band 1 (1. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York City, NY, USA, 2009).
92. Tzou, P., De Gregorio, E. & Lemaitre, B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 102 - 110 (2002).
93. Wagner, C., Isermann, K., Fehrenbach, H. & Roeder, T. Molecular architecture of the fruit fly's airway epithelial immune system. *BMC genomics* **9**, 446 (2008).
94. Harrison, J. F. Tracheal System. in *Encyclopedia of Insects* (Editoren: Resh, V. H. & Cardé, R. T.) 1011 - 1014 (2. Aufl., Elsevier Inc. Academic Press, London, UK, 2009).
95. Akhbir, L. & Sandford, A. J. Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma. *Respirology* **16**, 396 - 406 (2011).
96. Campbell, C. D., Mohajeri, K., Malig, M., Hormozdiari, F., Nelson, B., Du, G., Patterson, K. M., Eng, C., Torgerson, D. G., Hu, D., Herman, C., Chong, J. X., Ko, A., O'Roak, B. J., Krumm, N., Vives, L., Lee, C., Roth, L. A., Rodriguez-Cintron, W., Rodriguez-Santana, J., Brigino-Buenaventura, E., Davis, A., Meade, K., LeNoir, M. A., Thyne, S., Jackson, D. J., Gern, J. E., Lemanske, R. F., Jr., Shendure, J., Abney, M., Burchard, E. G., Ober, C. & Eichler, E. E. Whole-genome sequencing of individuals from a founder population identifies candidate genes for asthma. *PLoS One* **9**, e104396 (2014).
97. Vercelli, D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 169 - 182 (2008).
98. Kere, J. Mapping and identifying genes for asthma and psoriasis. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **360**, 1551 - 1561 (2005).
99. Wagner, C., Isermann, K. & Roeder, T. Infection induces a survival program and local remodeling in the airway epithelium of the fly. *FASEB J.* **23**, 2045 - 2054 (2009).
100. R Core Team. A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. <http://www.R-project.org> (2013).
101. RStudio Team. Integrated Development fo R. *RStudio, Inc., Boston, MA, USA*. <http://www.rstudio.com/> (2015).
102. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using resources. *Nature Protoc.* **4**, 44 - 57 (2009).
103. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1 - 13 (2009).

104. Rasband, W. S. Image J. *U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.* <https://imagej.nih.gov/ij/> (1997 - 2018).
105. Green, R. M., Gally, F., Keeney, J. G., Alper, S., Gao, B., Han, M., Martin, R. J., Weinberger, A. R., Case, S. R., Minor, M. N. & Chu, H. W. Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: a *C. elegans* Modell. *PLoS One* **4**, e6860 (2009).
106. du Rand, E. E., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W. W. & Nicolson, S. W. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci. Rep.* **5**, 11779 (2015).
107. <https://www.emka.fr/product/inexpose/>. (Zugriff am: 10.07.2019)
108. Linford, N. J., Bilgir, C., Ro, J. & Pletcher, S. D. Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. *J. Vis. Exp.* **71**, pii: 50068 (2013).
109. Callejo, A., Quijada, L. & Guerrero, I. Detecting tagged Hedgehog with intracellular and extracellular immunocytochemistry for functional analysis. *Methods Mol. Biol.* **397**, 91 - 104 (2007).
110. Science, R. A. Quantifizierungsstrategien mit dem LightCycler® 480 PCR-Analysesystem 2012. <https://docplayer.org/26120-Roche-applied-science-quantifizierungsstrategien-mit-dem-lightcycler-480-pcr-analysesyste.html>. (Zugriff am: 13.09.2019)
111. Technologies, A., Mueller, O., Lightfoot, S. & Schroeder, A. RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf>. (Zugriff am: 13.09.2019)
112. Nichols, C. D., Becnel, J. & Pandey, U. B. Methods to assay *Drosophila* behavior. *J. Vis. Exp.* **61**, 3795 (2012).
113. Bainton, R. J., Tsai, L. T.-Y., Singh, C. M., Moore, M. S., Neckameyer, W. S. & Heberlein, U. Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **10**, 187 - 194 (2000).
114. Ferrari, S. L. P. & Cribari-Neto, F. Beta regression for modelling rates and proportions. *J. Appl. Stat.* **31**, 799 - 815 (2004).
115. Cribari-Neto, F. & Zeileis, A. Beta Regression in R. *J. Stat. Sof.* **34**, 1 - 24 (2010).
116. Fujiwara, M., Hamatake, Y., Arimoto, S., Okamoto, K., Suzuki, T. & Negishi, T. Exposure to cigarette smoke increases urate level and decreases glutathione level in larval *Drosophila melanogaster*. *Genes Environ.* **33**, 89 - 95 (2011).
117. Almqvist, C., Worm, M. & Leynaert, B. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA<sup>2</sup>LEN review. *Allergy* **63**, 47 - 57 (2008).
118. Thummel, C. S. Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev. Cell* **1**, 453 - 465 (2001).
119. Snyder, M. J., Hsu, E.-L. & Feyereisen, R. Induction of cytochrome P-450 activities by nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Chem. Ecol.* **19**, 2903 - 2916 (1993).

120. Benowitz, N. L., Hukkanen, J. & Jacob III., P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 29 - 60 (2009).
121. Guittard, E., Blais, C., Maria, A., Parvy, J. P., Pasricha, S., Lumb, C., Lafont, R., Daborn, P. J. & Dauphin-Villemant, C. CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Dev. Biol.* **349**, 35 - 45 (2011).
122. Rewitz, K. F., Yamanaka, N. & O'Connor, M. B. Steroid hormone inactivation is required during the juvenile-adult transition in *Drosophila*. *Dev. Cell* **19**, 895 - 902 (2010).
123. Mahmood, K., Jadoon, S., Mahmood, Q., Irshad, M. & Hussain, J. Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 564136 (2014).
124. Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. & Fehon, R. Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **35** (2001).
125. Lamb, R. S., Ward, R. E., Schweizer, L. & Fehon, R. G. *Drosophila coracle*, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate junctions and developmental functions in embryonic and epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3505 - 3519 (1998).
126. Ward, R. E., Schweizer, L., Lamb, R. S. & Fehon, R. G. The protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin (FERM) domain of *Drosophila* Coracle, a cytoplasmic component of the septate junction, provides functions essential for embryonic development and imaginal cell proliferation. *Genetics* **159**, 219 - 228 (2001).
127. Heijink, I. H., Brandenburg, S. M., Postma, D. S. & van Oosterhout, A. J. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur. Respir. J.* **39**, 419 - 428 (2012).
128. Hoshino, Y., Mio, T., Nagai, S., Miki, H., Ito, I. & Izumi, T. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **281**, L509 - L516 (2001).
129. Carré, C., Szymczak, D., Pidoux, J. & Antoniewski, C. The histone H3 acetylase dGcn5 is a key player in *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8228 - 8238 (2005).
130. Mukherjee, K., Fischer, R. & Vilcinskas, A. Histone acetylation mediates epigenetic regulation of transcriptional reprogramming in insects during metamorphosis, wounding and infection. *Front. Zool.* **9**, 25 (2012).
131. Weissmann, F., Muyrers-Chen, I., Musch, T., Stach, D., Wiessler, M., Paro, R. & Lyko, F. DNA hypermethylation in *Drosophila melanogaster* causes irregular chromosome condensation and dysregulation of epigenetic histone modifications. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2577 - 2586 (2003).
132. Zhang, G., Huang, H., Liu, D., Cheng, Y., Liu, X., Zhang, W., Yin, R., Zhang, D., Zhang, P., Liu, J., Li, C., Liu, B., Luo, Y., Zhu, Y., Zhang, N., He, S., He, C., Wang, H. & Chen, D. N<sup>6</sup>-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell* **161**, 893 - 906 (2015).
133. Chen, B., Zhang, Y., Zhang, X., Jia, S., Chen, S. & Kang, L. Genome-wide identification and developmental expression profiling of long noncoding RNAs during *Drosophila* metamorphosis. *Sci. Rep.* **6**, 23330 (2016).

134. Mason-Suares, H., Tie, F., Yan, C. M. & Harte, P. J. Polycomb silencing of the *Drosophila* 4E-BP gene regulates imaginal disc cell growth. *Dev. Biol.* **380**, 111 - 124 (2013).
135. Stern, S., Fridmann-Sirkis, Y., Braun, E. & Soen, Y. Epigenetically heritable alteration of fly development in response to toxic challenge. *Cell. Rep.* **1**, 528 - 542 (2012).
136. Badenhorst, P., Xiao, H., Cherbas, L., Kwon, S. Y., Voas, M., Rebay, I., Cherbas, P. & Wu, C. The *Drosophila* nucleosome remodeling factor NURF is required for ecdysteroid signaling and metamorphosis. *Genes Dev.* **19**, 2540 - 2545 (2005).
137. Huang, L., Wang, Y., Zhang, L., Zheng, Z., Zhu, T., Qu, Y. & Mu, D. Maternal smoking and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in offspring: a meta-analysis. *Pediatrics* **141**, e20172465 (2018).
138. Laniado-Laborín, R. Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) - Parallel epidemics of the 21<sup>st</sup> century. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **6**, 209 - 224 (2009).
139. Jarecki, J., Johnson, E. & Krasnow, M. A. Oxygen regulation of airway branching in *Drosophila* is mediated by branchless FGF. *Cell* **99**, 221 - 220 (1999).
140. Uchiyama, T., Koike, R., Yuma, Y., Okamoto, K., Arimoto-Kobayashi, S., Suzuki, T. & Negishi, T. Somatic-cell mutation induced by short exposures to cigarette smoke in urate-null, oxidative stress-sensitive *Drosophila*. *Mutagenesis* **31**, 9 - 15 (2016).
141. Kale, P. G. & Baum, J. W. Mutagenicity of cigarette smoke in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **105**, 149 - 156 (1982).
142. Hamatake, Y., Morita, A., Yuma, Y., Okamoto, K., Arimoto, S., Suzuki, T., Kasai, H., Kawai, K. & Negishi, T. Hypersensitivity of a urate-null strain of *Drosophila melanogaster* to the toxic effects of environmental cigarette smoke. *Genes Environ.* **31**, 43 - 46 (2009).
143. Sadiq, M. F. G. & Altaany, Z. N. Induction of complete and mosaic sex-linked recessive lethal mutations by cigarette smoke filtrate in *Drosophila melanogaster*. *Drug Chem. Toxicol.* **37**, 163 - 168 (2014).
144. Yu, S. J. *The toxicology and biochemistry of insecticides*. (2. Aufl., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2015).
145. Rideout, E. J., Narsaiya, M. S. & Grewal, S. S. The sex determination gene *transformer* regulates male-female differences in *Drosophila* body size. *PLoS Genet.* **11**, e1005683 (2015).
146. Parisi, M., Li, R. & Oliver, B. Lipid profiles of female and male *Drosophila*. *BMC Res. Notes* **4**, 198 (2011).
147. Testa, N. D., Ghosh, S. M. & Shingleton, A. W. Sex-specific weight loss mediates sexual size dimorphism in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **8**, e58936 (2013).
148. Posgai, R., Ahamed, M., Hussain, S. M., Rowe, J. J. & Nielsen, M. G. Inhalation method for delivery of nanoparticles to the *Drosophila* respiratory system for toxicity testing. *Sci. Total Environ.* **408**, 439 - 443 (2009).
149. Moorthy, B., Chu, C. & Carlin, D. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons - from metabolism to lung cancer. *Toxicol. Sci.* **145**, 5 - 15 (2015).

150. Waters, L. C., Zelhof, A. C., Shaw, B. J. & Ch'ang, L.-Y. Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Aca. Sci. U. S. A.* **89**, 4855 - 4859 (1992).
151. Fuchs, S. Y., Spiegelman, V. S., Safaev, R. D. & Belitsky, G. A. Xenobiotic-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene metabolism in the benzo[a]pyrene-sensitive mutant strain of *Drosophila simulans*. *Mutat. Res.* **269**, 185 - 191 (1992).
152. Le Goff, G., Hilliou, F., Siegfried, B. D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L., Audant, P., ffrench-Constant, R. H. & Feyereisen, R. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 674 - 682 (2006).
153. Wang, S. P., Hu, X. X., Meng, Q. W., Muhammad, S. A., Chen, R. R., Li, F. & Li, G. Q. The involvement of several enzymes in methanol detoxification in *Drosophila melanogaster* adults. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **166**, 7 - 14 (2013).
154. Duncan, D. M., Burgess, E. A. & Duncan, I. Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by *spineless-aristapedia*, a homolog of mammalian dioxin receptor. *Genes Dev.* **12**, 1290 - 1303 (1998).
155. Sonnenfeld, M., Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S. & Crews, S. The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development* **124**, 4571 - 4582 (1997).
156. Petersen Brown, R., McDonnell, C. M., Berenbaum, M. R. & Schuler, M. A. Regulation of an insect Cyp P450 gene (*CYP6B1*) by aryl hydrocarbon and xanthotoxin response cascades. *Gene* **358**, 39 - 52 (2005).
157. Hooven, L. A., Sherman, K. A., Butcher, S. & Giebultowicz, J. M. Does the clock make the poison? Circadian variation in response to pesticides. *PLoS One* **4**, e6469 (2009).
158. Hamby, K. A., Kwok, R. S., Zalom, F. G. & Chiu, J. C. Integrating circadian activity and gene expression profiles to predict chronotoxicity of *Drosophila suzukii* response to insecticides. *PLoS One* **8**, e68472 (2013).
159. Ceriani, M. F., Hogenesch, J. B., Yanovsky, M., Panda, S., Straume, M. & Kay, S. A. Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *J. Neurosci.* **22**, 9305 - 9319 (2002).
160. Beaver, L. M., Hooven, L. A., Butcher, S. M., Krishnan, N., Sherman, K. A., Chow, E. S. & Giebultowicz, J. M. Circadian clock regulates response to pesticides in *Drosophila* via conserved *Pdp1* pathway. *Toxicol. Sci.* **115**, 513 - 520 (2010).
161. Krång, A.-S. Naphthalene disrupts pheromone induced mate search in the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *Aquat. Toxicol.* **85** (2007).
162. Shiraiwa, T., N., K. & Kashiwayanagi, M. Decreases in urinary pheromonal activities in male mice after exposure to 3-methylcholanthrene. *Toxicol. Lett.* **169**, 137 - 144 (2007).
163. Stocker, R. F. *Drosophila* as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microsc. Res. Tech.* **55**, 284 - 296 (2001).

164. Chiang, Y. N., Tan, K. J., Chung, H., Lavrynenko, O., Shevchenko, A. & Yew, J. Y. Steroid hormone signaling is essential for pheromone production and oenocyte survival. *PLoS Genet.* **12**, e1006126 (2016).
165. Mollerup, S., Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D. H. & Haugen, A. Sex differences in lung *CYP1A1* expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res.* **59**, 3317 - 3320 (1999).
166. Mollerup, S., Berge, G., Baera, R., Skaug, V., Hewer, A., Phillips, D. H., Stangeland, L. & Haugen, A. Sex differences in risk of lung cancer: Expression of genes in the PAH bioactivation pathway in relation to smoking and bulky DNA adducts. *Int. J. Cancer* **119**, 741 - 744 (2006).
167. Kasai, S. & Tomita, T. Male specific expression of a cytochrome P450 (*Cyp312a1*) in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 894 - 900 (2003).
168. Bownes, M., Dübendorfer, A. & Smith, T. Ecdysteroids in adult males and females of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Physiol.* **30**, 823 - 830 (1984).
169. Gu, S.-H., Tsai, R.-S., Chow, Y.-S. & Lin, F.-J. Sexual dimorphism in developmental rate and ecdysteroid titre in *Orgyia postica*. *J. Insect. Physiol.* **38**, 1043 - 1049 (1992).
170. Vafopoulou, X. & Steel, C. G. H. Sex differences in the profiles of prothoracic gland synthetic activity and of hemolymph ecdysteroid titers during development in the last larval instar of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**, 390 - 397 (1989).
171. Planelló, R., Herrero, Ó., Gómez-Sande, P., Ozáez, I., Cobo, F. & Servia, M. J. Ecdysone-related biomarkers of toxicity in the model organism *Chironomus riparius*: Stage and sex-dependent variations in gene expression profiles. *PLoS One* **10**, e0140239 (2015).
172. Velazquez, J. M., Sonoda, S., Bugaisky, G. & Lindquist, S. Is the major *Drosophila* heat shock protein present in cells that have not been heat shocked? *J. Cell. Biol.* **96**, 286 - 290 (1983).
173. O'Brien, T. & Lis, J. T. Rapid changes in *Drosophila* transcription after an instantaneous heat shock. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3456 - 3463 (1993).
174. Li, C.-J., Ning, W., Matthay, M. A., Feghali-Bostwick, C. A. & Choi, A. M. K. MAPK pathway mediates EGR-1-HSP70-dependent cigarette smoke-induced chemokine production. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L1297 - L1303 (2007).
175. Nacerai, H., Gregory, T., Sihem, B., Salah, A. & Souhila, A. B. Green tea beverage and epigallocatechin gallate attenuate nicotine cardiac cytotoxicity in rat. *Acta Pol. Pharma.* **74**, 277 - 287 (2017).
176. Kim, H. P., Wang, X., Zhang, J., Suh, G. Y., Benjamin, I. J., Ryter, S. W. & Choi, A. M. Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide: involvement of p38 $\beta$  MAPK and heat shock factor-1. *J. Immunol.* **175**, 2622 - 2629 (2005).
177. Yang, J., Liu, X., Nius, P., Zou, Y. & Duan, Y. Correlations and co-localizations of Hsp70 with XPA, XPG in human bronchial epithelia cells exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicology* **265**, 10 - 14 (2009).

178. Callier, V., Hand, S. C., Campbell, J. B., Biddulph, T. & Harrison, J. F. Developmental changes in hypoxic exposure and responses to anoxia in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **218**, 2927 - 2934 (2015).
179. League, G. P., Estévez-Lao, T. Y., Yan, Y., Garcia-Lopez, V. A. & Hillyer, J. F. *Anopheles gambiae* larvae mount stronger immune responses against bacterial infection than adults: evidence of adaptive decoupling in mosquitoes. *Parasit. Vectors* **10**, 367 (2017).
180. Sapkota, A. R., Berger, S. & Vogel, T. M. Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes. *Environ. Health Perspect.* **118**, 351 - 356 (2010).
181. Hasday, J. D., Bascom, R., Costa, J. J., Fitzgerald, T. & Dubin, W. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* **115**, 829 - 835 (1999).
182. Ormerod, K. G., LePine, O. K., Abbineni, P. S., Bridgeman, J. M., Coorsen, J. R., Mercier, A. J. & Tattersall, G. J. *Drosophila* development, physiology, behavior, and lifespan are influenced by altered dietary composition. *Fly* **11**, 153 - 170 (2017).
183. Lighton, J. R. B. Discontinuous gas exchange in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **41**, 309 - 324 (1996).
184. Heymann, N. & Lehmann, F.-O. The significance of spiracle conductance and spatial arrangement for flight muscle function and aerodynamic performance in flying *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* **209**, 1662 - 1677 (2006).
185. Lehmann, F.-O. & Heymann, N. Unconventional mechanisms control cyclic respiratory gas release in flying *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* **208**, 3645 - 3654 (2005).
186. Dahlgard, J., Loeschcke, V., Michalak, P. & Justesen, J. Induced thermotolerance and associated expression of the heat-shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* **12**, 786 - 793 (1998).
187. Zhang, W. W., Xiao, X., Gan, J. K., Zhang, X. Q., Kong, L. N. & Luo, Q. B. Characterization of HSP70 and its expression in tissue: correlation with physiological and immune indices in goose (*Anser cygnoides*) serum. *Genet. Mol. Res.* **14**, 12288 - 12298 (2015).
188. Niveditha, S., Deepashree, S., Ramesh, S. R. & Shivanandappa, T. Sex differences in oxidative stress resistance in relation to longevity in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. B* **187**, 899 - 909 (2017).
189. Aschkenasy, G., Bromberg, Z., Raj, N., Deutschman, C. S. & Weiss, Y. G. Enhanced Hsp70 expression protects against acute lung injury by modulating apoptotic pathways. *PLoS One* **6**, e26956 (2011).
190. Aoshiba, K. & Nagai, A. Oxidative stress, cell death, and other damage to alveolar epithelial cells induced by cigarette smoke. *Tob. Induc. Dis.* **1**, 219 - 226 (2003).
191. Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M. & Srivastava, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases hsp, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *Int. Immunol.* **12**, 1539 - 1546 (2000).
192. Imaoka, H., Seutomo, M. & Hoshino, H. Dutch and British hypothesis in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J. Gen. Fam. Med.* **17**, 272 - 275 (2016).

193. Velazquez-Ulloa, N. A. A *Drosophila* model for developmental nicotine exposure. *PLoS One* **12**, e0177710 (2017).
194. Yang, J., McCart, C., Woods, D. J., Terhzaz, S., Greenwood, K. G., French-Constant, R. H. & Dow, J. A. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiol. Genomics* **30**, 223 - 231 (2007).
195. Krebs, R. A. & Feder, M. E. Tissue-specific variation in Hsp70 expression and thermal damage in *Drosophila melanogaster* larvae. *J. Exp. Biol.* **200**, 2007 - 2015 (1997).
196. Clark, A. C., del Campo, M. L. & Ewer, J. Neuroendocrine control of larval ecdysis behavior in *Drosophila*: complex regulation by partially redundant neuropeptides. *J. Neurosci.* **24**, 4283 - 4292 (2004).
197. Pitsouli, C. & Perrimon, N. Embryonic multipotent progenitors remodel the *Drosophila* airways during metamorphosis. *Development* **137**, 3615 - 3624 (2010).
198. Weaver, M. & Krasnow, M. A. Dual origin of tissue-specific progenitor cells in *Drosophila* tracheal remodeling. *Science* **321**, 1496 - 1499 (2008).
199. Park, Y., Filippov, V., Gill, S. S. & Adams, M. E. Deletion of the ecdysis-triggering hormone gene leads to lethal ecdysis deficiency. *Development* **129**, 493 - 503 (2002).
200. Guha, A. & Kornberg, T. B. Tracheal branch repopulation precedes induction of the *Drosophila* dorsal air sac primordium. *Dev. Biol.* **287**, 192 - 200 (2005).
201. Djabrayan, N. J., Cruz, J., de Miguel, C., Franch-Marro, X. & Casanova, J. Specification of differentiated adult progenitors via inhibition of endocycle entry in the *Drosophila* trachea. *Cell Rep.* **9**, 859 - 865 (2014).
202. Schwedes, C. C. & Carney, G. E. Ecdysone signaling in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **58**, 293 - 302 (2012).
203. Kerdivel, G., Habauzit, D. & Pakdel, F. Assessment and molecular actions of endocrine-disrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways. *Int. J. Endocrinol.* **2013**, 501851 (2013).
204. Mayer, B. How much nicotine kills a human? Tracing back the generally accepted lethal dose to dubious self-experiments in the nineteenth century. *Arch. Toxicol.* **88**, 5 - 7 (2014).
205. Moran, V. E. Cotinine: Beyond that expected, more than a biomarker of tobacco consumption. *Front. Pharmacol.*, 173 (2012).
206. Tweed, J. O., Hsia, S. H., Lutfy, K. & Friedman, T. C. The endocrine effects of nicotine and cigarette smoke. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 334 - 342 (2012).
207. Marcus, C. B., Turner, C. R. & Jefcoate, C. R. Binding of benzo[*a*]pyrene by purified cytochrome P-450<sub>c</sub>. *Biochemistry* **24**, 5115 - 5123 (1985).
208. Walsh, A. A., Szklarz, G. D. & Scott, E. E. Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J. Biol. Chem.* **288**, 12932 - 12943 (2013).



209. Takeuchi, H., Rigden, D. J., Ebrahimi, B., Turner, P. C. & Rees, H. H. Regulation of ecdysteroid signalling during *Drosophila* development: identification, characterization and modelling of ecdysone oxidase, an enzyme involved in control of ligand concentration. *Biochem. J.* **389**, 637 - 645 (2005).
210. Alanazi, H., Semlali, A., Perraud, L., Chmielewski, W., Zakrzewski, A. & Rouabhia, M. Cigarette smoke-exposed *Candida albicans* increased chitin production and modulated human fibroblast cell responses. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 963156 (2014).
211. Warren, J. T., Yerushalmi, Y., Shimell, M. J., O'Connor, M. B., Restifo, L. L. & Gilbert, L. I. Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of *Drosophila melanogaster*: correlations with changes in gene activity. *Dev. Dyn.* **235**, 315 - 326 (2006).
212. van Schayk, C. P. & Chavannes, N. H. Detection of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in primary care. *Eur. Respir. J.* **21**, 16s - 22s (2003).
213. Loponen, J., Ilmarinen, P., Tuomisto, L. E., Niemelä, O., Tommola, M., Nieminen, P., Lehtimäki, L. & Kankaanranta, H. Daily physical activity and lung function decline in adult-onset asthma: a 12-year follow-up study. *Eur. Clin. Respir. J.* **5**, 1533753 (2018).
214. Strasser, B., Siebert, U. & Schobersberger, W. Effects of resistance training on respiratory function in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Breath.* **17**, 217 - 226 (2013).
215. Gold, D. R., Wang, X., Wypij, D., Speizer, F. E., Ware, J. H. & Dockery, D. W. Effects of cigarette smoke on lung function in adolescent boys and girls. *N. Engl. J. Med.* **335**, 931 - 937 (1996).
216. Tantisuwat, A. & Thaveeratitham, P. Effects of smoking on chest expansion, lung function, and respiratory muscle strength of youth. *J. Phys. Ther. Sci.* **26** (2014).
217. Godoy-Herrera, R., Burnet, B., Connoly, K. & Gogarty, J. The development of locomotor activity in *Drosophila melanogaster* larvae. *Heredity* **52**, 63 - 75 (1984).
218. Sobkowiak, R., Kowalski, M. & Lesicki, A. Concentration- and time-dependent behavioral changes in *Caenorhabditis elegans* after exposure to nicotine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **99**, 365 - 370 (2011).
219. Green, E. W., O'Callaghan, E. K., Hansen, C. N., Bastianello, S., Bhutani, S., Vanin, S., Armstrong, J. D., Costa, R. & Kyriacou, C. P. *Drosophila* circadian rhythms in seminatural environments: Summer afternoon component is not an artifact and requires TrpA1 channels. *Proc. Natl. Aca. Sci. U. S. A.* **112**, 8702 - 8707 (2015).
220. Das, A., Holmes, T. C. & Sheeba, V. dTRPA1 modulates afternoon peak of activity of fruit flies *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **10**, e0134213 (2015).
221. Menegazzi, P., Yoshii, T. & Helfrich-Förster, C. Laboratory versus nature: the two sides of the *Drosophila* circadian clock. *J. Biol. Rhythms* **27**, 433 - 442 (2012).
222. Pomerleau, O. F. Individual differences in sensitivity to nicotine: implications for genetic research on nicotine dependence. *Behav. Genet.* **25** (1995).

223. Hambry, K. A., Kwok, R. S., Zalom, F. G. & Chiu, J. C. Integrating circadian activity and gene expression profiles to predict chronotoxicity of *Drosophila suzukii* response to insecticides. *PLoS One* **8**, e68472 (2013).
224. Heard, E. & Martienssen, R. A. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* **157**, 95 - 109 (2014).
225. Jackson, K. J., Muldoon, P. P., De Biasi, M. & Damaj, M. I. New mechanisms and perspectives in nicotine withdrawal. *Neuropharmacology* **96**, 223 - 234 (2015).
226. Canastar, A., Logel, J., Graw, S., Finlay-Schultz, J., Osborne, C., Palionyte, M., Drebing, C., Plehaty, M., Wilson, L., Eyeson, R. & Leonard, S. Promoter methylation and tissue-specific transcription of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor gene, *CHRNA7*. *J. Mol. Neurosci.* **47**, 389 - 400 (2012).
227. Satta, R., Maloku, E., Zhubi, A., Pibiri, F., Hajos, M., Costa, E. & Guidotti, A. Nicotine decreases DNA methyltransferase 1 expression and glutamic acid decarboxylase 67 promoter methylation in GABAergic interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16356 - 16361 (2008).
228. Reik, W., Dean, W. & Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089 - 1093 (2001).
229. Tang, W. W., Dietmann, S., Irie, N., Leitch, H. G., Floros, V. I., Bradshaw, C. R., Hackett, J. A., Chinnery, P. F. & Surani, M. A. A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. *Cell* **161**, 1453 - 1467 (2015).
230. Trump, S., Bieg, M., Gu, Z., Thürmann, L., Bauer, T., Bauer, M., Ishaque, N., Röder, S., Gu, L., Herberth, G., Lawrenz, C., Borte, M., Schlesner, M., Plass, C., Diessl, N., Eszlinger, M., Mücke, O., Elvers, H.-D., Wissenbach, D. K., von Bergen, M., Herrmann, C., Weichenhan, D., Wright, R. J., Lehmann, I. & Eils, R. Prenatal maternal stress and wheeze in children: novel insights into epigenetic regulation. *Sci. Rep.* **6**, 28616 (2016).
231. Patil, V. K., Holloway, J. W., Zhan, H., Soto-Ramirez, N., Ewart, S., Arshad, S. H. & Karmaus, W. Interaction of prenatal maternal smoking, interleukin 13 genetic variants and DNA methylation influencing airflow and airway reactivity. *Clin. Epigenet.* **5**, 22 (2013).
232. Lyko, F. DNA methylation learns to fly. *Trends Genet.* **17**, 169 - 162 (2001).
233. Mukherjee, K., Fischer, R. & Vilcinskas, A. Histone acetylation mediates epigenetic regulation of transcriptional reprogramming in insects during metamorphosis, wounding and infection. *Front. Zool.* **9**, 25 (2012).
234. Mortaz, E., Masjedi, M. R., Barnes, P. J. & Adcock, I. M. Epigenetics and chromatin remodeling play a role in lung disease. *Tanaffos* **10**, 7 - 16 (2011).
235. Tekpli, X., Zienolddiny, S., Skaug, V., Stangeland, L., Haugen, A. & Mollerup, S. DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *Int. J. Cancer* **131**, 1509 - 1516 (2012).
236. Anttila, S., Hakkola, J., Tuominen, P., Elovaara, E., Husgafvel-Pusiainen, K., Karjalainen, A., Hirvonen, A. & Nurminen, A. Methylation of cytochrome P4501A1 Promotor in the lung is associated with tobacco smoking. *Cancer Res.* **63** (2003).

237. Buro-Auriemma, L. J., Salit, J., Hackett, N. R., Walters, M. S., Strulovici-Barel, Y., Staudt, M. R., Fuller, J., Mahmoud, M., Stevenson, C. S., Hilton, H., Ho, M. W. Y. & Crystal, R. G. Cigarette smoking induces small airway epithelial epigenetic changes with corresponding modulation of gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4726 - 4738 (2013).
238. Gibbs, K., Collaco, J. M. & McGrath-Morrow, S. A. Impact of tobacco smoke and nicotine exposure on lung development. *Chest* **149**, 552 - 561 (2016).
239. Fu, X. W., Wood, K. & Spindel, E. R. Prenatal nicotine exposure increases GABA signaling and mucin expression in airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 222 - 229 (2011).
240. Bucchieri, F., Marino Gammazza, A., Pitruzzella, A., Fucarino, A., Farina, F., Howarth, P., Holgate, S. T., Zummo, G. & Davies, D. E. Cigarette smoke causes caspase-independent apoptosis of bronchial epithelial cells from asthmatic donors. *PLoS One* **10**, e0120510 (2015).
241. Astuti, Y., Wardhana, A., Watkins, J. & Wulaningsih, W. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ. Res.* **158**, 480 - 489 (2017).
242. Salam, M. T., Lin, P. C., Avol, E. L., Gauderman, W. J. & Gilliland, F. D. Microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase P1, traffic and childhood asthma. *Thorax* **62**, 1050 - 1057 (2007).
243. Haag, M., Leusink-Muis, T., Le Bouquin, R., Nijkamp, F. P., Lugnier, A., Frossard, N., Folkerts, G. & Pons, F. Increased expression and decreased activity of cytochrome P450 1A1 in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *Arch. Toxicol* **76**, 621 - 627 (2002).
244. Vignola, A. M., Chanez, P., Polla, B. S., Vic, P., Godard, P. & Bousquet, J. Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **13**, 683 - 691 (1995).
245. Changchun, H., Haijin, Z., Wenjung, L., Zehnyu, L., Dan, Z., Laiyu, L., Wancheng, T., Chao-xi, C. & Fei, C. Increased heat shock protein 70 levels in induced sputum and plasma correlate with severity of asthma patients. *Cell Stress Chaperones* **16**, 663 - 671 (2011).
246. Sly, P. D. & Holt, P. G. Role of innate immunity in the development of allergy and asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **11**, 127 - 131 (2011).
247. Baarsma, H. A., Skronska-Wasek, W., Mutze, K., Ciolek, F., Wagner, D. E., John-Schuster, G., Heinzelmann, K., Gunther, A., Bracke, K. R., Dagouassat, M., Boczkowski, J., Brusselle, G. G., Smits, R., Eickelberg, O., Yildirim, A. Ö. & Konigshoff, M. Noncanonical WNT-5A signaling impairs endogenous lung repair in COPD. *J. Exp. Med.* **214**, 143 - 163 (2017).
248. Saito, A., Horie, M. & Nagase, T. TGF- $\beta$  signaling in lung health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2460 (2018).
249. de Boer, W. I., Alagappan, V. K. T. & Sharma, H. S. Molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Cell Biochem. Biophys.* **47**, 131 - 147 (2007).
250. Lee, B.-J., Moon, H.-G., Shin, T.-S., Jeon, S. G., Lee, E.-Y., Gho, Y. S., Lee, C. G., Zhu, Z., Elias, J. A. & Kim, Y.-K. Protective effects of basic fibroblast growth factor in the development of emphysema induced by interferon- $\gamma$ . *Exp. Mol. Med.* **43**, 169 - 178 (2011).

251. Jeon, S. G., Lee, C. G., Oh, M.-H., Chun, E.-Y., Gho, Y. S., Cho, S.-H., Kim, J.-H., Min, K.-U., Kim, Y.-Y., Kim, Y.-K. & Elias, J. A. Recombinant basic fibroblast growth factor inhibits the airway hyperresponsiveness, mucus production, and lung inflammation induced by an allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 831 - 837 (2007).
252. Zong, D., Ouyang, R., Li, J., Chen, Y. & Chen, P. Notch signaling in lung diseases - focus on Notch1 and Notch3. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **10** (2016).
253. Schuliga, M. NF- $\kappa$ B signaling in chronic inflammatory airway disease. *Biomolecules* **5**, 1266 - 1283 (2015).
254. Barnes, P. J. Kinases as novel therapeutic targets in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.* **68**, 788 - 815 (2016).
255. Walford, H. H. & Doherty, T. A. STAT6 and lung inflammation. *JAKSTAT* **2**, e25301 (2013).
256. Park, Y. M. & Bochner, B. S. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **2**, 87 - 101 (2010).
257. Johnson, E. N. & Druey, K. M. Heterotrimeric G protein signaling: Role in asthma and allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 592 - 602 (2002).
258. Li, J.-X., Fu, W.-P., Zhang, J., Zhang, X.-H., Sun, C., Dai, L.-M., Zhong, L., Yu, L. & Zhang, Y.-P. A functional SNP upstream of the *ADRB2* gene is associated with COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **13**, 917 - 925 (2018).
259. Gohy, S. T., Hupin, C., Pilette, C. & Ladjemi, M. Z. Chronic inflammatory airway diseases: the central role of the epithelium revisited. *Clin. Exp. Allergy* **46**, 529 - 542 (2016).
260. Kyoh, S., Venkatesan, N., Poon, A. H., Nishioka, M., Lin, T.-Y., Baglole, C. J., Eidelman, D. H. & Hamit, Q. Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 480 - 482 (2013).
261. Svalae, L., Chaouat, A., Bastuji-Carin, S., Marcos, E., Boyer, L., Maitre, B., Sarni, M., Housset, B., Weitzenblum, E., Martrat, M., Le Corvoisier, P., Rideau, D., Boczkowski, J., Dubois-Randé, J. L., Chouaid, C. & Adnot, S. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 566 - 571 (2009).
262. Albrecht, E., Sillanpää, E., Karrasch, S., Alves, A. C., Codd, V., Hovatta, I., Buxton, J. L., Nelson, C. P., Broer, L., Hägg, S., Mangino, M., Willemsen, G., Surakka, I., Ferreira, M. A., Amin, N., Oostra, B. A., Bäckmand, H. M., Peltonen, M., Sarna, S., Rantanen, T., Sipilä, S., Korhonen, T., Madden, P. A., Gieger, C., Jörres, R. A., Heinrich, J., Behr, J., Huber, R. M., Peters, A., Strauch, K., Wichmann, H. E., Waldenberger, M., Blakemore, A. I., de Geus, E. J., Nyholt, D. R., Henders, A. K., Piirilä, P. L., Rissanen, A., Magnusson, P. K., Viñuela, A., Pietiläinen, K. H., Martin, N. G., Pedersen, N. L., Boomsma, D. I., Spector, T. D., van Duijn, C. M., Kaprio, J., Samani, N. J., Jarvelin, M. R. & Schulz, H. Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. *Eur. Respir. J.* **43**, 983 - 992 (2014).
263. Baarsma, H. A. & Königshoff, M. 'WNT-er is coming': WNT signalling in chronic lung disease. *Thorax* **72**, 746 - 759 (2017).
264. Ruden, D. M. & Lu, X. Hsp90 affecting chromatin remodeling might explain transgenerational epigenetic inheritance in *Drosophila*. *Curr. Genom.* **9**, 500 - 508 (2008).

265. Barnes, P. J. Similarities and differences in inflammatory mechanisms of asthma and COPD. *Breathe* **7**, 229 - 238 (2011).
266. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, 17023 (2017).
267. Vogel, C. F., Khan, E. M., Leung, P. S., Gershwin, M. E., Chang, W. L., Wu, D., Haarmann-Stemann, T., Hoffmann, A. & Denison, M. S. Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* **289**, 1866 - 1875 (2014).
268. Sykiotis, G. P. & Bohmann, D. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell* **14**, 76 - 85 (2008).
269. Udomsinprasert, R., Bogoyevitch, M. A. & Ketterman, A. J. Reciprocal regulation of glutathione S-transferase spliceforms and the *Drosophila* c-Jun N-terminal kinase pathway components. *Biochem. J.* **383**, 483 - 490 (2004).
270. Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R. L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D. & Maniatis, T. Immune activation of NF- $\kappa$ B and JNK requires *Drosophila* TAK1. *J. Biol. Chem.* **278**, 48928 - 48934 (2003).
271. Lam, B. K. & Austen, K. F. Leukotriene C<sub>4</sub> synthase: a pivotal enzyme in the biosynthesis of cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68 - 69**, 511 - 520 (2002).
272. Nebert, D. W. & Russell, D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**, 1155 - 1162 (2002).
273. Konkel, A. & Schunkck, W. H. Role of cytochrome P450 enzyme in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 210 - 222 (2011).
274. Montuschi, P. Role of leukotrienes and leukotriene modifiers in asthma. *Pharmaceuticals (Basel)* **3**, 1792 - 1811 (2010).
275. Elshenawy, O. H., Shoieb, S. M., Mohamed, A. & El-Kadi, A. O. S. Clinical implications of 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid in the kidney, liver, lung and brain: an emerging therapeutic target. *Pharmaceutics* **9**, E9 (2017).
276. Shen, L. R., Lai, C. Q., Feng, X., Parnell, L. D., Wan, J. B., Wang, J. D., Li, D., Ordovas, J. M. & Kang, J. X. *Drosophila* lacks C20 and C22 PUFAs. *J. Lipid Res.* **51**, 2985 - 2992 (2010).
277. Scarpati, M., Qi, Y., Govind, S. & Singh, S. A combined computational strategy of sequence and structural analysis predicts the existence of a functional eicosanoid pathway in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **14**, e0211897 (2019).
278. Kallsen, K. Untersuchung der Relevanz unterschiedlicher Asthma-Suszeptibilitätsgene im Modellorganismus *Drosophila melanogaster*. (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2013).
279. Masini, E., Giannini, L., Nistri, S., Cinci, L., Mastroianni, R., Xu, W., Comhair, S. A. A., Li, D., Cuzzocrea, S., Matuschak, G. M. & Salvemini, D. Ceramide: a key signaling molecule in a Guinea pig model of allergic asthmatic response and airway inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**, 548 - 557 (2008).

280. Kallsen, K., Zehethofer, N., Abdelsadik, A., Lindner, B., Kabesch, M., Heine, H. & Roeder, T. ORMDL deregulation increases stress responses and modulates repair pathways in *Drosophila* airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1105 - 1108 (2015).
281. Chatterjee, S. & Burns, T. F. Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1978 (2017).
282. Bertorelli, G., Bocchino, V., Zhuo, X., Chetta, A., del Donno, M., Foresi, A., Testi, R. & Olivieri, D. Heat shock protein 70 upregulation is related to HLA-DR expression in bronchial asthma. Effects of inhaled glucocorticoids. *Clin. Exp. Allergy* **28**, 551 - 560 (1998).
283. Asea, A. Chaperokine-induced signal transduction pathways. *Exerc. Immunol. Rev.* **9**, 25 - 33 (2003).
284. Asea, A., Kraeft, S.-K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C. & Calderwood, S. K. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* **6**, 435 - 442 (2000).
285. Shuai, K. & Liu, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 900 - 911 (2003).
286. Bousoik, E. & Montazeri Aliabadi, H. "Do We Know Jack" About JAK? A closer look at JAK/STAT signaling pathway. *Front. Oncol.* **8**, 287 (2018).
287. Wu, H., Wang, M. C. & Bohmann, D. JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mech. Dev.* **126**, 624 - 637 (2009).
288. Arbouzova, N. I. & Zeidler, M. P. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* **133**, 2605 - 2616 (2006).
289. Kim, L. K., Choi, U. Y., Cho, H. S., Lee, J. S., Lee, W.-b., Jeong, K., Shim, J., Kim-Ha, J. & Kim, Y.-J. Down-regulation of NF- $\kappa$ B target genes by the AP-1 and STAT complex during the innate immune response in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **5**, e238 (2007).
290. Bunker, B. D., Mellimoottil, T. T., Boileau, R. M., Classen, A. K. & Bilder, D. The transcriptional response to tumorigenic polarity loss in *Drosophila*. *eLife* **4**, e03189 (2015).
291. Santabárbara-Ruiz, P., López-Santillán, M., Martínez-Rodríguez, I., Binagui-Casas, A., Pérez, L., Milán, M., Corominas, M. & Serras, F. ROS-induced JNK and p38 signaling is required for unpaired cytokine activation during *Drosophila* regeneration. *PLoS Genet.* **11**, e1005595 (2015).
292. Ohsawa, S., Sato, Y., Enomoto, M., Nakamura, M., Betsumiya, A. & Igaki, T. Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila*. *Nature* **490**, 547 - 551 (2012).
293. Pastor-Pareja, J. C., Wu, M. & Xu, T. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis. Model Mech.* **1**, 144 - 154 (2008).
294. Wang, L. & Ligoxygakis, P. Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* immune response. *Immunobiology* **211**, 251 - 261 (2006).

295. Yang, X., Li, H., Ma, Q., Zhang, Q. & Wang, C. Neutrophilic asthma is associated with increased airway bacterial burden and disordered community composition. *Biomed. Res. Int.* **2018**, 9230234 (2018).
296. Wang, H., Anthony, D., Selemidis, S., Vlahos, R. & Bozinovski, S. Resolving viral-induced secondary bacterial infection in COPD: a concise review. *Front. Immunol.* **9**, 2345 (2018).
297. Christodoulopoulos, P., Cameron, L., Nakamura, Y., Lemièrre, C., Muro, S., Dugas, M., Boulet, L. P., Laviolette, M., Olivenstein, R. & Hamid, Q. T<sub>H</sub>2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 586 - 591 (2001).
298. Bhandari, A. Impact of cigarette smoke exposure on the airway epithelium of *Drosophila melanogaster* to model COPD-like phenotypes. (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2015).
299. Koopmans, T. & Gosens, R. Revisiting asthma therapeutics: focus on WNT signal transduction. *Drug Discov. Today* **23**, 49 - 62 (2018).
300. Skronska-Wasek, W., Mutze, K., Baarsma, H. A., Bracke, K. R., Alsafadi, H. N., Lehmann, M., Costa, R., Stornaiuolo, M., Novellino, E., Brusselle, G. G., Wagner, D. E., Yildirim, A. Ö. & Königshoff, M. Reduced frizzled receptor 4 expression prevents WNT/ $\beta$ -catenin-driven alveolar lung repair in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 172 - 185 (2017).
301. Pongracz, J. E. & Stockley, R. A. Wnt signalling in lung development and diseases. *Respir. Res.* **7**, 15 (2006).
302. Llimargas, M. Wingless and its signalling pathway have common and separable functions during tracheal development. *Development* **127**, 4407 - 4417 (2000).
303. Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. & Mlodzik, M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar cell polarity and *wingless* signaling. *Cell* **94**, 109 - 118 (1998).
304. Hanlon, C. D. & Andrew, D. J. Outside-in signaling - a brief review of GPCR signaling with a focus on the *Drosophila* GPCR family. *J. Cell Sci.* **128**, 3533 - 3542 (2015).
305. Reboul, J. & Ewbank, J. J. GPCRs in invertebrate innate immunity. *Biochem. Pharmacol.* **114**, 82 - 87 (2016).
306. Rajagopal, S. & Shenoy, S. K. GPCR desensitization: acute and prolonged phases. *Cell Signal.* **41**, 9 - 16 (2018).
307. Zhang, D., Zhao, Q. & Wu, B. Structural studies of G protein-coupled receptors. *Mol. Cells* **38**, 836 - 842 (2015).
308. Laustiola, K. E. & Lassila, R. Decreased  $\beta$ -adrenergic receptor density and catecholamine response in male cigarette smokers. A study of monozygotic twin pairs discordant for smoking. *Circulation* **78**, 1234 - 1240 (1988).

309. de Paiva, A. C. Z., de Lima Marson, F. A., Ribeiro, J. D. & Bertuzzo, C. S. Asthma - Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of beta2-adrenergic receptor gene as risk factors. *Asthma Allergy Clin. Immunol.* **10**, 8 (2014).
310. Li, Y. Adrenergic signaling in the fruit fly *Drosophila melanogaster*: establishment and analysis of models for diabetes and obesity. (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2015).
311. Barner, P. J. Effects of  $\beta$ -agonists on inflammatory cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, S10 - S17 (1999).
312. Papenmeier, S. Untersuchungen zur Modulation der zellulären Immunantwort durch biogene Amine in der Taufliege *Drosophila melanogaster*. (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2016).
313. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495 - 516 (2007).
314. Zheng, J., Edelman, S. W., Tharmarajah, G., Walker, D. W., Pletcher, S. D. & Seroude, L. Differential patterns of apoptosis in response to aging in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12083 - 12088 (2005).
315. White, S. R. Apoptosis and the airway epithelium. *J. Allergy (Cairo)* **2011**, 948406 (2011).
316. Takayama, S., Reed, J. C. & Homma, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* **22**, 9041 - 9047 (2003).
317. Yin, V. & Thummel, C. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 237 (2005).
318. Waldhuber, M., Emoto, K. & Petritsch, C. The *Drosophila* caspase DRONC is required for metamorphosis and cell death in response to irradiation and developmental signals. *Mech. of Dev.* **122**, 914 - 927 (2005).
319. Capkova Frydrychova, R., Biessmann, H. & Mason, J. M. Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenet. Genome. Res.* **122**, 356 - 364 (2008).
320. Mason, J. M., Frydrychova, R. C. & Biessmann, H. *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. *BioEssays* **30**, 25 - 37 (2008).
321. Casacuberta, E. *Drosophila*: retrotransposons making up telomeres. *Viruses* **9**, 192 (2017).
322. Ciapponi, L., Cenci, G., Ducau, J., Flores, C., Johnson-Schlitz, D., Gorski, M. M., Engels, W. R. & Gatti, M. The *Drosophila* Mre11/Rad50 complex is required to prevent both telomeric fusion and chromosome breakage. *Curr. Biol.* **14**, 1360 - 1366 (2004).
323. Aoshiba, K. & Nagai, A. Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **6**, 596 - 601 (2009).
324. Li, X., Howard, T. D., Zheng, S. L., Haselkorn, T., Peters, S. P., Meyers, D. A. & Bleeker, E. R. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 328 - 335.e311 (2010).
325. Rehan, V. K., Liu, J., Sakurai, R. & Torday, J. S. Perinatal nicotine-induced transgenerational asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **305**, L501 - L507 (2013).



326. Tsuji, N., Fukuda, K., Nagata, Y., Okada, H., Haga, A., Hatakeyama, S., Yoshida, S., Okamoto, T., Hosaka, M., Sekine, K., Ohtaka, K., Yamamoto, S., Otaka, M., Grave, E. & Itoh, H. The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90. *FEBS Open Bio.* **4**, 796 - 803 (2014).
327. Perišić, T., Srecković, M. & Matić, G. Changes of antioxidant enzyme activity and heat shock protein content in lymphocytes of children with asthma. *Arch. Biol. Sci.* **59**, 257 - 266 (2007).
328. Cavalli, G. & Paro, R. The *Drosophila Fab-7* chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* **93**, 505 - 518 (1998).
329. Phalke, S., Nickel, O., Walluscheck, D., Hortig, F., Onorati, M. C. & Reuter, G. Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat. Genet.* **41**, 696 - 702 (2009).

## Anhang

Tab. I: Hochregulierte Gene in Tracheen männlicher Larven nach Tabakrauchexposition im Vergleich zur Luftexposition.

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
1	<i>Hsp70Bb</i>	FBgn0013278	7,13	7,99E-28	39	<i>Pino</i>	FBgn0016926	2,13	2,51E-35
2	<i>CG11825</i>	FBgn0033519	6,96	1,41E-67	40		FBgn0085753	2,12	1,70E-03
3	<i>Hsp70Bc</i>	FBgn0013279	6,60	1,63E-39	41	<i>CG8908</i>	FBgn0034493	2,12	9,34E-10
4	<i>Hsp70Ba</i>	FBgn0013277	6,38	2,42E-22	42	<i>puc</i>	FBgn0243512	2,10	2,70E-87
5	<i>Hsp70Ab</i>	FBgn0013276	6,15	1,06E-22	43		FBgn0265419	2,08	2,70E-04
6	<i>Hsp70Bbb</i>	FBgn0051354	6,00	4,77E-17	44		FBgn0267281	2,05	3,24E-03
7	<i>CG12896</i>	FBgn0033521	5,65	2,27E-33	45	<i>CG7365</i>	FBgn0036939	2,02	1,90E-05
8	<i>Prx2540-1</i>	FBgn0033520	4,59	8,08E-18	46	<i>Gclm</i>	FBgn0046114	2,02	3,63E-18
9	<i>Prx2540-2</i>	FBgn0033518	4,38	5,48E-16	47	<i>Cyp6g2</i>	FBgn0033696	2,00	1,52E-03
10	<i>CG13116</i>	FBgn0032139	4,13	3,00E-67	48	<i>CG12851</i>	FBgn0035086	1,98	1,07E-06
11	<i>dyl</i>	FBgn0066365	3,67	6,74E-12	49	<i>Cyp18a1</i>	FBgn0010383	1,96	2,36E-04
12	<i>stv</i>	FBgn0086708	3,66	9,07E-108	50	<i>CG11529</i>	FBgn0036264	1,94	5,43E-05
13	<i>Hsp26</i>	FBgn0001225	3,63	8,84E-12	51	<i>CG15564</i>	FBgn0039833	1,92	6,43E-03
14	<i>Hsp70Aa</i>	FBgn0013275	3,32	2,06E-06	52	<i>CG18808</i>	FBgn0042131	1,91	8,63E-03
15	<i>Hsp68</i>	FBgn0001230	3,32	5,77E-09	53	<i>MFS3</i>	FBgn0031307	1,88	5,75E-14
16	<i>DnaJ-1</i>	FBgn0263106	3,29	1,71E-58	54	<i>e</i>	FBgn0000527	1,84	5,08E-03
17		FBgn0041607	3,14	3,34E-15	55	<i>rpr</i>	FBgn0011706	1,84	6,41E-11
18	<i>CG14327</i>	FBgn0038526	3,06	3,66E-06	56	<i>Cyp6t3</i>	FBgn0033697	1,83	4,15E-03
19	<i>pirk</i>	FBgn0034647	2,85	3,70E-06	57	<i>CG7130</i>	FBgn0037151	1,77	7,70E-11
20		FBgn0001234	2,79	1,05E-42	58	<i>CG2765</i>	FBgn0035087	1,77	8,51E-52
21	<i>Ets21C</i>	FBgn0005660	2,79	6,43E-14	59		FBgn0267624	1,77	5,84E-09
22	<i>upd2</i>	FBgn0030904	2,67	1,71E-13	60	<i>Socs36E</i>	FBgn0041184	1,75	6,51E-21
23	<i>CG6026</i>	FBgn0038676	2,58	2,09E-06	61		FBgn0261548	1,75	5,21E-52
24	<i>Hsp23</i>	FBgn0001224	2,55	5,14E-14	62	<i>Adk1</i>	FBgn0022709	1,73	2,17E-19
25	<i>Cc2d2a</i>	FBgn0263113	2,49	5,48E-07	63	<i>iav</i>	FBgn0086693	1,73	1,52E-03
26	<i>Pdk</i>	FBgn0017558	2,45	1,31E-35	64	<i>pyr</i>	FBgn0033649	1,70	6,23E-19
27	<i>CG15673</i>	FBgn0034639	2,42	3,26E-12	65	<i>CG10365</i>	FBgn0039109	1,70	8,54E-11
28	<i>insc</i>	FBgn0011674	2,32	5,30E-26	66	<i>Fs</i>	FBgn0259878	1,70	1,12E-05
29	<i>Gaf</i>	FBgn0010223	2,31	1,50E-18	67	<i>CG32301</i>	FBgn0052301	1,68	3,54E-02
30	<i>Amt</i>	FBgn0038309	2,31	6,42E-04	68	<i>CG2017</i>	FBgn0037391	1,66	2,98E-18
31	<i>CG5953</i>	FBgn0032587	2,31	5,87E-18	69	<i>Dgp-1</i>	FBgn0027836	1,63	4,89E-16
32	<i>Hsp67Bc</i>	FBgn0001229	2,30	3,11E-07	70	<i>CG45067</i>	FBgn0266437	1,63	1,37E-02
33	<i>Tdc1</i>	FBgn0259977	2,29	8,78E-17	71	<i>Impl2</i>	FBgn0001257	1,62	6,70E-10
34	<i>Thor</i>	FBgn0261560	2,27	1,65E-11	72	<i>Dad</i>	FBgn0020493	1,60	1,01E-18
35		FBgn0052865	2,24	4,40E-04	73	<i>CG5346</i>	FBgn0038981	1,60	4,87E-40
36		FBgn0051514	2,21	9,60E-06	74	<i>upd3</i>	FBgn0053542	1,58	6,94E-05
37	<i>DPCoAC</i>	FBgn0067783	2,20	8,27E-36	75	<i>CG43333</i>	FBgn0263038	1,57	1,21E-03
38	<i>CecC</i>	FBgn0000279	2,13	1,63E-03	76	<i>olf186-M</i>	FBgn0015522	1,57	1,10E-11

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
<b>77</b>	<i>CecB</i>	FBgn0000278	1,57	3,01E-02	<b>122</b>	<i>raw</i>	FBgn0003209	1,26	1,16E-06
<b>78</b>	<i>scaf</i>	FBgn0033033	1,55	2,11E-14	<b>123</b>	<i>Gadd45</i>	FBgn0033153	1,26	2,80E-06
<b>79</b>	<i>CG34248</i>	FBgn0085277	1,55	2,11E-04	<b>124</b>	<i>l(1)G0469</i>	FBgn0040153	1,25	6,61E-05
<b>80</b>	<i>CG13024</i>	FBgn0036665	1,54	1,28E-06	<b>125</b>	<i>path</i>	FBgn0036007	1,25	6,28E-05
<b>81</b>	<i>Nos</i>	FBgn0011676	1,53	2,51E-03	<b>126</b>	<i>CG7509</i>	FBgn0035575	1,25	4,00E-02
<b>82</b>	<i>CG10383</i>	FBgn0032699	1,52	1,51E-10	<b>127</b>	<i>MtnA</i>	FBgn0002868	1,25	1,12E-02
<b>83</b>	<i>CG30280</i>	FBgn0050280	1,51	6,09E-05	<b>128</b>		FBgn0267635	1,24	1,93E-03
<b>84</b>	<i>dmrt93B</i>	FBgn0038851	1,51	3,28E-02	<b>129</b>	<i>Kr-h1</i>	FBgn0266450	1,24	2,84E-09
<b>85</b>	<i>tx</i>	FBgn0263118	1,51	1,01E-08	<b>130</b>	<i>MtnD</i>	FBgn0053192	1,24	3,77E-02
<b>86</b>	<i>h</i>	FBgn0001168	1,49	1,06E-25	<b>131</b>	<i>mlt</i>	FBgn0265512	1,24	2,29E-04
<b>87</b>		FBgn0266250	1,48	5,29E-03	<b>132</b>	<i>slif</i>	FBgn0037203	1,23	5,07E-10
<b>88</b>	<i>CG1698</i>	FBgn0033443	1,47	1,46E-13	<b>133</b>	<i>CG32855</i>	FBgn0052855	1,22	2,13E-05
<b>89</b>	<i>E(spl)m8-HLH</i>	FBgn0002733	1,47	1,36E-25	<b>134</b>	<i>Hph</i>	FBgn0264785	1,21	8,27E-14
<b>90</b>	<i>CG34375</i>	FBgn0085404	1,47	1,15E-03	<b>135</b>	<i>CG10089</i>	FBgn0036369	1,21	5,61E-04
<b>91</b>	<i>CG30281</i>	FBgn0050281	1,46	5,06E-05	<b>136</b>	<i>CG14132</i>	FBgn0040817	1,20	4,69E-05
<b>92</b>	<i>CG6830</i>	FBgn0037934	1,45	2,92E-05	<b>137</b>	<i>CG18641</i>	FBgn0031426	1,20	4,94E-06
<b>93</b>		FBgn0266676	1,45	3,65E-03	<b>138</b>	<i>CG11652</i>	FBgn0036194	1,19	5,88E-05
<b>94</b>	<i>out</i>	FBgn0259834	1,45	2,43E-20	<b>139</b>	<i>Atg1</i>	FBgn0260945	1,18	8,07E-14
<b>95</b>	<i>CG30357</i>	FBgn0050357	1,44	3,96E-05	<b>140</b>	<i>CG32170</i>	FBgn0052170	1,17	5,50E-04
<b>96</b>	<i>Hmgcr</i>	FBgn0263782	1,44	1,17E-06	<b>141</b>	<i>Hsp83</i>	FBgn0001233	1,17	4,25E-11
<b>97</b>	<i>Hsp27</i>	FBgn0001226	1,44	1,09E-05	<b>142</b>	<i>CG15772</i>	FBgn0029799	1,16	3,97E-02
<b>98</b>	<i>Gclc</i>	FBgn0040319	1,44	4,97E-09	<b>143</b>	<i>CG6511</i>	FBgn0035923	1,16	1,10E-11
<b>99</b>	<i>CG3277</i>	FBgn0031518	1,43	6,82E-04	<b>144</b>	<i>Mrp4</i>	FBgn0263316	1,16	9,52E-08
<b>100</b>	<i>vir-1</i>	FBgn0043841	1,43	2,66E-24	<b>145</b>	<i>CG1146</i>	FBgn0035346	1,15	6,00E-13
<b>101</b>	<i>CG4998</i>	FBgn0036612	1,43	6,25E-04	<b>146</b>	<i>MME1</i>	FBgn0031881	1,14	1,68E-06
<b>102</b>		FBgn0265819	1,41	2,94E-02	<b>147</b>	<i>CG18171</i>	FBgn0035262	1,14	8,56E-09
<b>103</b>	<i>CG32982</i>	FBgn0052982	1,40	9,56E-67	<b>148</b>	<i>Esp</i>	FBgn0013953	1,13	1,76E-03
<b>104</b>	<i>Ccp84Af</i>	FBgn0004778	1,39	6,18E-03	<b>149</b>	<i>CG13108</i>	FBgn0032100	1,13	3,75E-02
<b>105</b>	<i>CG7432</i>	FBgn0038727	1,39	1,06E-22	<b>150</b>	<i>CG3838</i>	FBgn0032130	1,12	1,31E-02
<b>106</b>	<i>Tg</i>	FBgn0031975	1,37	1,65E-03	<b>151</b>	<i>vri</i>	FBgn0016076	1,12	4,57E-12
<b>107</b>		FBgn0266088	1,37	3,03E-03	<b>152</b>	<i>Ets98B</i>	FBgn0005659	1,12	6,00E-13
<b>108</b>	<i>CG33474</i>	FBgn0053474	1,36	1,14E-02	<b>153</b>	<i>GstD3</i>	FBgn0010039	1,11	6,34E-04
<b>109</b>		FBgn0266197	1,35	4,00E-02	<b>154</b>	<i>Picot</i>	FBgn0024315	1,09	4,35E-04
<b>110</b>	<i>CG4194</i>	FBgn0025627	1,33	1,95E-04	<b>155</b>	<i>CG34409</i>	FBgn0085438	1,08	6,74E-03
<b>111</b>	<i>CG14752</i>	FBgn0033307	1,31	9,05E-03	<b>156</b>	<i>CG31038</i>	FBgn0051038	1,08	2,54E-16
<b>112</b>	<i>CG15861</i>	FBgn0035084	1,30	3,19E-07	<b>157</b>	<i>lox</i>	FBgn0039848	1,06	2,87E-03
<b>113</b>	<i>wdp</i>	FBgn0034718	1,29	1,37E-11	<b>158</b>	<i>CG34057</i>	FBgn0054057	1,05	2,52E-03
<b>114</b>	<i>CG12643</i>	FBgn0040942	1,29	3,84E-04	<b>159</b>	<i>csw</i>	FBgn0000382	1,05	1,22E-06
<b>115</b>	<i>CG13046</i>	FBgn0036595	1,29	3,20E-09	<b>160</b>	<i>Xrp1</i>	FBgn0261113	1,05	1,49E-18
<b>116</b>	<i>E(spl)ma-BFM</i>	FBgn0002732	1,29	1,57E-02	<b>161</b>	<i>CG2065</i>	FBgn0033204	1,03	1,45E-04
<b>117</b>	<i>tnc</i>	FBgn0039257	1,29	1,95E-02	<b>162</b>	<i>rau</i>	FBgn0031745	1,02	6,81E-03
<b>118</b>	<i>Vrp1</i>	FBgn0243516	1,29	4,54E-08	<b>163</b>	<i>daw</i>	FBgn0031461	1,02	2,89E-02
<b>119</b>	<i>trbl</i>	FBgn0028978	1,28	1,66E-16	<b>164</b>	<i>CG32103</i>	FBgn0052103	1,02	7,40E-09
<b>120</b>	<i>mnd</i>	FBgn0002778	1,27	4,51E-12	<b>165</b>	<i>CG31955</i>	FBgn0051955	1,01	1,04E-04
<b>121</b>		FBgn0047205	1,26	6,65E-04	<b>166</b>		FBgn0013984	1,01	2,16E-03

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
167	<i>CG30089</i>	FBgn0050089	1,01	3,19E-07	212	<i>lama</i>	FBgn0016031	0,87	2,46E-03
168	<i>CG13117</i>	FBgn0032140	1,00	4,28E-04	213	<i>CG18011</i>	FBgn0033491	0,87	5,38E-05
169	<i>CG13992</i>	FBgn0031756	0,99	3,27E-02	214		FBgn0036017	0,87	4,67E-02
170	<i>GstD2</i>	FBgn0010038	0,99	2,65E-02	215	<i>CG17265</i>	FBgn0031488	0,87	6,31E-07
171	<i>Jhl-26</i>	FBgn0028424	0,98	2,39E-02	216	<i>CG15312</i>	FBgn0030174	0,86	1,41E-02
172	<i>CG11426</i>	FBgn0037166	0,98	1,27E-03	217	<i>CG1673</i>	FBgn0030482	0,86	6,22E-05
173	<i>Atf3</i>	FBgn0028550	0,98	2,79E-08	218	<i>CG8740</i>	FBgn0027585	0,86	4,44E-04
174	<i>CG44249</i>	FBgn0265184	0,97	3,26E-03	219	<i>cv-2</i>	FBgn0000395	0,86	1,10E-04
175	<i>CG6191</i>	FBgn0027581	0,97	1,02E-03	220	<i>CG18155</i>	FBgn0029945	0,86	6,78E-05
176	<i>CG7720</i>	FBgn0038652	0,96	2,13E-02	221	<i>LamC</i>	FBgn0010397	0,85	2,95E-06
177	<i>Dhc62B</i>	FBgn0013811	0,96	7,92E-04	222	<i>unc-45</i>	FBgn0010812	0,85	6,51E-07
178	<i>Sirup</i>	FBgn0031971	0,96	1,17E-02	223	<i>CG10283</i>	FBgn0032681	0,85	2,50E-05
179	<i>Drat</i>	FBgn0033188	0,95	2,16E-03	224	<i>Nop17l</i>	FBgn0033224	0,85	1,04E-37
180	<i>shn</i>	FBgn0003396	0,95	2,11E-11	225	<i>Cpr47Eb</i>	FBgn0033598	0,84	9,14E-03
181	<i>CG15887</i>	FBgn0038132	0,95	9,48E-03	226	<i>CG9098</i>	FBgn0031762	0,84	2,46E-03
182	<i>ana1</i>	FBgn0262167	0,95	2,22E-08	227	<i>CG17834</i>	FBgn0028394	0,84	8,03E-06
183	<i>GstE1</i>	FBgn0034335	0,94	1,10E-03	228	<i>E(spl)m3-HLH</i>	FBgn0002609	0,84	6,59E-07
184	<i>CG31689</i>	FBgn0031449	0,94	1,46E-06	229	<i>CAH2</i>	FBgn0027843	0,84	3,42E-03
185	<i>CG13318</i>	FBgn0037627	0,94	3,70E-02	230	<i>CG42361</i>	FBgn0259707	0,83	1,92E-02
186	<i>spz</i>	FBgn0003495	0,94	1,33E-05	231	<i>pes</i>	FBgn0031969	0,83	2,23E-05
187	<i>DNApol-1</i>	FBgn0037554	0,94	5,19E-10	232	<i>Klp98A</i>	FBgn0004387	0,83	1,67E-17
188	<i>CG17260</i>	FBgn0031498	0,94	1,09E-04	233	<i>CG11141</i>	FBgn0033177	0,82	5,28E-07
189	<i>CG14570</i>	FBgn0037122	0,93	4,89E-02	234	<i>by</i>	FBgn0000244	0,81	5,68E-03
190	<i>kay</i>	FBgn0001297	0,93	1,77E-13	235	<i>CG31121</i>	FBgn0051121	0,81	1,85E-10
191	<i>Tspo</i>	FBgn0031263	0,92	1,80E-07	236	<i>CG8321</i>	FBgn0033677	0,81	2,27E-03
192	<i>CG6006</i>	FBgn0063649	0,92	1,01E-02	237	<i>CG5639</i>	FBgn0039527	0,81	2,29E-02
193	<i>CG42588</i>	FBgn0260965	0,92	4,19E-05	238	<i>CG42365</i>	FBgn0259711	0,81	6,24E-07
194	<i>Tsf3</i>	FBgn0034094	0,91	2,45E-04	239	<i>CG11275</i>	FBgn0034706	0,81	1,44E-03
195	<i>CG31612</i>	FBgn0051612	0,91	9,17E-06	240	<i>mtDNA-helicase</i>	FBgn0032154	0,80	3,02E-07
196	<i>CenG1A</i>	FBgn0028509	0,91	4,73E-14	241	<i>mthl5</i>	FBgn0037960	0,80	5,62E-04
197	<i>CG15096</i>	FBgn0034394	0,90	2,93E-02	242	<i>Irbp</i>	FBgn0011774	0,79	1,06E-05
198	<i>GstD9</i>	FBgn0038020	0,89	6,07E-04	243	<i>ref(2)P</i>	FBgn0003231	0,79	2,26E-14
199	<i><math>\alpha</math>-Est9</i>	FBgn0015577	0,89	1,68E-06	244	<i>Ude</i>	FBgn0039226	0,79	6,43E-03
200	<i>Rel</i>	FBgn0014018	0,89	1,15E-06	245	<i>verm</i>	FBgn0261341	0,79	4,14E-04
201	<i>pall</i>	FBgn0036005	0,89	1,00E-06	246	<i>bun</i>	FBgn0259176	0,79	4,47E-04
202	<i>CG3259</i>	FBgn0038221	0,89	1,45E-04	247		FBgn0015541	0,78	1,19E-02
203	<i>sra</i>	FBgn0086370	0,89	2,26E-14	248	<i>CG11438</i>	FBgn0037164	0,78	1,65E-02
204	<i>opa</i>	FBgn0003002	0,89	1,99E-02	249	<i>Lk6</i>	FBgn0017581	0,78	1,08E-09
205	<i>CG15529</i>	FBgn0039748	0,88	4,94E-02	250	<i>dos</i>	FBgn0016794	0,78	5,03E-11
206	<i>dgo</i>	FBgn0086898	0,88	4,73E-14	251	<i>Dok</i>	FBgn0029944	0,77	2,55E-07
207	<i>Ire1</i>	FBgn0261984	0,88	2,27E-12	252	<i>drongo</i>	FBgn0020304	0,77	6,64E-06
208	<i>Pa1</i>	FBgn0030294	0,88	8,14E-16	253	<i>CG8281</i>	FBgn0035824	0,77	7,59E-03
209	<i>sas</i>	FBgn0002306	0,88	2,96E-11	254	<i>sick</i>	FBgn0263873	0,77	5,84E-06
210	<i>koi</i>	FBgn0265003	0,87	5,90E-11	255	<i>CG6749</i>	FBgn0036040	0,77	1,00E-02
211	<i>Hipk</i>	FBgn0035142	0,87	2,34E-19	256	<i>CG12971</i>	FBgn0037078	0,77	3,77E-02

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
257	<i>CG15629</i>	FBgn0031630	0,77	9,36E-03	302	<i>Usp15-31</i>	FBgn0050421	0,69	1,69E-09
258	<i>mtRNAPol</i>	FBgn0261938	0,77	1,14E-06	303	<i>Smg5</i>	FBgn0019890	0,69	1,70E-07
259	<i>cindr</i>	FBgn0027598	0,77	4,83E-15	304	<i>FER</i>	FBgn0000723	0,69	5,18E-22
260	<i>Myo61F</i>	FBgn0010246	0,77	3,27E-02	305	<i>Cyp28d2</i>	FBgn0031688	0,69	1,01E-02
261	<i>POSH</i>	FBgn0040294	0,76	1,81E-11	306	<i>loco</i>	FBgn0020278	0,69	7,01E-10
262	<i>stx</i>	FBgn0052676	0,76	1,07E-06	307		FBgn0267276	0,69	2,61E-02
263	<i>l(2)gd1</i>	FBgn0261983	0,76	1,08E-08	308	<i>Vha100-2</i>	FBgn0028670	0,69	5,46E-03
264	<i>siz</i>	FBgn0026179	0,76	1,49E-18	309	<i>Spn55B</i>	FBgn0028983	0,69	1,52E-04
265		FBgn0063449	0,76	2,96E-02	310	<i>CG4199</i>	FBgn0025628	0,69	4,51E-10
266	<i>CG42671</i>	FBgn0261553	0,75	1,98E-08	311	<i>CalpB</i>	FBgn0025866	0,69	9,84E-09
267	<i>CG9821</i>	FBgn0037636	0,75	2,54E-03	312	<i>Cyp6a13</i>	FBgn0033304	0,68	3,61E-02
268	<i>CG6040</i>	FBgn0038679	0,75	2,61E-12	313	<i>Usp32</i>	FBgn0036913	0,68	3,67E-07
269	<i>CG11700</i>	FBgn0029856	0,75	6,45E-03	314	<i>rhea</i>	FBgn0260442	0,68	8,30E-03
270	<i>Dyb</i>	FBgn0033739	0,75	4,45E-05	315	<i>kibra</i>	FBgn0262127	0,68	2,57E-07
271	<i>CG34133</i>	FBgn0083969	0,74	3,69E-20	316	<i>CG10778</i>	FBgn0029980	0,68	7,32E-06
272	<i>Hmr</i>	FBgn0001206	0,74	1,25E-05	317	<i>Nak</i>	FBgn0015772	0,68	3,69E-28
273	<i>Dmtn</i>	FBgn0037443	0,74	1,01E-03	318	<i>PEK</i>	FBgn0037327	0,68	8,44E-40
274	<i>CG6051</i>	FBgn0039492	0,74	2,77E-06	319	<i>CG30015</i>	FBgn0050015	0,68	1,84E-10
275	<i>Fbx17</i>	FBgn0038385	0,74	6,90E-12	320	<i>Frl</i>	FBgn0267795	0,68	8,15E-04
276	<i>ena</i>	FBgn0000578	0,74	1,74E-04	321	<i>Edc3</i>	FBgn0036735	0,68	2,79E-09
277	<i>Pcyt1</i>	FBgn0041342	0,74	1,74E-04	322	<i>mthl4</i>	FBgn0034219	0,68	2,29E-04
278	<i>CG9674</i>	FBgn0036663	0,74	4,80E-04	323	<i>CG42675</i>	FBgn0261561	0,67	1,69E-02
279	<i>CG43759</i>	FBgn0264090	0,73	2,58E-07	324	<i>ttk</i>	FBgn0003870	0,67	1,36E-07
280	<i>CG5290</i>	FBgn0036772	0,73	2,69E-05	325	<i>serp</i>	FBgn0260653	0,67	9,85E-03
281	<i>milt</i>	FBgn0262872	0,73	5,83E-26	326	<i>toc</i>	FBgn0015600	0,67	7,37E-15
282	<i>osp</i>	FBgn0003016	0,73	1,14E-03	327	<i>Smg6</i>	FBgn0039260	0,67	1,14E-03
283	<i>CG6966</i>	FBgn0038286	0,73	4,07E-06	328	<i>CG6175</i>	FBgn0036152	0,66	9,58E-06
284	<i>cher</i>	FBgn0014141	0,73	2,95E-07	329	<i>mol</i>	FBgn0086711	0,66	2,37E-03
285	<i>CBP</i>	FBgn0026144	0,73	2,67E-05	330	<i>Vinc</i>	FBgn0004397	0,66	5,48E-03
286	<i>CG15279</i>	FBgn0028886	0,72	1,15E-02	331	<i>spri</i>	FBgn0085443	0,66	9,96E-03
287		FBgn0083120	0,72	3,07E-02	332	<i>az2</i>	FBgn0025185	0,66	8,42E-04
288	<i>CG42554</i>	FBgn0260756	0,72	1,23E-02	333	<i>CG43736</i>	FBgn0263993	0,66	3,28E-06
289	<i>SMSr</i>	FBgn0052380	0,71	7,04E-09	334	<i>RhoGEF3</i>	FBgn0264707	0,65	3,36E-06
290		FBgn0045800	0,71	2,80E-02	335	<i>Ubx</i>	FBgn0003944	0,65	3,41E-03
291		FBgn0083124	0,71	4,61E-02	336	<i>pyd</i>	FBgn0262614	0,65	1,04E-12
292	<i>chn</i>	FBgn0015371	0,71	5,70E-04	337	<i>CG8298</i>	FBgn0033673	0,65	1,19E-06
293	<i>CG31871</i>	FBgn0051871	0,71	1,90E-02	338	<i>RhoGAP18B</i>	FBgn0261461	0,65	1,69E-06
294	<i>c11.1</i>	FBgn0040236	0,71	1,69E-14	339	<i>CG33082</i>	FBgn0053082	0,65	2,18E-02
295	<i>CG42684</i>	FBgn0261570	0,70	9,18E-08	340	<i>CG42668</i>	FBgn0261550	0,65	6,07E-07
296	<i>CG11695</i>	FBgn0030316	0,70	5,29E-03	341	<i><math>\alpha</math>-Est8</i>	FBgn0015576	0,65	1,69E-02
297	<i>lrk1</i>	FBgn0265042	0,70	9,67E-18	342	<i>xmas-1</i>	FBgn0016080	0,65	2,97E-02
298		FBgn0259936	0,70	3,00E-02	343	<i>CG4096</i>	FBgn0029791	0,65	3,36E-03
299	<i>CG14257</i>	FBgn0039479	0,70	1,14E-02	344	<i>Nf-YC</i>	FBgn0029905	0,65	3,28E-03
300	<i>nkd</i>	FBgn0002945	0,70	4,79E-10	345	<i>CG10407</i>	FBgn0038395	0,65	1,27E-02
301	<i>GlcT-1</i>	FBgn0067102	0,69	1,17E-05	346	<i>Jhl-21</i>	FBgn0028425	0,65	1,63E-02

Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		
<b>347</b>	FBgn0036646	0,64	1,19E-07	<b>374</b>	<i>D12</i>	FBgn0027490	0,61	1,10E-03	
<b>348</b>	<i>rad50</i>	FBgn0034728	0,64	2,17E-02	<b>375</b>	<i>stac</i>	FBgn0266719	0,61	2,09E-04
<b>349</b>	<i>Cdc7</i>	FBgn0028360	0,64	3,38E-04	<b>376</b>	<i>CG13204</i>	FBgn0033627	0,61	3,14E-02
<b>350</b>	<i>CG5004</i>	FBgn0260748	0,64	4,97E-09	<b>377</b>	<i>RapGAP1</i>	FBgn0264895	0,61	7,39E-10
<b>351</b>	<i>Dif</i>	FBgn0011274	0,64	3,64E-05	<b>378</b>	<i>RasGAP1</i>	FBgn0004390	0,61	1,78E-09
<b>352</b>	<i>T48</i>	FBgn0004359	0,64	1,92E-03	<b>379</b>	<i>rgn</i>	FBgn0261258	0,61	5,88E-05
<b>353</b>	<i>pwn</i>	FBgn0003174	0,64	8,88E-05	<b>380</b>	<i>CG32137</i>	FBgn0052137	0,60	7,32E-06
<b>354</b>	<i>CG15365</i>	FBgn0030077	0,64	9,54E-03	<b>381</b>	<i>CG18812</i>	FBgn0042135	0,60	1,19E-04
<b>355</b>	<i>CG11696</i>	FBgn0030314	0,64	1,45E-03	<b>382</b>	<i>Su(var)3-9</i>	FBgn0263755	0,60	3,11E-05
<b>356</b>	<i>CG10600</i>	FBgn0032717	0,63	1,37E-12	<b>383</b>	<i>Asciz</i>	FBgn0035407	0,60	3,03E-03
<b>357</b>	<i>CG15547</i>	FBgn0039809	0,63	2,21E-02	<b>384</b>	<i>CG12581</i>	FBgn0037213	0,60	3,07E-10
<b>358</b>	<i>REPTOR</i>	FBgn0039209	0,63	2,07E-02	<b>385</b>	<i>cic</i>	FBgn0262582	0,60	1,34E-07
<b>359</b>	<i>Tsp42El</i>	FBgn0033134	0,63	7,65E-04	<b>386</b>	<i>luna</i>	FBgn0040765	0,60	1,09E-04
<b>360</b>		FBgn0001332	0,62	9,75E-04	<b>387</b>	<i>CG14207</i>	FBgn0031037	0,60	3,67E-03
<b>361</b>	<i>CG42674</i>	FBgn0261556	0,62	4,00E-11	<b>388</b>	<i>lce1</i>	FBgn0034853	0,60	1,19E-07
<b>362</b>	<i>CG7101</i>	FBgn0030963	0,62	3,08E-03	<b>389</b>	<i>l(3)73Ah</i>	FBgn0002283	0,60	2,85E-07
<b>363</b>	<i>dia</i>	FBgn0011202	0,62	1,46E-04	<b>390</b>	<i>rictor</i>	FBgn0031006	0,60	8,44E-12
<b>364</b>	<i>Myo31DF</i>	FBgn0086347	0,62	6,58E-10	<b>391</b>	<i>Lnk</i>	FBgn0028717	0,60	7,50E-08
<b>365</b>	<i>Tgi</i>	FBgn0036373	0,62	2,17E-02	<b>392</b>	<i>CG6654</i>	FBgn0038301	0,59	1,32E-03
<b>366</b>	<i>CG1882</i>	FBgn0033226	0,62	1,31E-02	<b>393</b>	<i>CG2116</i>	FBgn0030003	0,59	5,61E-05
<b>367</b>	<i>Rcd5</i>	FBgn0263832	0,62	9,72E-03	<b>394</b>		FBgn0262353	0,59	1,26E-02
<b>368</b>	<i>CG13049</i>	FBgn0036592	0,62	3,37E-02	<b>395</b>	<i>spin</i>	FBgn0086676	0,59	4,79E-10
<b>369</b>	<i>GCC185</i>	FBgn0037979	0,62	8,39E-07	<b>396</b>	<i>CrebA</i>	FBgn0004396	0,59	3,45E-03
<b>370</b>	<i>crm</i>	FBgn0000376	0,62	4,75E-03	<b>397</b>	<i>zuc</i>	FBgn0261266	0,59	3,66E-02
<b>371</b>	<i>trh</i>	FBgn0262139	0,62	2,47E-04	<b>398</b>	<i>CG30069</i>	FBgn0050069	0,59	2,34E-02
<b>372</b>	<i>Hsc70-5</i>	FBgn0001220	0,61	1,30E-21	<b>399</b>	<i>CG5835</i>	FBgn0038682	0,59	8,44E-05
<b>373</b>	<i>S</i>	FBgn0003310	0,61	3,37E-11					

Tab. II: Deregulierte Gene in Tracheen männlicher Larven nach Tabakrauchexposition im Vergleich zur Luftexposition.

Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		
<b>1</b>	<i>Cpr62Bc</i>	FBgn0035281	-5,79	1,12E-37	<b>9</b>	<i>CG4962</i>	FBgn0036597	-4,03	5,00E-38
<b>2</b>	<i>Cpr100A</i>	FBgn0039805	-5,69	3,24E-83	<b>10</b>	<i>Elo688</i>	FBgn0036128	-3,76	1,06E-10
<b>3</b>	<i>Cpr92F</i>	FBgn0038819	-5,54	4,48E-64	<b>11</b>	<i>Cyp4c3</i>	FBgn0015032	-3,59	1,10E-12
<b>4</b>	<i>CG13043</i>	FBgn0036600	-5,34	4,11E-51	<b>12</b>	<i>CG18530</i>	FBgn0042207	-3,40	3,29E-10
<b>5</b>	<i>CG4000</i>	FBgn0038820	-5,24	2,37E-81	<b>13</b>	<i>Obp56d</i>	FBgn0034470	-3,34	2,11E-14
<b>6</b>	<i>CG8736</i>	FBgn0033308	-5,14	8,25E-27	<b>14</b>	<i>CREG</i>	FBgn0025456	-3,28	7,97E-17
<b>7</b>		FBgn0263406	-4,88	6,31E-28	<b>15</b>	<i>CG3009</i>	FBgn0029720	-3,25	1,88E-13
<b>8</b>	<i>CG13063</i>	FBgn0036601	-4,25	3,85E-48	<b>16</b>	<i>GstD8</i>	FBgn0010044	-3,25	9,10E-10

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
17	<i>CG15269</i>	FBgn0028878	-3,24	4,51E-08	62	<i>Nep4</i>	FBgn0038818	-2,49	2,69E-04
18	<i>Cpr56F</i>	FBgn0034499	-3,19	4,26E-08	63	<i>kn</i>	FBgn0001319	-2,46	1,31E-04
19	<i>mAChR-A</i>	FBgn0000037	-3,19	1,09E-11	64	<i>CG9259</i>	FBgn0032913	-2,46	1,41E-04
20	<i><math>\alpha</math>-Est1</i>	FBgn0015568	-3,10	2,02E-09	65	<i>CG15553</i>	FBgn0039817	-2,41	4,94E-04
21	<i>fu12</i>	FBgn0026718	-3,09	6,08E-20	66	<i>salt</i>	FBgn0039872	-2,41	2,95E-04
22	<i>smp-30</i>	FBgn0038257	-3,06	5,84E-09	67	<i>CG6415</i>	FBgn0032287	-2,40	2,28E-04
23	<i>CG15485</i>	FBgn0032442	-3,04	2,21E-05	68	<i>B-H2</i>	FBgn0004854	-2,39	3,73E-04
24	<i>CG4753</i>	FBgn0036622	-3,03	2,29E-08	69	<i>CG33340</i>	FBgn0053340	-2,39	1,75E-03
25	<i>CG15068</i>	FBgn0040733	-3,01	2,58E-07	70	<i>svp</i>	FBgn0003651	-2,39	7,53E-05
26	<i>CG3292</i>	FBgn0034710	-3,01	9,87E-07	71	<i>Apoltp</i>	FBgn0032136	-2,38	2,74E-04
27	<i>CG7227</i>	FBgn0031970	-3,00	1,32E-08	72	<i>CG10514</i>	FBgn0039312	-2,38	3,61E-04
28	<i>St4</i>	FBgn0033887	-2,97	1,58E-12	73	<i>Obp49a</i>	FBgn0050052	-2,38	1,29E-03
29	<i>CG13060</i>	FBgn0036606	-2,95	5,94E-08	74	<i>CG5321</i>	FBgn0030575	-2,38	3,29E-05
30		FBgn0266048	-2,94	1,85E-05	75	<i>CG30457</i>	FBgn0050457	-2,37	2,38E-04
31	<i>CG15506</i>	FBgn0039686	-2,91	6,44E-07	76	<i>CG2157</i>	FBgn0030244	-2,36	1,67E-04
32	<i>CG17322</i>	FBgn0027070	-2,80	1,49E-07	77	<i>CG11892</i>	FBgn0039313	-2,35	4,35E-04
33	<i>CG9265</i>	FBgn0032910	-2,79	2,75E-20	78	<i>CG15630</i>	FBgn0031627	-2,34	2,94E-07
34	<i>CG3513</i>	FBgn0031559	-2,78	5,44E-06	79	<i>SmydA-9</i>	FBgn0030102	-2,34	2,93E-04
35	<i>CG14598</i>	FBgn0037503	-2,76	1,99E-06	80	<i>Cyp4ac3</i>	FBgn0031695	-2,34	1,27E-04
36	<i>CG15067</i>	FBgn0034331	-2,75	3,33E-05	81	<i>Cyp6d5</i>	FBgn0038194	-2,33	1,97E-04
37	<i>TpnC47D</i>	FBgn0010423	-2,72	1,26E-05	82	<i>B-H1</i>	FBgn0011758	-2,33	2,80E-03
38	<i>NetA</i>	FBgn0015773	-2,70	2,20E-05	83	<i>CG16758</i>	FBgn0035348	-2,33	2,51E-04
39	<i>CG7342</i>	FBgn0038716	-2,70	1,07E-06	84	<i>Lsd-1</i>	FBgn0039114	-2,32	2,43E-04
40	<i>CG14277</i>	FBgn0032008	-2,67	2,96E-04	85	<i>SPH93</i>	FBgn0032638	-2,32	9,56E-05
41	<i>CG9452</i>	FBgn0036877	-2,66	2,48E-05	86	<i>CG17572</i>	FBgn0032753	-2,32	1,15E-03
42	<i>CG16727</i>	FBgn0038719	-2,65	2,61E-05	87	<i>CG14526</i>	FBgn0027578	-2,32	4,37E-04
43	<i>CG43085</i>	FBgn0262531	-2,64	1,65E-05	88	<i>Cyp309a1</i>	FBgn0031432	-2,31	6,19E-04
44	<i>CG15249</i>	FBgn0030161	-2,63	1,37E-05	89	<i>CG32266</i>	FBgn0052266	-2,31	8,74E-06
45	<i>CG11550</i>	FBgn0039864	-2,62	3,07E-10	90	<i>CG14945</i>	FBgn0032402	-2,30	1,31E-06
46	<i>CG32407</i>	FBgn0052407	-2,61	2,38E-06	91	<i>Cpr47Eg</i>	FBgn0086519	-2,30	5,70E-04
47	<i>CG11029</i>	FBgn0031735	-2,61	1,63E-07	92	<i>CG8100</i>	FBgn0036410	-2,30	4,35E-04
48	<i>CG7290</i>	FBgn0036949	-2,61	5,81E-06	93	<i>CG3999</i>	FBgn0037801	-2,29	5,24E-04
49	<i><math>\epsilon</math>Try</i>	FBgn0010425	-2,60	6,09E-05	94	<i>IM2</i>	FBgn0025583	-2,29	5,45E-04
50	<i>CG9451</i>	FBgn0036876	-2,59	1,42E-09	95	<i>CG15537</i>	FBgn0039770	-2,28	9,71E-04
51	<i>Jabba</i>	FBgn0259682	-2,58	3,95E-08	96	<i>Syt1</i>	FBgn0004242	-2,28	4,88E-04
52	<i>CG42798</i>	FBgn0261932	-2,56	7,35E-05	97	<i>CG12699</i>	FBgn0046294	-2,27	1,54E-03
53	<i>Cyp4d20</i>	FBgn0035344	-2,54	5,88E-05	98	<i>CG17752</i>	FBgn0038718	-2,26	8,24E-04
54	<i>CG13177</i>	FBgn0040759	-2,53	2,87E-05	99	<i>CG10799</i>	FBgn0033821	-2,26	4,61E-04
55	<i>ninaC</i>	FBgn0002938	-2,53	4,05E-04	100	<i>CG17350</i>	FBgn0032772	-2,26	2,24E-06
56	<i>NT5E-2</i>	FBgn0050104	-2,52	3,47E-05	101	<i>CG6012</i>	FBgn0032615	-2,26	1,74E-05
57	<i>CG32631</i>	FBgn0052631	-2,52	2,27E-04	102	<i>CG34253</i>	FBgn0085282	-2,26	1,72E-03
58	<i>Cyt-b5-r</i>	FBgn0000406	-2,51	7,17E-05	103	<i>CG9682</i>	FBgn0039760	-2,24	2,47E-03
59	<i>Cyp313a5</i>	FBgn0038005	-2,51	5,65E-05	104	<i>IM4</i>	FBgn0040653	-2,24	7,94E-04
60	<i>CG14292</i>	FBgn0038658	-2,50	1,86E-04	105	<i>CG5756</i>	FBgn0034301	-2,24	4,66E-04
61	<i>nompA</i>	FBgn0016047	-2,49	2,17E-07	106	<i>CG31198</i>	FBgn0051198	-2,23	1,17E-03

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
107	<i>CG34115</i>	FBgn0083951	-2,22	1,63E-09	152	<i>CG42235</i>	FBgn0250757	-2,09	2,16E-03
108	<i>CG15820</i>	FBgn0035312	-2,22	8,18E-04	153	<i>CG15293</i>	FBgn0028526	-2,08	2,16E-03
109	<i>Cyp4ac1</i>	FBgn0031693	-2,22	6,10E-05	154	<i>CG31226</i>	FBgn0051226	-2,08	3,47E-03
110		FBgn0267111	-2,22	1,14E-03	155	<i>CG33110</i>	FBgn0053110	-2,07	4,71E-03
111	<i>S-Lap7</i>	FBgn0033868	-2,21	2,37E-03	156	<i>Cyp12c1</i>	FBgn0036806	-2,07	1,98E-03
112	<i>side</i>	FBgn0016061	-2,21	2,97E-04	157	<i>mmd</i>	FBgn0259110	-2,07	3,47E-03
113	<i>CG10513</i>	FBgn0039311	-2,21	1,05E-03	158	<i>CG9920</i>	FBgn0038200	-2,06	4,53E-03
114	<i>CG5391</i>	FBgn0038943	-2,20	1,76E-04	159	<i>Cpr49Ah</i>	FBgn0033731	-2,06	3,12E-05
115	<i>Mct1</i>	FBgn0023549	-2,19	4,71E-04	160	<i>Cpr49Ae</i>	FBgn0033728	-2,06	3,14E-03
116	<i>CG16886</i>	FBgn0028938	-2,19	1,68E-06	161	<i>CG13607</i>	FBgn0039151	-2,05	1,61E-04
117	<i>Nlg1</i>	FBgn0051146	-2,19	4,67E-05	162	<i>b6</i>	FBgn0024897	-2,05	3,83E-04
118	<i>CG33462</i>	FBgn0053462	-2,19	1,19E-03	163	<i>CG15203</i>	FBgn0030261	-2,05	1,73E-03
119	<i>tup</i>	FBgn0003896	-2,18	1,15E-06	164	<i>NimC2</i>	FBgn0028939	-2,05	2,65E-03
120	<i>FarO</i>	FBgn0023550	-2,17	1,18E-03	165	<i>CG8701</i>	FBgn0033287	-2,05	7,94E-03
121	<i>CG2837</i>	FBgn0031646	-2,17	4,18E-09	166	<i>CG32248</i>	FBgn0052248	-2,04	2,30E-03
122	<i>CG4302</i>	FBgn0027073	-2,17	1,53E-03	167	<i>CG42846</i>	FBgn0262035	-2,03	2,98E-03
123	<i>CG13795</i>	FBgn0031937	-2,16	1,36E-03	168	<i>Spat</i>	FBgn0014031	-2,03	3,02E-03
124	<i>CG15649</i>	FBgn0034563	-2,16	2,52E-03	169	<i>CG31178</i>	FBgn0064912	-2,02	8,08E-03
125	<i>CG11854</i>	FBgn0039299	-2,16	2,21E-4	170	<i>apolpp</i>	FBgn0087002	-2,01	2,78E-03
126	<i>Sh</i>	FBgn0003380	-2,16	4,21E-4	171	<i>CG43742</i>	FBgn0263999	-2,01	3,42E-03
127	<i>CG13962</i>	FBgn0032824	-2,16	1,15E-3	172	<i>CG17027</i>	FBgn0036553	-2,00	6,83E-06
128	<i>CG13643</i>	FBgn0040601	-2,16	4,33E-04	173	<i>CG31740</i>	FBgn0051740	-2,00	1,92E-03
129	<i>CG18003</i>	FBgn0061356	-2,15	1,31E-03	174	<i>CG12531</i>	FBgn0031064	-2,00	4,72E-03
130	<i>CG5612</i>	FBgn0039529	-2,15	8,44E-04	175	<i>exu</i>	FBgn0000615	-2,00	3,11E-04
131	<i>Cda5</i>	FBgn0051973	-2,15	5,76E-31	176	<i>CG13284</i>	FBgn0032614	-1,99	3,83E-03
132	<i>Cpr11B</i>	FBgn0030398	-2,14	1,55E-03	177	<i>Npc2g</i>	FBgn0039800	-1,99	3,68E-03
133	<i>CG10252</i>	FBgn0039104	-2,14	5,14E-03	178	<i>nolo</i>	FBgn0051619	-1,98	5,22E-03
134	<i>sosie</i>	FBgn0039232	-2,13	4,22E-04	179	<i>CG31821</i>	FBgn0051821	-1,98	6,35E-03
135	<i>Fst</i>	FBgn0037724	-2,13	1,51E-03	180	<i>CG14957</i>	FBgn0035412	-1,98	6,71E-03
136	<i>Eglp4</i>	FBgn0034885	-2,13	7,77E-04	181	<i>CG14301</i>	FBgn0038632	-1,98	3,00E-09
137	<i>CG3264</i>	FBgn0034712	-2,13	1,70E-03	182	<i>CG31313</i>	FBgn0051313	-1,97	7,31E-05
138	<i>TwdlX</i>	FBgn0052571	-2,13	1,56E-03	183	<i>klg</i>	FBgn0017590	-1,96	7,36E-03
139	<i>Ndg</i>	FBgn0026403	-2,13	1,44E-04	184	<i>CG1544</i>	FBgn0039827	-1,96	7,88E-04
140	<i>Kr</i>	FBgn0001325	-2,13	4,35E-04	185	<i>Lcp65Ag1</i>	FBgn0020638	-1,96	1,45E-02
141	<i>CG12057</i>	FBgn0030098	-2,12	4,14E-03	186	<i>Pglym87</i>	FBgn0011270	-1,95	1,34E-02
142	<i>CG6660</i>	FBgn0039030	-2,12	1,95E-03	187	<i>Amy-d</i>	FBgn0000078	-1,95	1,19E-02
143	<i>tfc</i>	FBgn0035199	-2,12	1,59E-08	188	<i>AstA-R2</i>	FBgn0039595	-1,95	5,54E-03
144	<i>fest</i>	FBgn0034435	-2,11	6,76E-03	189	<i>Lectin-galC1</i>	FBgn0016675	-1,95	3,90E-03
145	<i>CG4408</i>	FBgn0039073	-2,11	1,70E-03	190	<i>CG10505</i>	FBgn0034612	-1,95	5,51E-03
146	<i>CG9822</i>	FBgn0034623	-2,11	1,92E-03	191	<i>CG4793</i>	FBgn0028514	-1,95	2,34E-03
147	<i>MsR2</i>	FBgn0264002	-2,11	3,22E-03	192		FBgn0261503	-1,95	1,21E-02
148	<i>bru1</i>	FBgn0000114	-2,11	1,70E-03	193	<i>CG6055</i>	FBgn0031918	-1,95	1,01E-04
149	<i>Uro</i>	FBgn0003961	-2,10	1,97E-03	194	<i>Reg-2</i>	FBgn0016715	-1,94	4,44E-03
150	<i>CG11313</i>	FBgn0039798	-2,09	1,92E-03	195	<i>ana</i>	FBgn0011746	-1,94	6,17E-03
151	<i>Oatp58Db</i>	FBgn0034715	-2,09	6,90E-04	196	<i>sqa</i>	FBgn0259678	-1,93	1,12E-03



	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
197	<i>axo</i>	FBgn0262870	-1,93	8,98E-05	242	<i>S-Lap4</i>	FBgn0052064	-1,86	1,00E-02
198	<i>CG15870</i>	FBgn0033798	-1,93	4,80E-03	243	<i>CG32645</i>	FBgn0052645	-1,86	6,21E-06
199	<i>Gld2</i>	FBgn0038934	-1,93	3,63E-03	244	<i>CG11835</i>	FBgn0031264	-1,86	7,94E-04
200	<i>CG43060</i>	FBgn0262362	-1,93	6,43E-03	245	<i>CG12860</i>	FBgn0033954	-1,86	1,46E-02
201	<i>CG14854</i>	FBgn0038238	-1,92	1,47E-02	246	<i>CG2254</i>	FBgn0029994	-1,86	4,57E-03
202	<i>CG16743</i>	FBgn0032322	-1,92	5,74E-03	247	<i>Ktl</i>	FBgn0038839	-1,86	7,89E-03
203	<i>Ms</i>	FBgn0011581	-1,92	6,07E-03	248	<i>Lsp2</i>	FBgn0002565	-1,85	6,84E-03
204	<i>Lim1</i>	FBgn0026411	-1,92	2,13E-03	249	<i>CG10483</i>	FBgn0035649	-1,85	5,56E-04
205	<i>RyR</i>	FBgn0011286	-1,92	3,31E-03	250	<i>CG42324</i>	FBgn0259224	-1,85	4,82E-03
206	<i>LysB</i>	FBgn0004425	-1,91	6,16E-03	251	<i>trv</i>	FBgn0085391	-1,85	8,83E-03
207		FBgn0266005	-1,91	1,81E-10	252	<i>CG4723</i>	FBgn0039023	-1,85	7,47E-03
208	<i>CG3961</i>	FBgn0036821	-1,91	9,16E-04	253	<i>CG9717</i>	FBgn0039789	-1,85	6,19E-04
209	<i>CG15414</i>	FBgn0031542	-1,91	7,77E-10	254	<i>CG33307</i>	FBgn0053307	-1,85	7,21E-03
210	<i>Rbp</i>	FBgn0262483	-1,91	5,63E-03	255	<i>Fbp2</i>	FBgn0000640	-1,85	5,56E-03
211	<i>Cyp9b2</i>	FBgn0015039	-1,91	5,95E-03	256	<i>Mal-A5</i>	FBgn0050359	-1,84	8,30E-03
212	<i>CG12607</i>	FBgn0035545	-1,91	1,18E-02	257	<i>CG30271</i>	FBgn0050271	-1,84	2,14E-02
213	<i>LManVI</i>	FBgn0032069	-1,90	1,80E-02	258	<i>GluRIIA</i>	FBgn0004620	-1,84	4,99E-03
214	<i>CG42370</i>	FBgn0259716	-1,90	3,82E-03	259	<i>CG2233</i>	FBgn0029990	-1,84	7,80E-03
215	<i>Alk</i>	FBgn0040505	-1,90	8,32E-04	260	<i>S-Lap8</i>	FBgn0034132	-1,84	1,23E-02
216	<i>Wnt6</i>	FBgn0031902	-1,90	1,43E-17	261	<i>CG8888</i>	FBgn0033679	-1,83	5,91E-03
217	<i>Est-6</i>	FBgn0000592	-1,90	4,56E-03	262	<i>CG5048</i>	FBgn0036437	-1,83	6,71E-03
218	<i>Spn88Eb</i>	FBgn0038299	-1,90	4,56E-03	263	<i>Nna1</i>	FBgn0265726	-1,83	5,70E-04
219	<i>Hf</i>	FBgn0014000	-1,90	6,02E-03	264	<i>CG9896</i>	FBgn0034808	-1,83	8,73E-09
220	<i>CG43064</i>	FBgn0262366	-1,90	5,73E-03	265	<i>CG13618</i>	FBgn0039203	-1,83	8,63E-03
221	<i>CG4213</i>	FBgn0031251	-1,90	2,35E-03	266	<i>CG7882</i>	FBgn0033047	-1,83	1,65E-02
222	<i>v</i>	FBgn0003965	-1,89	6,92E-03	267	<i>CG34166</i>	FBgn0085195	-1,83	8,30E-03
223	<i>CG15155</i>	FBgn0032669	-1,89	1,09E-03	268	<i>Gs1</i>	FBgn0001142	-1,83	9,11E-04
224	<i>Rpt6R</i>	FBgn0039788	-1,89	1,16E-03	269	<i>CG4306</i>	FBgn0036787	-1,82	9,59E-03
225	<i>CG14949</i>	FBgn0035358	-1,89	5,72E-03	270	<i>su(r)</i>	FBgn0086450	-1,82	6,99E-03
226	<i>retn</i>	FBgn0004795	-1,89	9,43E-03	271	<i>CG33493</i>	FBgn0053493	-1,82	9,24E-03
227	<i>CG14823</i>	FBgn0035734	-1,88	3,97E-03	272	<i>Ank2</i>	FBgn0261788	-1,82	1,50E-03
228	<i>CG6067</i>	FBgn0029828	-1,88	9,15E-03	273	<i>RhoGAP102A</i>	FBgn0259216	-1,82	5,52E-03
229	<i>CG14516</i>	FBgn0039640	-1,88	5,23E-03	274	<i>sNPF-R</i>	FBgn0036934	-1,82	5,79E-04
230	<i>CG10184</i>	FBgn0039094	-1,88	3,28E-03	275	<i>Cyp4e2</i>	FBgn0014469	-1,81	3,15E-04
231	<i>Tep1</i>	FBgn0041183	-1,88	1,19E-03	276		FBgn0015323	-1,81	1,28E-02
232	<i>CG1773</i>	FBgn0033439	-1,87	7,43E-03	277	<i>fon</i>	FBgn0032773	-1,81	6,72E-03
233	<i>Mpcp1</i>	FBgn0034497	-1,87	6,23E-03	278	<i>CG9626</i>	FBgn0037565	-1,81	5,00E-03
234	<i>CG7320</i>	FBgn0036782	-1,87	7,21E-03	279	<i>CG12826</i>	FBgn0033207	-1,81	9,01E-03
235	<i>CG16836</i>	FBgn0040735	-1,87	8,56E-03	280	<i>CG17377</i>	FBgn0031859	-1,81	2,14E-02
236	<i>CG34136</i>	FBgn0083972	-1,87	5,94E-03	281	<i>ImpE2</i>	FBgn0001254	-1,81	8,20E-03
237	<i>CG6329</i>	FBgn0033872	-1,86	6,94E-03	282	<i>Lcp9</i>	FBgn0025578	-1,81	8,15E-03
238	<i>CNMa</i>	FBgn0035282	-1,86	7,14E-03	283	<i>CG31663</i>	FBgn0051663	-1,81	9,31E-03
239	<i>DopEcR</i>	FBgn0035538	-1,86	1,38E-02	284	<i>CG10345</i>	FBgn0027562	-1,81	8,89E-03
240	<i>Lkr</i>	FBgn0035610	-1,86	2,35E-03	285	<i>CG6733</i>	FBgn0039052	-1,81	1,59E-02
241	<i>CG32333</i>	FBgn0052333	-1,86	3,48E-03	286	<i>inv</i>	FBgn0001269	-1,80	7,39E-03

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
287	<i>CG9313</i>	FBgn0034566	-1,80	7,94E-03	332	<i>Wnt10</i>	FBgn0031903	-1,74	7,49E-03
288	<i>CG13641</i>	FBgn0039239	-1,80	1,06E-02	333	<i>CG12824</i>	FBgn0033222	-1,73	2,91E-02
289	<i>GluRIID</i>	FBgn0028422	-1,80	4,70E-03	334	<i>CG1468</i>	FBgn0030157	-1,73	1,33E-02
290	<i>CG30090</i>	FBgn0050090	-1,80	1,02E-02	335	<i>CG1674</i>	FBgn0039897	-1,73	4,39E-03
291	<i>Fbp1</i>	FBgn0000639	-1,80	9,59E-03	336	<i>nompC</i>	FBgn0016920	-1,73	3,65E-03
292	<i>CG34284</i>	FBgn0085313	-1,80	2,12E-02	337	<i>Lcp65Aa</i>	FBgn0020645	-1,73	1,34E-02
293	<i>SLO2</i>	FBgn0261698	-1,79	3,87E-03	338	<i>tut</i>	FBgn0052364	-1,73	2,15E-02
294	<i>Zasp66</i>	FBgn0035917	-1,79	6,07E-03	339	<i>AANATL2</i>	FBgn0031791	-1,73	1,27E-05
295	<i>CG15306</i>	FBgn0030191	-1,79	1,51E-02	340	<i>twit</i>	FBgn0032895	-1,73	1,69E-02
296	<i>CG2082</i>	FBgn0027608	-1,79	1,45E-04	341	<i>CG2861</i>	FBgn0029728	-1,73	3,07E-02
297	<i>slo</i>	FBgn0003429	-1,79	9,56E-04	342		FBgn0265497	-1,73	1,06E-02
298	<i>fne</i>	FBgn0086675	-1,79	7,81E-03	343	<i>CG43886</i>	FBgn0264478	-1,73	1,33E-02
299	<i>Acp65Aa</i>	FBgn0020765	-1,79	1,49E-02	344	<i>sals</i>	FBgn0051374	-1,73	1,80E-03
300	<i>Mur18B</i>	FBgn0030999	-1,78	6,71E-03	345	<i>CG31769</i>	FBgn0051769	-1,73	1,59E-02
301	<i>CG14406</i>	FBgn0030595	-1,78	1,17E-02	346	<i>Obp99c</i>	FBgn0039682	-1,73	1,03E-02
302	<i>Sodh-1</i>	FBgn0024289	-1,78	8,94E-03	347	<i>CG7084</i>	FBgn0038938	-1,73	1,86E-02
303	<i>CG42319</i>	FBgn0259219	-1,78	7,56E-03	348	<i>CG7763</i>	FBgn0040503	-1,72	1,76E-02
304	<i>CG9449</i>	FBgn0036875	-1,78	9,82E-03	349	<i>CG11221</i>	FBgn0031855	-1,72	1,15E-02
305	<i>CG16704</i>	FBgn0031558	-1,77	1,16E-02	350	<i>IM33</i>	FBgn0031561	-1,72	1,15E-02
306	<i>CG15531</i>	FBgn0039755	-1,77	9,18E-03	351	<i>CG33120</i>	FBgn0053120	-1,72	1,44E-02
307	<i>CG11842</i>	FBgn0039629	-1,77	1,64E-02	352	<i>CG30091</i>	FBgn0050091	-1,72	1,53E-02
308	<i>repo</i>	FBgn0011701	-1,77	1,16E-02	353	<i>tadr</i>	FBgn0032911	-1,72	1,95E-02
309	<i>CG9993</i>	FBgn0034553	-1,77	6,95E-03	354	<i>Amy-p</i>	FBgn0000079	-1,71	2,92E-02
310		FBgn0264255	-1,77	1,03E-03	355	<i>Gnmt</i>	FBgn0038074	-1,71	5,46E-03
311	<i>CG1441</i>	FBgn0033464	-1,77	5,81E-03	356	<i>CG10132</i>	FBgn0032798	-1,71	9,34E-03
312	<i>ths</i>	FBgn0033652	-1,76	1,33E-02	357	<i>CG14762</i>	FBgn0033250	-1,71	1,42E-02
313	<i>teq</i>	FBgn0023479	-1,76	1,23E-02	358	<i>CG4842</i>	FBgn0036620	-1,71	1,67E-02
314	<i>CG8157</i>	FBgn0034010	-1,76	8,30E-03	359	<i>zye</i>	FBgn0036985	-1,70	1,71E-02
315	<i>S-Lap2</i>	FBgn0052351	-1,76	1,75E-02	360	<i>CG5177</i>	FBgn0031908	-1,70	1,14E-02
316	<i>CG13833</i>	FBgn0039040	-1,76	7,11E-03	361	<i>CG15765</i>	FBgn0029814	-1,70	1,32E-02
317	<i>Tps1</i>	FBgn0027560	-1,76	9,14E-03	362	<i>CG18266</i>	FBgn0031724	-1,70	1,01E-02
318	<i>Cpr97Ea</i>	FBgn0039480	-1,76	4,08E-07	363	<i>CG15109</i>	FBgn0034416	-1,69	2,83E-02
319	<i>CG3332</i>	FBgn0031514	-1,75	1,61E-02	364	<i>cDIP</i>	FBgn0038865	-1,69	1,98E-02
320	<i>CG10560</i>	FBgn0039325	-1,75	1,32E-02	365	<i><math>\beta</math>Tub85D</i>	FBgn0003889	-1,69	2,30E-02
321	<i>CG43236</i>	FBgn0262881	-1,75	8,30E-03	366	<i>CG8249</i>	FBgn0034045	-1,69	1,31E-02
322	<i>CG10205</i>	FBgn0033970	-1,75	1,21E-02	367	<i>CG6209</i>	FBgn0033862	-1,69	2,31E-02
323	<i>CG18446</i>	FBgn0033458	-1,75	1,13E-02	368	<i>CG32032</i>	FBgn0043806	-1,68	1,25E-02
324	<i>CG13559</i>	FBgn0034870	-1,75	1,62E-02	369	<i>CG1139</i>	FBgn0035300	-1,68	3,92E-03
325	<i>CG43110</i>	FBgn0262570	-1,75	7,18E-03	370	<i>CG8517</i>	FBgn0034472	-1,68	8,30E-03
326	<i>CG34168</i>	FBgn0085197	-1,75	2,45E-02	371	<i>Neurochondrin</i>	FBgn0037447	-1,68	2,49E-03
327		FBgn0262972	-1,74	8,05E-03	372	<i>nemy</i>	FBgn0261673	-1,68	6,72E-03
328	<i>CG13707</i>	FBgn0035578	-1,74	2,40E-03	373	<i>CG8519</i>	FBgn0035711	-1,68	1,37E-02
329	<i>Ppi1</i>	FBgn0051025	-1,74	1,36E-02	374	<i>CG8852</i>	FBgn0031548	-1,68	5,02E-03
330	<i>DNasell</i>	FBgn0000477	-1,74	1,22E-02	375	<i>Ptx1</i>	FBgn0020912	-1,68	2,10E-02
331	<i>S-Lap1</i>	FBgn0035915	-1,74	1,60E-02	376	<i>TpnC25D</i>	FBgn0031692	-1,68	2,26E-02

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
377	<i>CG12911</i>	FBgn0033501	-1,68	1,25E-02	422	<i>CG13168</i>	FBgn0033705	-1,63	4,19E-02
378	<i>CG32655</i>	FBgn0052655	-1,68	2,89E-02	423		FBgn0083055	-1,63	3,59E-02
379	<i>CG2127</i>	FBgn0033286	-1,68	2,72E-02	424	<i>CG7582</i>	FBgn0039681	-1,63	3,11E-02
380	<i>CG10031</i>	FBgn0031563	-1,67	1,95E-02	425	<i>D</i>	FBgn0000411	-1,62	6,16E-04
381		FBgn0082919	-1,67	2,31E-02	426	<i>CG42269</i>	FBgn0259164	-1,62	2,21E-08
382	<i>CG4721</i>	FBgn0039024	-1,67	1,08E-02	427	<i>Acox57D-p</i>	FBgn0034628	-1,62	1,34E-04
383	<i>Hsp60C</i>	FBgn0031728	-1,67	2,73E-02	428	<i>CG12655</i>	FBgn0031080	-1,62	7,47E-03
384	<i>Dscam2</i>	FBgn0265296	-1,67	2,19E-02	429		FBgn0262964	-1,62	2,69E-02
385	<i>htl</i>	FBgn0010389	-1,67	1,08E-02	430	<i>Cyp28d1</i>	FBgn0031689	-1,62	2,23E-02
386	<i>CG13937</i>	FBgn0035287	-1,67	5,29E-04	431	<i>igl</i>	FBgn0013467	-1,62	2,16E-02
387	<i>CG13315</i>	FBgn0040827	-1,67	2,03E-02	432		FBgn0263628	-1,62	4,09E-02
388	<i>Cyp4d8</i>	FBgn0015033	-1,66	2,61E-02	433	<i>CG5866</i>	FBgn0038508	-1,62	1,81E-02
389	<i>CG3394</i>	FBgn0034999	-1,66	7,70E-11	434	<i>CG6910</i>	FBgn0036262	-1,62	2,14E-02
390	<i>CG3246</i>	FBgn0031538	-1,66	2,03E-02	435	<i>Dhit</i>	FBgn0028743	-1,61	7,13E-03
391	<i>Dpy-30L2</i>	FBgn0035491	-1,66	4,28E-02	436	<i>Nlg2</i>	FBgn0031866	-1,61	1,30E-02
392	<i>IM14</i>	FBgn0067905	-1,66	2,20E-02	437	<i>eyes</i>	FBgn0031414	-1,61	1,91E-02
393	<i>TM4SF</i>	FBgn0020372	-1,66	1,25E-02	438	<i>CG3213</i>	FBgn0031545	-1,61	3,06E-02
394	<i>CG15545</i>	FBgn0039806	-1,65	4,04E-02	439	<i>tn</i>	FBgn0265356	-1,61	1,91E-02
395	<i>CG14687</i>	FBgn0037835	-1,65	2,12E-02	440	<i>CG30414</i>	FBgn0050414	-1,61	1,18E-02
396	<i>DIP-γ</i>	FBgn0039617	-1,65	2,10E-02	441	<i>CanA1</i>	FBgn0010015	-1,61	2,61E-02
397	<i>CG30148</i>	FBgn0050148	-1,65	1,01E-02	442	<i>Lsp1α</i>	FBgn0002562	-1,61	1,52E-02
398	<i>phyl</i>	FBgn0013725	-1,65	4,02E-02	443	<i>CG44245</i>	FBgn0265180	-1,61	1,73E-02
399	<i>Elo68α</i>	FBgn0052072	-1,65	7,34E-03	444	<i>CG31760</i>	FBgn0051760	-1,61	2,64E-02
400	<i>CG11816</i>	FBgn0030495	-1,65	2,09E-02	445	<i>CG1113</i>	FBgn0037304	-1,61	3,33E-02
401	<i>lyd</i>	FBgn0036125	-1,65	2,64E-02	446	<i>CG5597</i>	FBgn0034920	-1,61	9,05E-03
402	<i>NimB3</i>	FBgn0054003	-1,65	2,12E-02	447	<i>so</i>	FBgn0003460	-1,61	2,36E-02
403		FBgn0265376	-1,64	2,45E-02	448	<i>Rbp4</i>	FBgn0010258	-1,60	7,97E-03
404	<i>Act57B</i>	FBgn0000044	-1,64	2,24E-02	449	<i>Cyp4d1</i>	FBgn0005670	-1,60	1,93E-02
405	<i>CG30116</i>	FBgn0028496	-1,64	2,05E-02	450	<i>Cyp4ac2</i>	FBgn0031694	-1,60	2,48E-02
406	<i>CG17751</i>	FBgn0038717	-1,64	3,13E-02	451	<i>CG18557</i>	FBgn0031470	-1,60	2,49E-02
407	<i>SdhBL</i>	FBgn0030975	-1,64	3,17E-02	452	<i>CG9876</i>	FBgn0034821	-1,60	3,13E-02
408	<i>Nrx-1</i>	FBgn0038975	-1,64	6,49E-03	453	<i>Mid1</i>	FBgn0053988	-1,60	1,04E-02
409	<i>CG45076</i>	FBgn0266446	-1,64	1,69E-02	454	<i>Nha2</i>	FBgn0263390	-1,60	1,61E-02
410	<i>Tm2</i>	FBgn0004117	-1,64	1,83E-02	455	<i>CG10734</i>	FBgn0034082	-1,60	3,60E-02
411	<i>CG12853</i>	FBgn0040747	-1,64	4,50E-02	456	<i>NKCC</i>	FBgn0051547	-1,60	1,17E-03
412	<i>Oat</i>	FBgn0022774	-1,64	7,13E-03	457	<i>TrxT</i>	FBgn0029752	-1,60	3,62E-02
413	<i>CG15369</i>	FBgn0030105	-1,64	1,93E-02	458	<i>kat-60L1</i>	FBgn0037375	-1,60	3,46E-02
414	<i>GluRIIE</i>	FBgn0051201	-1,64	1,01E-02	459	<i>GluRIIB</i>	FBgn0020429	-1,60	2,43E-02
415	<i>Cyp6g1</i>	FBgn0025454	-1,64	1,96E-02	460	<i>Fmo-1</i>	FBgn0034943	-1,60	2,52E-02
416	<i>MFS9</i>	FBgn0038799	-1,63	1,39E-02	461	<i>CG32115</i>	FBgn0052115	-1,59	2,25E-02
417	<i>Mf</i>	FBgn0038294	-1,63	1,80E-02	462	<i>Muc11A</i>	FBgn0052656	-1,59	2,78E-02
418	<i>CG13360</i>	FBgn0025620	-1,63	2,16E-02	463	<i>CG10237</i>	FBgn0032783	-1,59	1,08E-06
419	<i>Cyp310a1</i>	FBgn0032693	-1,63	2,29E-02	464	<i>SerT</i>	FBgn0010414	-1,59	3,57E-02
420	<i>CG14528</i>	FBgn0039611	-1,63	1,39E-02	465	<i>Obp83g</i>	FBgn0046875	-1,59	1,31E-02
421	<i>Argk</i>	FBgn0000116	-1,63	1,63E-02	466	<i>CG13196</i>	FBgn0033645	-1,59	2,01E-06

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
467	<i>RIC-3</i>	FBgn0050296	-1,59	1,37E-02	512	<i>Appl</i>	FBgn0000108	-1,54	1,05E-02
468	<i>Mhc</i>	FBgn0264695	-1,59	2,80E-02	513	<i>GILT3</i>	FBgn0039098	-1,54	3,68E-03
469	<i>CG8563</i>	FBgn0035777	-1,58	1,73E-02	514	<i>CG16713</i>	FBgn0031560	-1,54	2,90E-02
470	<i>dsb</i>	FBgn0035290	-1,58	2,76E-02	515	<i>CG4325</i>	FBgn0026878	-1,54	2,99E-02
471	<i>Gbp3</i>	FBgn0039031	-1,58	2,31E-02	516	<i>TotC</i>	FBgn0044812	-1,54	3,53E-02
472	<i>Elk</i>	FBgn0011589	-1,58	1,79E-04	517	<i>Ptp36E</i>	FBgn0267486	-1,54	2,06E-02
473	<i>sev</i>	FBgn0003366	-1,58	2,56E-03	518	<i>CG14990</i>	FBgn0035496	-1,54	3,00E-02
474	<i>NAAT1</i>	FBgn0029762	-1,58	8,54E-03	519	<i>Ace</i>	FBgn0000024	-1,54	6,85E-04
475	<i>CG13449</i>	FBgn0036520	-1,58	1,61E-02	520	<i>CG14770</i>	FBgn0029573	-1,53	1,63E-02
476	<i>TpnC73F</i>	FBgn0010424	-1,58	2,28E-02	521	<i>Mlc2</i>	FBgn0002773	-1,53	3,01E-02
477	<i>FucTA</i>	FBgn0036485	-1,58	1,10E-02	522	<i>Lapsyn</i>	FBgn0034602	-1,53	4,02E-02
478	<i>CG9444</i>	FBgn0037730	-1,57	2,50E-02	523	<i>Cyp313a3</i>	FBgn0038007	-1,53	3,46E-02
479	<i>CG15406</i>	FBgn0031517	-1,57	1,66E-02	524	<i>Mst33A</i>	FBgn0028412	-1,53	1,98E-02
480	<i>CG34353</i>	FBgn0085382	-1,57	3,72E-02	525	<i>Aplip1</i>	FBgn0040281	-1,53	4,83E-02
481	<i>Decay</i>	FBgn0028381	-1,57	1,38E-02	526	<i>CG8550</i>	FBgn0033742	-1,52	3,73E-02
482	<i>AstA</i>	FBgn0015591	-1,57	3,59E-02	527	<i>Vha68-1</i>	FBgn0265262	-1,52	1,27E-02
483	<i>KFase</i>	FBgn0031821	-1,57	3,00E-02	528	<i>CG13229</i>	FBgn0033579	-1,52	1,17E-02
484	<i>Npc2h</i>	FBgn0039801	-1,57	1,89E-02	529	<i>Sid</i>	FBgn0039593	-1,52	2,27E-02
485	<i>CG34331</i>	FBgn0085360	-1,57	2,54E-05	530	<i>Ca-<math>\alpha</math>1T</i>	FBgn0264386	-1,52	3,00E-02
486		FBgn0042650	-1,57	3,22E-02	531	<i>rdgC</i>	FBgn0265959	-1,52	2,94E-02
487	<i>CG10361</i>	FBgn0036208	-1,57	3,46E-02	532	<i>Cyp4s3</i>	FBgn0030615	-1,51	2,54E-02
488	<i>CG12768</i>	FBgn0037206	-1,56	6,37E-03	533	<i>CG4335</i>	FBgn0038795	-1,51	1,01E-02
489	<i>Unc-89</i>	FBgn0053519	-1,56	2,83E-02	534	<i>Slob</i>	FBgn0264087	-1,51	2,20E-02
490	<i>CG42587</i>	FBgn0260955	-1,56	2,61E-02	535	<i>Elal</i>	FBgn0013949	-1,51	2,87E-02
491	<i>CG5023</i>	FBgn0038774	-1,56	3,14E-02	536		FBgn0262815	-1,51	3,72E-02
492	<i>euc</i>	FBgn0038665	-1,56	4,78E-02	537		FBgn0004028	-1,51	3,20E-02
493	<i>CG5945</i>	FBgn0032494	-1,56	4,95E-02	538	<i>Root</i>	FBgn0039152	-1,51	3,99E-02
494	<i>CG3285</i>	FBgn0031522	-1,56	2,96E-02	539	<i>ppk</i>	FBgn0020258	-1,51	3,57E-03
495	<i>CG9616</i>	FBgn0038214	-1,56	3,11E-02	540	<i>Wnt2</i>	FBgn0004360	-1,51	2,70E-02
496	<i>Cyp6a22</i>	FBgn0013773	-1,55	3,32E-02	541	<i>CG13606</i>	FBgn0039161	-1,51	3,33E-02
497	<i>CG9312</i>	FBgn0038179	-1,55	3,23E-03	542	<i>CG34232</i>	FBgn0085261	-1,51	3,70E-12
498	<i>CG14509</i>	FBgn0039647	-1,55	1,20E-02	543	<i>CG43347</i>	FBgn0263072	-1,50	4,59E-02
499	<i>CG33459</i>	FBgn0053459	-1,55	2,72E-02	544	<i>eEF1<math>\alpha</math>2</i>	FBgn0000557	-1,50	1,65E-02
500	<i>CG14661</i>	FBgn0037288	-1,55	1,08E-02	545	<i>Asph</i>	FBgn0034075	-1,50	7,22E-05
501	<i>Cpr66Cb</i>	FBgn0035875	-1,55	5,41E-03	546	<i><math>\alpha</math>-Est2</i>	FBgn0015570	-1,50	1,90E-02
502	<i>Lsp1b</i>	FBgn0002563	-1,55	1,84E-02	547	<i>Lip1</i>	FBgn0023496	-1,50	1,92E-02
503	<i>jeb</i>	FBgn0086677	-1,55	3,63E-02	548	<i>St2</i>	FBgn0037665	-1,50	3,31E-02
504	<i>Ork1</i>	FBgn0017561	-1,55	2,89E-02	549	<i>Obp99a</i>	FBgn0039678	-1,50	3,33E-02
505	<i>CG45095</i>	FBgn0266534	-1,55	9,72E-03	550	<i>scrt</i>	FBgn0004880	-1,50	4,89E-02
506	<i>Act87E</i>	FBgn0000046	-1,55	3,17E-02	551	<i>GluRIIC</i>	FBgn0046113	-1,50	2,75E-02
507	<i>Mal-A6</i>	FBgn0050360	-1,54	3,46E-02	552	<i>CG32695</i>	FBgn0052695	-1,50	4,27E-02
508	<i>CG44422</i>	FBgn0265595	-1,54	4,20E-02	553	<i>CG3775</i>	FBgn0030425	-1,50	3,62E-02
509	<i>sPLA2</i>	FBgn0033170	-1,54	3,27E-02	554	<i>Cyp4g1</i>	FBgn0010019	-1,50	1,34E-02
510	<i>CG18208</i>	FBgn0038653	-1,54	2,65E-02	555	<i>CG10175</i>	FBgn0039084	-1,50	2,38E-04
511	<i>AQP</i>	FBgn0033807	-1,54	3,83E-02	556	<i>CG7465</i>	FBgn0035551	-1,49	3,00E-02

Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		
<b>557</b>	FBgn0082983	-1,49	3,86E-02	<b>602</b>	<i>w-cup</i>	FBgn0032269	-1,43	4,17E-02	
<b>558</b>	<i>CG11425</i>	FBgn0037167	-1,49	4,09E-02	<b>603</b>	<i>RluA-1</i>	FBgn0051719	-1,43	4,14E-02
<b>559</b>	<i>CG16779</i>	FBgn0037698	-1,49	4,52E-02	<b>604</b>	<i>Ca-<math>\alpha</math>1D</i>	FBgn0001991	-1,43	2,89E-02
<b>560</b>	<i>CG17999</i>	FBgn0034552	-1,49	4,73E-02	<b>605</b>	<i>CG6867</i>	FBgn0030887	-1,43	4,59E-02
<b>561</b>	<i>CG10348</i>	FBgn0032707	-1,49	3,04E-02	<b>606</b>	<i>CG33521</i>	FBgn0250819	-1,42	2,14E-02
<b>562</b>	<i>Gbp2</i>	FBgn0034200	-1,49	4,46E-02	<b>607</b>		FBgn0267665	-1,42	4,49E-02
<b>563</b>	<i>Tsp47F</i>	FBgn0033629	-1,49	4,09E-02	<b>608</b>	<i>CG12480</i>	FBgn0030537	-1,42	4,60E-02
<b>564</b>	<i>CG10953</i>	FBgn0034204	-1,48	3,27E-02	<b>609</b>		FBgn0052372	-1,42	1,26E-02
<b>565</b>	<i>CG18249</i>	FBgn0037553	-1,48	1,69E-02	<b>610</b>	<i>CG8565</i>	FBgn0030697	-1,42	4,70E-02
<b>566</b>	<i>Mlc1</i>	FBgn0002772	-1,48	4,24E-02	<b>611</b>	<i>Wnt4</i>	FBgn0010453	-1,42	4,65E-02
<b>567</b>	<i>S-Lap3</i>	FBgn0045770	-1,48	1,98E-02	<b>612</b>	<i>Glycogenin</i>	FBgn0265191	-1,42	3,07E-04
<b>568</b>		FBgn0264871	-1,47	4,76E-02	<b>613</b>	<i>Klp59C</i>	FBgn0034824	-1,41	4,21E-02
<b>569</b>	<i>CG2070</i>	FBgn0033203	-1,47	3,39E-02	<b>614</b>	<i>CG31676</i>	FBgn0051676	-1,41	1,60E-02
<b>570</b>	<i>Adgf-D</i>	FBgn0038172	-1,47	4,58E-02	<b>615</b>	<i>CG33460</i>	FBgn0053460	-1,41	2,86E-02
<b>571</b>	<i>CG13337</i>	FBgn0033863	-1,47	4,92E-02	<b>616</b>	<i>shakB</i>	FBgn0085387	-1,41	3,75E-02
<b>572</b>	<i>Lip2</i>	FBgn0024740	-1,47	3,66E-02	<b>617</b>	<i>CG15695</i>	FBgn0038832	-1,41	1,45E-02
<b>573</b>	<i>CG10947</i>	FBgn0032857	-1,47	2,19E-02	<b>618</b>	<i>CG12105</i>	FBgn0035241	-1,40	3,29E-02
<b>574</b>	<i>CG16926</i>	FBgn0040732	-1,47	4,18E-02	<b>619</b>	<i>CG33281</i>	FBgn0053281	-1,40	2,67E-02
<b>575</b>	<i>Cyp304a1</i>	FBgn0038095	-1,46	2,35E-02	<b>620</b>	<i>CG17349</i>	FBgn0032771	-1,40	4,20E-02
<b>576</b>	<i>Rgk3</i>	FBgn0085426	-1,46	4,04E-02	<b>621</b>		FBgn0265634	-1,40	3,11E-02
<b>577</b>	<i>CG4666</i>	FBgn0029838	-1,46	9,55E-03	<b>622</b>	<i>Cyp12a4</i>	FBgn0038681	-1,40	9,48E-03
<b>578</b>	<i>Sardh</i>	FBgn0034276	-1,46	2,61E-02	<b>623</b>	<i>Pka-C3</i>	FBgn0000489	-1,40	7,47E-03
<b>579</b>	<i>CG43078</i>	FBgn0262508	-1,46	3,60E-02	<b>624</b>		FBgn0083005	-1,40	4,92E-02
<b>580</b>	<i>CG33926</i>	FBgn0053926	-1,46	3,62E-02	<b>625</b>	<i>Tsp42Ej</i>	FBgn0033132	-1,40	4,54E-02
<b>581</b>	<i>CG13403</i>	FBgn0030544	-1,46	3,96E-02	<b>626</b>		FBgn0051451	-1,39	9,74E-03
<b>582</b>	<i>CG5773</i>	FBgn0034290	-1,46	4,96E-02	<b>627</b>	<i>CG1358</i>	FBgn0033196	-1,39	2,34E-02
<b>583</b>	<i>Snmp1</i>	FBgn0260004	-1,46	1,33E-04	<b>628</b>	<i>CG31221</i>	FBgn0051221	-1,39	1,11E-02
<b>584</b>	<i>Lsp1<math>\gamma</math></i>	FBgn0002564	-1,46	2,02E-02	<b>629</b>	<i>CG1208</i>	FBgn0037386	-1,39	8,34E-03
<b>585</b>	<i>CG10026</i>	FBgn0032785	-1,46	1,27E-02	<b>630</b>	<i>CG43902</i>	FBgn0264503	-1,39	4,73E-02
<b>586</b>	<i>nAChRa5</i>	FBgn0028875	-1,45	4,03E-02	<b>631</b>	<i>CG6403</i>	FBgn0039453	-1,39	2,52E-02
<b>587</b>	<i>Cyp12a5</i>	FBgn0038680	-1,45	4,66E-02	<b>632</b>		FBgn0265648	-1,39	4,43E-02
<b>588</b>	<i>CG13705</i>	FBgn0035582	-1,45	4,05E-02	<b>633</b>	<i>CG17362</i>	FBgn0036393	-1,39	2,90E-02
<b>589</b>	<i>up</i>	FBgn0004169	-1,45	4,25E-02	<b>634</b>	<i>CG11670</i>	FBgn0038114	-1,38	2,02E-02
<b>590</b>	<i>djl</i>	FBgn0037463	-1,45	4,33E-02	<b>635</b>	<i>Cyp9h1</i>	FBgn0033775	-1,38	4,95E-02
<b>591</b>	<i>arg</i>	FBgn0023535	-1,45	4,25E-02	<b>636</b>	<i>Gagr</i>	FBgn0036627	-1,38	9,97E-03
<b>592</b>	<i>IM23</i>	FBgn0034328	-1,45	3,66E-02	<b>637</b>	<i>CG34296</i>	FBgn0085325	-1,38	4,32E-02
<b>593</b>	<i>CG15546</i>	FBgn0039807	-1,44	4,68E-02	<b>638</b>	<i>CG14109</i>	FBgn0036364	-1,38	2,80E-02
<b>594</b>	<i>Oatp58Da</i>	FBgn0050277	-1,44	4,22E-02	<b>639</b>	<i>sens-2</i>	FBgn0051632	-1,38	4,31E-02
<b>595</b>	<i>CG42694</i>	FBgn0261584	-1,44	1,29E-03	<b>640</b>	<i>Cpr49Aa</i>	FBgn0050045	-1,38	4,07E-02
<b>596</b>	<i>CG12926</i>	FBgn0033437	-1,44	1,08E-02	<b>641</b>	<i>CG10962</i>	FBgn0030073	-1,37	2,70E-02
<b>597</b>	<i>kcc</i>	FBgn0261794	-1,44	2,16E-04	<b>642</b>	<i>CG42566</i>	FBgn0260768	-1,37	3,31E-02
<b>598</b>	<i>CG6908</i>	FBgn0037936	-1,44	4,54E-02	<b>643</b>		FBgn0051781	-1,37	2,30E-03
<b>599</b>	<i>Acer</i>	FBgn0016122	-1,44	4,62E-03	<b>644</b>	<i>pyd3</i>	FBgn0037513	-1,37	3,11E-02
<b>600</b>	<i>CG32444</i>	FBgn0043783	-1,44	1,72E-02	<b>645</b>	<i>yellow-e2</i>	FBgn0038151	-1,37	4,60E-02
<b>601</b>	<i>CG32700</i>	FBgn0267253	-1,43	4,43E-02	<b>646</b>	<i>Obp83ef</i>	FBgn0046876	-1,37	4,28E-02

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
647	<i>SmydA-1</i>	FBgn0033917	-1,36	3,26E-02	692	<i>CG5966</i>	FBgn0029831	-1,25	1,67E-02
648	<i>CG44085</i>	FBgn0264894	-1,36	1,16E-02	693	<i>Rbp9</i>	FBgn0010263	-1,25	7,10E-03
649		FBgn0086057	-1,36	3,50E-03	694	<i>UK114</i>	FBgn0086691	-1,25	4,24E-02
650	<i>Cngl</i>	FBgn0263257	-1,35	4,32E-02	695	<i>CG31140</i>	FBgn0051140	-1,24	3,22E-02
651	<i>pug</i>	FBgn0020385	-1,35	2,90E-02	696	<i>CG32026</i>	FBgn0052026	-1,24	4,20E-02
652	<i>Orct</i>	FBgn0019952	-1,35	2,57E-10	697	<i>et</i>	FBgn0031055	-1,24	2,61E-02
653	<i>ϑTry</i>	FBgn0011555	-1,35	3,70E-02	698	<i>hoe1</i>	FBgn0041150	-1,24	4,38E-02
654	<i>Sclp</i>	FBgn0030357	-1,35	1,06E-03	699	<i>CG3604</i>	FBgn0031562	-1,24	2,03E-02
655	<i>Nmdar2</i>	FBgn0053513	-1,35	3,58E-02	700	<i>Ca-β</i>	FBgn0259822	-1,24	3,63E-02
656	<i>nrv3</i>	FBgn0032946	-1,34	1,91E-02	701	<i>CG42390</i>	FBgn0259736	-1,23	3,47E-05
657	<i>CG31380</i>	FBgn0051380	-1,34	4,90E-02	702	<i>Sox21b</i>	FBgn0042630	-1,23	2,74E-02
658	<i>CG40485</i>	FBgn0069973	-1,34	4,20E-02	703	<i>CG33494</i>	FBgn0053494	-1,23	3,18E-03
659	<i>CG9629</i>	FBgn0036857	-1,34	1,20E-02	704	<i>SPARC</i>	FBgn0026562	-1,23	3,21E-03
660	<i>CG33225</i>	FBgn0053225	-1,34	1,47E-02	705	<i>Eo</i>	FBgn0030597	-1,23	1,32E-02
661	<i>CG30046</i>	FBgn0050046	-1,33	4,87E-03	706	<i>yellow-e</i>	FBgn0041711	-1,23	1,14E-07
662	<i>CG13654</i>	FBgn0039290	-1,33	2,54E-02	707	<i>PH4αMP</i>	FBgn0026190	-1,23	1,30E-02
663	<i>CG5618</i>	FBgn0036975	-1,33	6,71E-04	708		FBgn0065064	-1,23	3,47E-05
664	<i>grk</i>	FBgn0001137	-1,33	1,18E-02	709	<i>CG13893</i>	FBgn0035146	-1,23	8,20E-03
665	<i>GNBP2</i>	FBgn0040322	-1,33	2,98E-02	710	<i>CG4259</i>	FBgn0031389	-1,22	1,13E-03
666		FBgn0263470	-1,33	1,31E-02	711	<i>na</i>	FBgn0002917	-1,21	4,89E-02
667	<i>CG31183</i>	FBgn0051183	-1,33	2,65E-09	712	<i>CG15431</i>	FBgn0031602	-1,21	2,13E-02
668	<i>CG1213</i>	FBgn0037387	-1,32	2,10E-02	713	<i>CG14629</i>	FBgn0040398	-1,21	2,80E-03
669	<i>Syt4</i>	FBgn0028400	-1,31	3,95E-02	714	<i>α-Est5</i>	FBgn0261393	-1,20	2,51E-03
670	<i>CG43125</i>	FBgn0262588	-1,31	4,01E-02	715	<i>Dgk</i>	FBgn0085390	-1,19	4,49E-02
671	<i>Slc45-1</i>	FBgn0035968	-1,31	3,17E-02	716	<i>CG42369</i>	FBgn0259715	-1,19	1,68E-02
672		FBgn0083050	-1,31	2,38E-02	717	<i>CG14258</i>	FBgn0039482	-1,19	3,28E-02
673	<i>CG42817</i>	FBgn0261999	-1,31	1,33E-02	718	<i>ssp6</i>	FBgn0035676	-1,19	2,82E-02
674	<i>jp</i>	FBgn0032129	-1,31	1,47E-02	719	<i>futsch</i>	FBgn0259108	-1,18	3,75E-02
675	<i>CG4250</i>	FBgn0034761	-1,31	6,84E-03	720		FBgn0020546	-1,18	6,24E-04
676	<i>CG42492</i>	FBgn0259994	-1,31	2,76E-02	721	<i>firl</i>	FBgn0032405	-1,18	9,99E-04
677		FBgn0263617	-1,31	1,30E-05	722	<i>mthl2</i>	FBgn0035623	-1,18	9,48E-04
678	<i>Mal-B2</i>	FBgn0032382	-1,30	2,72E-02	723	<i>MFS14</i>	FBgn0010651	-1,18	1,46E-02
679	<i>Mdr65</i>	FBgn0004513	-1,29	3,32E-03	724		FBgn0086663	-1,18	4,33E-02
680	<i>CG9510</i>	FBgn0032076	-1,29	3,97E-02	725	<i>Tsp42Ed</i>	FBgn0029507	-1,17	4,56E-02
681	<i>Nplp2</i>	FBgn0040813	-1,29	3,65E-03	726	<i>αTub85E</i>	FBgn0003886	-1,16	4,14E-02
682	<i>NimB5</i>	FBgn0028936	-1,28	3,00E-02	727	<i>SP2353</i>	FBgn0034070	-1,16	2,50E-03
683	<i>NT1</i>	FBgn0261526	-1,28	1,42E-02	728	<i>Corin</i>	FBgn0033192	-1,16	2,98E-02
684	<i>CG6293</i>	FBgn0037807	-1,28	1,09E-02	729	<i>CG4822</i>	FBgn0031220	-1,16	1,02E-02
685	<i>CG10433</i>	FBgn0034638	-1,27	3,64E-03	730		FBgn0266958	-1,16	3,48E-02
686	<i>Ac76E</i>	FBgn0004852	-1,26	9,43E-03	731	<i>Glt</i>	FBgn0001114	-1,15	1,93E-04
687	<i>Gabat</i>	FBgn0036927	-1,26	1,80E-02	732	<i>CG13907</i>	FBgn0035173	-1,15	7,80E-04
688	<i>Cpr49Ad</i>	FBgn0033726	-1,26	4,91E-02	733	<i>CG14642</i>	FBgn0037222	-1,14	1,27E-03
689	<i>Dh44-R2</i>	FBgn0033744	-1,26	4,91E-02	734	<i>rost</i>	FBgn0011705	-1,13	1,06E-04
690	<i>GB5</i>	FBgn0030011	-1,26	2,72E-02	735	<i>CG43729</i>	FBgn0263980	-1,13	1,55E-02
691	<i>CG30187</i>	FBgn0050187	-1,25	5,52E-03	736	<i>CG42834</i>	FBgn0262023	-1,12	7,94E-04

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
737	<i>cysu</i>	FBgn0038511	-1,12	3,42E-03	782	<i>FASN3</i>	FBgn0040001	-0,97	2,71E-02
738	<i>Nox</i>	FBgn0085428	-1,12	1,67E-02	783	<i>CG6034</i>	FBgn0036750	-0,97	4,77E-02
739	<i>CG30376</i>	FBgn0050376	-1,12	3,91E-02	784	<i>fat-spondin</i>	FBgn0026721	-0,97	1,31E-02
740	<i>CG32845</i>	FBgn0052845	-1,12	3,23E-03	785	<i>He</i>	FBgn0028430	-0,97	3,25E-02
741	<i>kar</i>	FBgn0001296	-1,12	1,02E-02	786	<i>CG7408</i>	FBgn0036765	-0,96	4,92E-05
742	<i>CG5071</i>	FBgn0039347	-1,11	1,16E-02	787		FBgn0051044	-0,96	1,38E-02
743	<i>Sobp</i>	FBgn0033654	-1,11	1,15E-03	788		FBgn0267495	-0,95	6,18E-06
744	<i>CG30431</i>	FBgn0050431	-1,11	2,10E-02	789	<i>CG4267</i>	FBgn0264979	-0,95	2,15E-02
745	<i>CG1092</i>	FBgn0037228	-1,10	3,64E-03	790	<i>CG10623</i>	FBgn0032727	-0,94	5,30E-05
746	<i>CG4950</i>	FBgn0036587	-1,10	2,05E-02	791	<i>Ance-5</i>	FBgn0035076	-0,93	1,15E-02
747	<i>regucalcin</i>	FBgn0030362	-1,10	3,24E-03	792		FBgn0261613	-0,93	1,01E-02
748	<i>CG7906</i>	FBgn0036417	-1,10	4,06E-02	793	<i>Tsp29Fb</i>	FBgn0032075	-0,93	2,72E-06
749	<i>CG9664</i>	FBgn0031515	-1,10	4,54E-04	794		FBgn0266046	-0,93	3,38E-03
750	<i>CG6700</i>	FBgn0032305	-1,09	2,53E-15	795	<i>Adgf-A</i>	FBgn0036752	-0,93	1,33E-02
751	<i>Eip63F-1</i>	FBgn0004910	-1,08	1,57E-03	796	<i>CG14523</i>	FBgn0039612	-0,92	4,39E-02
752	<i>bol</i>	FBgn0011206	-1,07	4,30E-03	797	<i>CG14275</i>	FBgn0032022	-0,92	4,13E-06
753	<i>t</i>	FBgn0086367	-1,06	3,31E-02	798	<i>spidey</i>	FBgn0029975	-0,91	2,97E-02
754	<i>Mco1</i>	FBgn0032116	-1,05	5,62E-04	799	<i>Gbs-76A</i>	FBgn0036862	-0,90	4,27E-02
755	<i>CG4829</i>	FBgn0030796	-1,04	2,29E-03	800	<i>CG42259</i>	FBgn0266569	-0,90	3,78E-06
756	<i>CG10131</i>	FBgn0033949	-1,04	8,48E-04	801	<i>eater</i>	FBgn0243514	-0,90	3,86E-02
757	<i>CG12003</i>	FBgn0035234	-1,04	1,69E-02	802	<i>rdgB</i>	FBgn0003218	-0,89	1,42E-11
758	<i>CG10581</i>	FBgn0037046	-1,04	1,12E-05	803	<i>ckd</i>	FBgn0035427	-0,89	2,45E-02
759		FBgn0264821	-1,03	1,52E-04	804	<i>CG1271</i>	FBgn0035392	-0,89	2,39E-05
760	<i>CG17075</i>	FBgn0031239	-1,03	4,77E-02	805	<i>Hexo2</i>	FBgn0041629	-0,88	3,42E-03
761	<i>CG7091</i>	FBgn0038099	-1,02	2,46E-02	806	<i>sls</i>	FBgn0086906	-0,88	3,19E-02
762	<i>Ndae1</i>	FBgn0259111	-1,02	1,81E-02	807	<i>AcCoAS</i>	FBgn0012034	-0,87	4,95E-02
763	<i>LKRSDH</i>	FBgn0025687	-1,02	8,39E-04	808	<i>Gld</i>	FBgn0001112	-0,86	2,27E-04
764	<i>CG32335</i>	FBgn0063667	-1,02	4,38E-02	809	<i>St1</i>	FBgn0034887	-0,85	1,81E-02
765	<i>jtb</i>	FBgn0034126	-1,02	2,83E-02	810	<i>dsx</i>	FBgn0000504	-0,85	3,73E-02
766	<i>Nep1</i>	FBgn0029843	-1,01	1,65E-02	811	<i>bib</i>	FBgn0000180	-0,84	1,33E-07
767		FBgn0263659	-1,01	1,68E-03	812	<i>CG3630</i>	FBgn0023540	-0,84	3,70E-02
768	<i>CrzR</i>	FBgn0036278	-1,01	7,24E-03	813	<i>Ptp52F</i>	FBgn0034085	-0,84	4,46E-02
769	<i>CG7912</i>	FBgn0039736	-1,01	2,80E-03	814	<i>CG8501</i>	FBgn0033724	-0,84	8,10E-04
770	<i>Snmp2</i>	FBgn0035815	-1,00	3,68E-02	815	<i>Karl</i>	FBgn0030334	-0,83	3,29E-02
771	<i>srp</i>	FBgn0003507	-1,00	2,87E-02	816	<i>Vha36-3</i>	FBgn0040377	-0,83	3,37E-02
772	<i>NtR</i>	FBgn0029147	-1,00	5,57E-03	817	<i>Pbgs</i>	FBgn0036271	-0,83	6,37E-06
773	<i>CG17839</i>	FBgn0036454	-0,99	1,67E-02	818	<i>Octβ2R</i>	FBgn0038063	-0,82	4,42E-02
774	<i>CG31337</i>	FBgn0051337	-0,99	5,19E-03	819	<i>CG1265</i>	FBgn0035517	-0,82	1,68E-03
775	<i>CG14606</i>	FBgn0037485	-0,99	3,44E-02	820	<i>CG4729</i>	FBgn0036623	-0,82	1,76E-17
776	<i>CG11951</i>	FBgn0039656	-0,99	3,54E-02	821	<i>CG17928</i>	FBgn0032603	-0,81	4,69E-02
777	<i>CG3829</i>	FBgn0035091	-0,99	3,25E-02	822		FBgn0267668	-0,80	3,58E-03
778	<i>NimB1</i>	FBgn0027929	-0,99	1,60E-02	823	<i>CG7646</i>	FBgn0036926	-0,80	2,99E-02
779	<i>NimB4</i>	FBgn0028542	-0,99	2,02E-02	824	<i>CG14332</i>	FBgn0038509	-0,80	6,30E-03
780	<i>lectin-24Db</i>	FBgn0040102	-0,97	3,98E-02	825	<i>Actn</i>	FBgn0000667	-0,80	2,83E-02
781	<i>fabp</i>	FBgn0037913	-0,97	1,31E-03	826	<i>cu</i>	FBgn0261808	-0,80	2,87E-03

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
<b>827</b>	<i>CG9663</i>	FBgn0031516	-0,79	1,99E-06	<b>850</b>	<i>CG12338</i>	FBgn0033543	-0,67	2,73E-02
<b>828</b>	<i>CG12017</i>	FBgn0035429	-0,78	7,68E-03	<b>851</b>	<i>Pu</i>	FBgn0003162	-0,67	7,92E-05
<b>829</b>	<i>Arpc3B</i>	FBgn0065032	-0,78	3,66E-02	<b>852</b>	<i>ScpX</i>	FBgn0015808	-0,67	1,06E-05
<b>830</b>	<i>CG32354</i>	FBgn0052354	-0,77	2,48E-02	<b>853</b>	<i>SP2637</i>	FBgn0034371	-0,66	3,70E-06
<b>831</b>	<i>CG8031</i>	FBgn0038110	-0,77	5,66E-03	<b>854</b>	<i>CG7328</i>	FBgn0036942	-0,65	1,62E-04
<b>832</b>	<i>CG4115</i>	FBgn0038017	-0,77	2,79E-02	<b>855</b>	<i>hwt</i>	FBgn0264542	-0,65	4,27E-02
<b>833</b>	<i>Ir51b</i>	FBgn0050081	-0,77	2,96E-02	<b>856</b>	<i>CG8177</i>	FBgn0036043	-0,65	1,21E-16
<b>834</b>	<i>Pxn</i>	FBgn0011828	-0,76	3,69E-02	<b>857</b>	<i>Jheh3</i>	FBgn0034406	-0,65	1,15E-02
<b>835</b>	<i>CG7900</i>	FBgn0037548	-0,76	7,71E-05	<b>858</b>	<i>ZC3H3</i>	FBgn0035900	-0,65	1,00E-05
<b>836</b>	<i>CG10960</i>	FBgn0036316	-0,74	1,10E-02	<b>859</b>	<i>fz3</i>	FBgn0027343	-0,64	4,19E-02
<b>837</b>	<i>btv</i>	FBgn0023096	-0,74	3,44E-02	<b>860</b>	<i>odd</i>	FBgn0002985	-0,64	3,72E-02
<b>838</b>	<i>CG18508</i>	FBgn0028746	-0,74	1,05E-06	<b>861</b>	<i>Cht11</i>	FBgn0029913	-0,64	1,13E-03
<b>839</b>	<i>CG10672</i>	FBgn0035588	-0,73	1,76E-10	<b>862</b>	<i>otk2</i>	FBgn0267728	-0,63	4,21E-02
<b>840</b>	<i>GlcAT-P</i>	FBgn0036144	-0,72	1,89E-02	<b>863</b>	<i>CG31712</i>	FBgn0051712	-0,63	3,51E-05
<b>841</b>	<i>CG31777</i>	FBgn0051777	-0,72	2,34E-03	<b>864</b>	<i>Cdk2</i>	FBgn0004107	-0,63	5,23E-03
<b>842</b>	<i>hebe</i>	FBgn0033448	-0,71	1,92E-03	<b>865</b>	<i>Rbp1-like</i>	FBgn0030479	-0,62	4,61E-04
<b>843</b>	<i>mira</i>	FBgn0021776	-0,70	3,64E-03	<b>866</b>	<i>CG5973</i>	FBgn0031914	-0,62	4,70E-03
<b>844</b>	<i>CG43340</i>	FBgn0263077	-0,70	1,92E-02	<b>867</b>	<i>CG31950</i>	FBgn0051950	-0,62	1,17E-02
<b>845</b>	<i>CG31495</i>	FBgn0051495	-0,70	1,95E-02	<b>868</b>	<i>CG16986</i>	FBgn0035356	-0,62	4,40E-03
<b>846</b>	<i>PNUTS</i>	FBgn0053526	-0,69	1,97E-13	<b>869</b>	<i>CG1136</i>	FBgn0035490	-0,61	1,15E-03
<b>847</b>	<i>CG3568</i>	FBgn0029710	-0,69	2,06E-02	<b>870</b>	<i>CG40486</i>	FBgn0263830	-0,61	1,27E-02
<b>848</b>	<i>Gal</i>	FBgn0001089	-0,68	2,17E-02	<b>871</b>	<i>CG4957</i>	FBgn0032205	-0,61	1,87E-03
<b>849</b>	<i>CG4297</i>	FBgn0031258	-0,68	4,02E-02	<b>872</b>	<i>Ppcs</i>	FBgn0261285	-0,60	1,52E-04



Tab. III: Hochregulierte Gene in Tracheen weiblicher Larven nach Tabakrauchexposition im Vergleich zur Luftexposition.

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
1	<i>CG11825</i>	FBgn0033519	6,68	2,27E-78	43		FBgn0265419	2,04	7,40E-08
2	<i>dyl</i>	FBgn0066365	4,75	2,74E-42	44	<i>CG43092</i>	FBgn0262538	2,04	2,90E-04
3		FBgn0041607	4,07	1,89E-95	45	<i>CG11529</i>	FBgn0036264	2,04	1,86E-05
4	<i>Cyp6a20</i>	FBgn0033980	3,99	1,04E-16	46	<i>Gclc</i>	FBgn0040319	2,03	1,68E-12
5	<i>Prx2540-1</i>	FBgn0033520	3,55	1,16E-19	47	<i>ple</i>	FBgn0005626	2,02	7,38E-09
6	<i>CG14327</i>	FBgn0038526	3,31	1,05E-13	48	<i>MtnD</i>	FBgn0053192	2,00	5,42E-05
7	<i>CG11426</i>	FBgn0037166	3,23	5,89E-72	49	<i>Adk1</i>	FBgn0022709	2,00	1,48E-21
8	<i>CG13116</i>	FBgn0032139	3,17	6,98E-17	50	<i>Pino</i>	FBgn0016926	1,97	1,92E-27
9	<i>CG15673</i>	FBgn0034639	3,12	6,92E-29	51	<i>l(1)G0469</i>	FBgn0040153	1,95	2,43E-47
10	<i>Tdc1</i>	FBgn0259977	3,07	3,97E-36	52	<i>Cpr47Ea</i>	FBgn0033597	1,95	2,56E-06
11	<i>Impl2</i>	FBgn0001257	2,87	5,01E-79	53	<i>GstE7</i>	FBgn0063493	1,95	6,08E-08
12	<i>Prx2540-2</i>	FBgn0033518	2,80	1,51E-15	54	<i>CG7130</i>	FBgn0037151	1,95	1,24E-14
13	<i>Gaf</i>	FBgn0010223	2,76	7,07E-57	55	<i>CG2765</i>	FBgn0035087	1,92	7,55E-217
14		FBgn0267679	2,74	6,05E-06	56	<i>Hsp26</i>	FBgn0001225	1,91	1,30E-04
15	<i>Tret1-1</i>	FBgn0050035	2,70	5,54E-14	57	<i>CG42561</i>	FBgn0260763	1,90	8,58E-07
16	<i>stv</i>	FBgn0086708	2,69	2,88E-31	58		FBgn0263406	1,88	1,47E-12
17	<i>GstD2</i>	FBgn0010038	2,64	3,31E-18	59		FBgn0261548	1,87	1,35E-22
18	<i>CG5953</i>	FBgn0032587	2,63	2,99E-28	60	<i>CG5321</i>	FBgn0030575	1,87	1,82E-11
19	<i>Hsp68</i>	FBgn0001230	2,63	9,88E-16	61	<i>Esp</i>	FBgn0013953	1,86	1,06E-12
20	<i>upd2</i>	FBgn0030904	2,52	2,18E-08	62	<i>CG32266</i>	FBgn0052266	1,86	1,27E-06
21	<i>Hsp70Bbb</i>	FBgn0051354	2,52	2,52E-07	63	<i>DPCoAC</i>	FBgn0067783	1,86	1,00E-33
22	<i>CG2065</i>	FBgn0033204	2,47	3,29E-14	64		FBgn0001234	1,85	4,47E-10
23	<i>Ets21C</i>	FBgn0005660	2,42	3,23E-08	65	<i>out</i>	FBgn0259834	1,85	3,96E-31
24	<i>Hsp70Ba</i>	FBgn0013277	2,39	6,41E-07	66	<i>CG42816</i>	FBgn0261998	1,84	1,78E-03
25	<i>daw</i>	FBgn0031461	2,39	1,68E-17	67	<i>Gadd45</i>	FBgn0033153	1,84	8,19E-08
26	<i>Pdk</i>	FBgn0017558	2,38	5,90E-62	68	<i>CG6026</i>	FBgn0038676	1,83	2,62E-04
27	<i>CG9733</i>	FBgn0039759	2,37	2,99E-07	69		FBgn0264987	1,83	3,35E-04
28	<i>CG12896</i>	FBgn0033521	2,34	4,84E-12	70	<i>CG13643</i>	FBgn0040601	1,82	1,49E-10
29	<i>MtnE</i>	FBgn0262146	2,34	1,42E-10	71	<i>GstD4</i>	FBgn0010040	1,81	2,76E-04
30	<i>rpr</i>	FBgn0011706	2,32	1,79E-20	72	<i>vir-1</i>	FBgn0043841	1,81	3,74E-21
31	<i>DnaJ-1</i>	FBgn0263106	2,32	6,71E-15	73	<i>Cyp4d20</i>	FBgn0035344	1,80	3,05E-14
32	<i>puc</i>	FBgn0243512	2,30	3,68E-51	74	<i>CG18641</i>	FBgn0031426	1,79	4,60E-12
33	<i>Thor</i>	FBgn0261560	2,25	1,11E-24	75	<i>CG14961</i>	FBgn0035439	1,78	3,48E-05
34	<i>Dgp-1</i>	FBgn0027836	2,23	4,90E-42	76	<i>GstE1</i>	FBgn0034335	1,77	1,42E-13
35	<i>insc</i>	FBgn0011674	2,20	2,26E-16	77	<i>CG10383</i>	FBgn0032699	1,76	1,35E-51
36		FBgn0267635	2,20	1,14E-12	78	<i>CG15005</i>	FBgn0035508	1,73	1,39E-03
37	<i>ETHR</i>	FBgn0038874	2,18	3,09E-38	79	<i>tx</i>	FBgn0263118	1,73	6,95E-12
38	<i>GstD6</i>	FBgn0010042	2,14	8,01E-06	80	<i>CG14339</i>	FBgn0031301	1,71	2,69E-03
39	<i>CG2017</i>	FBgn0037391	2,12	6,28E-27	81	<i>MtnA</i>	FBgn0002868	1,71	2,29E-04
40	<i>upd3</i>	FBgn0053542	2,12	4,90E-09	82	<i>Gclm</i>	FBgn0046114	1,70	7,01E-14
41	<i>CG10365</i>	FBgn0039109	2,10	5,20E-17	83	<i>St4</i>	FBgn0033887	1,70	2,69E-18
42	<i>CG12851</i>	FBgn0035086	2,08	2,35E-10	84	<i>CG5346</i>	FBgn0038981	1,69	7,08E-30

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
85	<i>Nos</i>	FBgn0011676	1,68	4,99E-05	130	<i>CG4000</i>	FBgn0038820	1,52	3,00E-13
86	<i>Ccp84Ac</i>	FBgn0004781	1,68	2,58E-03	131	<i>Idgf1</i>	FBgn0020416	1,51	3,29E-06
87	<i>Cc2d2a</i>	FBgn0263113	1,68	6,67E-04	132	<i>Cpr56F</i>	FBgn0034499	1,50	2,88E-03
88	<i>CG1698</i>	FBgn0033443	1,67	1,76E-13	133	<i>to</i>	FBgn0039298	1,50	2,53E-03
89	<i>CG7509</i>	FBgn0035575	1,67	1,11E-03	134	<i>CG11652</i>	FBgn0036194	1,49	7,21E-08
90	<i>olf186-M</i>	FBgn0015522	1,66	2,16E-20	135	<i>Vrp1</i>	FBgn0243516	1,49	2,50E-09
91	<i>Ugt36Ba</i>	FBgn0040262	1,65	4,56E-04	136	<i>Jabba</i>	FBgn0259682	1,49	8,40E-07
92		FBgn0266088	1,65	7,22E-04	137	<i>ju</i>	FBgn0263973	1,48	1,69E-05
93	<i>PK1-R</i>	FBgn0038201	1,65	1,96E-04	138	<i>CG34375</i>	FBgn0085404	1,48	2,24E-05
94	<i>CG34165</i>	FBgn0085194	1,64	1,30E-07	139	<i>CG1441</i>	FBgn0033464	1,48	6,33E-05
95	<i>Obp50e</i>	FBgn0033931	1,64	2,14E-03	140	<i>path</i>	FBgn0036007	1,47	6,82E-05
96	<i>CNMa</i>	FBgn0035282	1,64	5,63E-05	141	<i>wdp</i>	FBgn0034718	1,47	3,38E-30
97	<i>Ccp84Af</i>	FBgn0004778	1,64	9,67E-05	142	<i>CenG1A</i>	FBgn0028509	1,47	1,21E-15
98		FBgn0267127	1,64	1,89E-04	143	<i>CG2070</i>	FBgn0033203	1,46	8,63E-04
99	<i>CG32982</i>	FBgn0052982	1,63	6,93E-33	144	<i>hwt</i>	FBgn0264542	1,46	1,03E-08
100	<i>CG18530</i>	FBgn0042207	1,63	2,24E-04	145	<i>CG14132</i>	FBgn0040817	1,45	1,78E-09
101	<i>slif</i>	FBgn0037203	1,63	1,44E-11	146	<i>CG13482</i>	FBgn0036419	1,45	1,28E-03
102	<i>CG15506</i>	FBgn0039686	1,62	3,05E-05	147	<i>Tret1-2</i>	FBgn0033644	1,45	5,33E-03
103	<i>Hex-t1</i>	FBgn0042711	1,62	3,36E-03	148	<i>Hsp70Bb</i>	FBgn0013278	1,44	1,55E-03
104	<i>CG32645</i>	FBgn0052645	1,62	1,48E-13	149	<i>Hsp23</i>	FBgn0001224	1,44	1,01E-03
105	<i>Hsp70Bc</i>	FBgn0013279	1,62	4,05E-04	150	<i>CG6830</i>	FBgn0037934	1,44	1,34E-03
106	<i>CG7365</i>	FBgn0036939	1,61	1,05E-07	151	<i>Osi19</i>	FBgn0037429	1,42	8,85E-03
107	<i>CG32407</i>	FBgn0052407	1,61	5,50E-07	152	<i>Picot</i>	FBgn0024315	1,42	1,92E-07
108	<i>Cyp6a21</i>	FBgn0033981	1,61	6,67E-05	153	<i>CG12914</i>	FBgn0033499	1,42	1,96E-02
109	<i>CG15249</i>	FBgn0030161	1,60	2,90E-04	154	<i>CG9498</i>	FBgn0031801	1,42	1,37E-03
110	<i>CG8908</i>	FBgn0034493	1,59	5,42E-08	155	<i>CG17322</i>	FBgn0027070	1,41	1,29E-07
111	<i>Cpr100A</i>	FBgn0039805	1,58	6,23E-05	156	<i>Mrp4</i>	FBgn0263316	1,41	8,17E-17
112	<i>CG4998</i>	FBgn0036612	1,58	1,31E-04	157	<i>slam</i>	FBgn0043854	1,41	8,30E-03
113	<i>GstD10</i>	FBgn0042206	1,58	4,20E-05	158	<i>r-cup</i>	FBgn0031142	1,41	8,63E-03
114		FBgn0265204	1,58	1,16E-03	159		FBgn0052865	1,41	1,06E-02
115	<i>shd</i>	FBgn0003388	1,56	2,37E-06	160	<i>GstE3</i>	FBgn0063497	1,40	2,74E-07
116	<i>CG9717</i>	FBgn0039789	1,56	1,33E-07	161	<i>Jhl-26</i>	FBgn0028424	1,40	1,45E-03
117	<i>CG4753</i>	FBgn0036622	1,56	1,42E-06	162	<i>CG11893</i>	FBgn0039316	1,39	2,57E-03
118	<i>Cpr92F</i>	FBgn0038819	1,56	3,89E-07	163	<i>CG30280</i>	FBgn0050280	1,38	1,93E-04
119	<i>CG2157</i>	FBgn0030244	1,56	9,50E-12	164	<i>sim</i>	FBgn0004666	1,38	2,23E-02
120	<i>CG34248</i>	FBgn0085277	1,55	9,33E-07	165	<i>e</i>	FBgn0000527	1,38	4,26E-03
121	<i>Amt</i>	FBgn0038309	1,55	4,68E-03	166	<i>CG32170</i>	FBgn0052170	1,36	3,21E-06
122	<i>GstD8</i>	FBgn0010044	1,55	3,03E-05	167	<i>raw</i>	FBgn0003209	1,36	2,77E-12
123	<i>Hph</i>	FBgn0264785	1,55	1,82E-34	168	<i>Tg</i>	FBgn0031975	1,35	3,02E-03
124	<i>mnd</i>	FBgn0002778	1,54	3,39E-12	169	<i>Sik2</i>	FBgn0025625	1,35	6,69E-10
125		FBgn0263981	1,54	6,97E-03	170	<i>GstD9</i>	FBgn0038020	1,35	1,57E-08
126	<i>CG13868</i>	FBgn0034501	1,54	8,95E-20	171	<i>fu12</i>	FBgn0026718	1,35	1,56E-04
127	<i>mlt</i>	FBgn0265512	1,54	2,08E-11	172	<i>CG34265</i>	FBgn0085294	1,34	1,72E-03
128	<i>CG30281</i>	FBgn0050281	1,53	6,89E-06	173	<i>Lsd-1</i>	FBgn0039114	1,34	6,82E-08
129	<i>CG14661</i>	FBgn0037288	1,52	5,83E-05	174	<i>Ccp84Aa</i>	FBgn0004783	1,33	1,14E-02

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
175	<i>CG34232</i>	FBgn0085261	1,33	1,03E-06	220	<i>atk</i>	FBgn0036995	1,22	3,21E-02
176	<i>Socs36E</i>	FBgn0041184	1,32	1,35E-05	221	<i>trbl</i>	FBgn0028978	1,22	9,14E-16
177	<i>CAH2</i>	FBgn0027843	1,32	4,36E-07	222	<i>Ac78C</i>	FBgn0024150	1,22	4,11E-07
178	<i>CG13108</i>	FBgn0032100	1,32	8,60E-03	223	<i>GstE9</i>	FBgn0063491	1,21	1,21E-02
179		FBgn0052745	1,31	2,31E-02	224	<i>DIP-γ</i>	FBgn0039617	1,21	4,41E-02
180	<i>aay</i>	FBgn0023129	1,31	6,72E-31	225	<i>CG13060</i>	FBgn0036606	1,21	1,63E-02
181		FBgn0264857	1,31	3,44E-23	226	<i>CG13855</i>	FBgn0038960	1,21	2,24E-02
182	<i>CG14259</i>	FBgn0039483	1,31	1,25E-03	227	<i>CG31038</i>	FBgn0051038	1,21	3,68E-51
183	<i>NAAT1</i>	FBgn0029762	1,31	1,14E-03	228	<i>Ent3</i>	FBgn0036319	1,21	1,60E-04
184	<i>Atg1</i>	FBgn0260945	1,31	2,72E-08	229	<i>Cyp18a1</i>	FBgn0010383	1,21	2,41E-02
185	<i>CG5863</i>	FBgn0038507	1,30	1,43E-02	230	<i>CG43333</i>	FBgn0263038	1,21	1,81E-02
186	<i>CG33474</i>	FBgn0053474	1,30	7,12E-04	231	<i>CG11378</i>	FBgn0040364	1,20	1,31E-02
187	<i>CG3348</i>	FBgn0040609	1,30	1,16E-04	232	<i>Ccp84Ae</i>	FBgn0004779	1,20	2,47E-02
188		FBgn0265049	1,30	3,16E-02	233	<i>Hsp67Bc</i>	FBgn0001229	1,20	2,12E-02
189	<i>CG9505</i>	FBgn0031805	1,30	1,68E-05	234	<i>Mctp</i>	FBgn0034389	1,19	1,51E-15
190	<i>Rcd2</i>	FBgn0037012	1,29	1,45E-04	235	<i>Reg-5</i>	FBgn0015801	1,19	6,19E-03
191	<i>CG3009</i>	FBgn0029720	1,29	5,09E-05	236	<i>rau</i>	FBgn0031745	1,19	2,33E-03
192	<i>Swip-1</i>	FBgn0032731	1,29	1,70E-16	237	<i>CG15269</i>	FBgn0028878	1,19	5,53E-03
193	<i>b6</i>	FBgn0024897	1,28	1,54E-03	238		FBgn0264479	1,19	1,84E-02
194	<i>CG11550</i>	FBgn0039864	1,28	9,96E-06	239	<i>CG5928</i>	FBgn0029836	1,18	1,34E-02
195	<i>Cyp6a19</i>	FBgn0033979	1,28	2,83E-02	240	<i>scaf</i>	FBgn0033033	1,18	6,23E-06
196	<i>CG5065</i>	FBgn0034145	1,28	1,68E-05	241	<i>Cyp313a5</i>	FBgn0038005	1,17	9,54E-03
197	<i>CG13046</i>	FBgn0036595	1,27	1,95E-08	242	<i>CG44251</i>	FBgn0265186	1,17	2,60E-02
198	<i>CG13063</i>	FBgn0036601	1,27	5,69E-03	243	<i>Xrp1</i>	FBgn0261113	1,17	3,19E-22
199		FBgn0261613	1,27	6,21E-07	244	<i>MME1</i>	FBgn0031881	1,17	3,85E-06
200	<i>GstD3</i>	FBgn0010039	1,26	1,07E-04	245	<i>pes</i>	FBgn0031969	1,16	3,44E-13
201	<i>Cpr47Eb</i>	FBgn0033598	1,26	4,69E-06	246	<i>CG5945</i>	FBgn0032494	1,16	4,25E-02
202	<i>h</i>	FBgn0001168	1,26	8,81E-08	247	<i>Hmgcr</i>	FBgn0263782	1,16	2,99E-03
203	<i>CG14340</i>	FBgn0031302	1,25	2,69E-02	248	<i>CG13117</i>	FBgn0032140	1,16	1,94E-04
204	<i>wat</i>	FBgn0039620	1,25	1,17E-24	249	<i>Ets98B</i>	FBgn0005659	1,16	1,05E-15
205	<i>CG1882</i>	FBgn0033226	1,25	1,20E-09	250	<i>CG17260</i>	FBgn0031498	1,15	2,76E-10
206	<i>pyr</i>	FBgn0033649	1,25	7,46E-11	251	<i>CG13733</i>	FBgn0036729	1,15	3,76E-02
207	<i>nompA</i>	FBgn0016047	1,25	3,95E-05	252	<i>CG43134</i>	FBgn0262608	1,15	4,47E-02
208	<i>Cyp6a23</i>	FBgn0033978	1,25	3,74E-05	253	<i>Cpr51A</i>	FBgn0033942	1,14	1,47E-08
209	<i>CG1146</i>	FBgn0035346	1,25	3,17E-16	254	<i>CG13069</i>	FBgn0040798	1,14	8,94E-10
210	<i>bmm</i>	FBgn0036449	1,24	1,07E-04	255	<i>CG32572</i>	FBgn0052572	1,14	8,60E-03
211	<i>CG15630</i>	FBgn0031627	1,24	2,17E-05	256	<i>CG34115</i>	FBgn0083951	1,14	2,81E-02
212		FBgn0267276	1,24	3,90E-10	257	<i>moody</i>	FBgn0025631	1,13	2,77E-17
213	<i>CG32855</i>	FBgn0052855	1,24	8,66E-07	258	<i>Dad</i>	FBgn0020493	1,13	2,80E-15
214	<i>CG15649</i>	FBgn0034563	1,23	2,41E-02	259	<i>CG15564</i>	FBgn0039833	1,12	4,09E-02
215	<i>CG13223</i>	FBgn0033599	1,23	7,55E-03	260	<i>CG6330</i>	FBgn0039464	1,12	5,53E-04
216	<i>CecB</i>	FBgn0000278	1,23	9,54E-03	261	<i>C901</i>	FBgn0021742	1,12	1,81E-03
217	<i>CecC</i>	FBgn0000279	1,23	9,93E-03	262	<i>Sirup</i>	FBgn0031971	1,12	2,41E-04
218	<i>Ugt86Dd</i>	FBgn0040256	1,23	1,20E-02	263	<i>DNApol-ι</i>	FBgn0037554	1,11	1,97E-17
219	<i>CG11498</i>	FBgn0039749	1,23	5,52E-04	264	<i>CG17786</i>	FBgn0039167	1,11	1,51E-06

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
265	<i>CG12947</i>	FBgn0037753	1,11	1,05E-02	310	<i>stx</i>	FBgn0052676	1,01	4,71E-07
266	<i>Atf3</i>	FBgn0028550	1,11	3,74E-20	311	<i>CG10126</i>	FBgn0038088	1,01	4,30E-08
267	<i>cindr</i>	FBgn0027598	1,11	1,18E-12	312	<i>CG30284</i>	FBgn0050284	1,00	1,67E-02
268	<i>Cpr97Ea</i>	FBgn0039480	1,11	5,31E-04	313	<i>CG10089</i>	FBgn0036369	1,00	2,94E-03
269	<i>CG5853</i>	FBgn0032167	1,11	6,76E-03	314	<i><math>\alpha</math>-Est1</i>	FBgn0015568	1,00	9,27E-04
270	<i>CG11029</i>	FBgn0031735	1,11	2,71E-03	315		FBgn0015541	1,00	1,33E-04
271	<i>CG4702</i>	FBgn0037992	1,10	2,45E-02	316	<i>CG32103</i>	FBgn0052103	0,99	6,42E-10
272	<i>CG11854</i>	FBgn0039299	1,10	7,11E-08	317	<i>CG6040</i>	FBgn0038679	0,99	7,24E-23
273	<i>Ire1</i>	FBgn0261984	1,09	1,62E-16	318	<i>CG42675</i>	FBgn0261561	0,99	1,97E-04
274	<i>CG5639</i>	FBgn0039527	1,09	3,83E-05	319	<i>yellow-e</i>	FBgn0041711	0,99	1,85E-05
275	<i>CG13699</i>	FBgn0036781	1,09	3,07E-02	320	<i>CG10283</i>	FBgn0032681	0,99	1,22E-09
276	<i>iav</i>	FBgn0086693	1,09	3,94E-02	321	<i>ref(2)P</i>	FBgn0003231	0,99	9,87E-14
277	<i>Tig</i>	FBgn0011722	1,09	4,07E-05	322	<i>CG15096</i>	FBgn0034394	0,98	7,00E-03
278	<i>CG14518</i>	FBgn0039621	1,08	2,48E-02	323	<i>RhoGAP18B</i>	FBgn0261461	0,98	4,93E-10
279	<i>CG9184</i>	FBgn0035208	1,08	3,61E-02	324	<i>Obp56a</i>	FBgn0034468	0,98	1,00E-02
280	<i>csw</i>	FBgn0000382	1,07	3,15E-10	325	<i>CG31960</i>	FBgn0051960	0,98	3,80E-04
281	<i>CG5646</i>	FBgn0039525	1,07	6,65E-05	326	<i>shn</i>	FBgn0003396	0,98	1,25E-15
282	<i>lz</i>	FBgn0002576	1,07	1,82E-02	327	<i>CG42671</i>	FBgn0261553	0,98	4,88E-75
283	<i>spz</i>	FBgn0003495	1,07	1,89E-05	328	<i>laza</i>	FBgn0037163	0,98	2,70E-02
284	<i>Hsp70Ab</i>	FBgn0013276	1,07	3,60E-02	329	<i>Glut4EF</i>	FBgn0267336	0,97	8,00E-12
285	<i>CG2837</i>	FBgn0031646	1,07	1,00E-02	330	<i>Atet</i>	FBgn0020762	0,97	9,04E-08
286	<i>GstE8</i>	FBgn0063492	1,07	2,46E-02	331	<i>CG30015</i>	FBgn0050015	0,97	6,61E-24
287	<i>yellow-b</i>	FBgn0032601	1,07	1,99E-04	332	<i>CG6428</i>	FBgn0029689	0,97	2,96E-11
288	<i>CG11700</i>	FBgn0029856	1,06	2,89E-06	333		FBgn0267624	0,97	3,92E-02
289	<i>Pcyt1</i>	FBgn0041342	1,06	1,33E-10	334	<i>PGRP-LF</i>	FBgn0035977	0,96	2,81E-03
290	<i>Myo61F</i>	FBgn0010246	1,06	1,89E-04	335	<i>TwdIT</i>	FBgn0029170	0,96	1,33E-04
291	<i>CG17834</i>	FBgn0028394	1,05	1,67E-08	336	<i>MFS3</i>	FBgn0031307	0,96	6,33E-10
292	<i>ADPS</i>	FBgn0033983	1,05	6,70E-03	337	<i>t</i>	FBgn0086367	0,96	1,75E-02
293	<i>Rcd6</i>	FBgn0034530	1,05	5,63E-08	338	<i>CG9265</i>	FBgn0032910	0,96	1,85E-05
294	<i>CG34057</i>	FBgn0054057	1,05	6,18E-03	339	<i>CG42554</i>	FBgn0260756	0,95	2,29E-06
295	<i>scb</i>	FBgn0003328	1,05	7,17E-11	340	<i>CG18171</i>	FBgn0035262	0,95	6,31E-06
296	<i>CG6006</i>	FBgn0063649	1,04	1,34E-05	341	<i>CG17121</i>	FBgn0039043	0,95	2,94E-04
297	<i>c11.1</i>	FBgn0040236	1,04	9,55E-26	342	<i>Cpr49Ah</i>	FBgn0033731	0,95	4,33E-02
298	<i>CREG</i>	FBgn0025456	1,04	2,77E-02	343	<i>Jheh3</i>	FBgn0034406	0,95	2,46E-10
299	<i>CG9098</i>	FBgn0031762	1,04	3,64E-11	344	<i>Mco1</i>	FBgn0032116	0,94	8,61E-03
300	<i>CG13051</i>	FBgn0040799	1,04	3,25E-04	345	<i>CG31871</i>	FBgn0051871	0,94	4,68E-03
301	<i>PH4aMP</i>	FBgn0026190	1,03	1,67E-08	346	<i>CG14752</i>	FBgn0033307	0,94	4,52E-02
302	<i>CG10345</i>	FBgn0027562	1,03	4,12E-02	347	<i>drongo</i>	FBgn0020304	0,94	1,21E-11
303	<i>Dmtn</i>	FBgn0037443	1,03	1,56E-05	348	<i>CG31121</i>	FBgn0051121	0,94	3,96E-11
304	<i>Lsd-2</i>	FBgn0030608	1,02	6,33E-38	349	<i>CG31102</i>	FBgn0051102	0,93	1,73E-06
305	<i>CG4194</i>	FBgn0025627	1,02	3,12E-04	350	<i>Pcyt2</i>	FBgn0035231	0,93	3,47E-02
306	<i>Hr38</i>	FBgn0014859	1,02	2,58E-03	351	<i>CG9674</i>	FBgn0036663	0,92	9,73E-12
307	<i>CG3838</i>	FBgn0032130	1,02	8,92E-03	352	<i>smp-30</i>	FBgn0038257	0,92	3,10E-02
308	<i>Cda5</i>	FBgn0051973	1,02	1,36E-06	353	<i>CG14567</i>	FBgn0037126	0,92	1,73E-03
309	<i>Tsf3</i>	FBgn0034094	1,01	2,04E-07	354	<i>Rel</i>	FBgn0014018	0,92	1,75E-06

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
355	<i>ebd2</i>	FBgn0037076	0,92	1,96E-04	400	<i>LamC</i>	FBgn0010397	0,85	2,95E-06
356	<i>CG30089</i>	FBgn0050089	0,91	2,59E-09	401	<i>CG12065</i>	FBgn0030052	0,85	5,44E-07
357	<i>CG15279</i>	FBgn0028886	0,91	1,60E-08	402		FBgn0264511	0,85	5,93E-03
358	<i>CG6191</i>	FBgn0027581	0,91	3,27E-03	403	<i>CG31183</i>	FBgn0051183	0,85	4,23E-03
359	<i>CG16721</i>	FBgn0029820	0,91	1,79E-07	404	<i>ringer</i>	FBgn0266417	0,85	1,61E-02
360	<i>CG42588</i>	FBgn0260965	0,91	1,95E-04	405	<i>CG42684</i>	FBgn0261570	0,85	8,07E-12
361	<i>Lpin</i>	FBgn0263593	0,91	1,24E-12	406	<i>dos</i>	FBgn0016794	0,85	9,45E-13
362	<i>siz</i>	FBgn0026179	0,91	2,81E-23	407	<i>Tsp74F</i>	FBgn0036769	0,84	8,27E-05
363	<i>CG31689</i>	FBgn0031449	0,91	3,12E-04	408	<i>CG10737</i>	FBgn0034420	0,84	3,31E-03
364	<i>kay</i>	FBgn0001297	0,91	7,21E-08	409	<i><math>\alpha</math>-Est8</i>	FBgn0015576	0,84	2,52E-10
365	<i>CG9411</i>	FBgn0030569	0,90	4,21E-02	410	<i>dia</i>	FBgn0011202	0,84	4,33E-16
366	<i>CG15629</i>	FBgn0031630	0,90	6,20E-05	411	<i>unc-45</i>	FBgn0010812	0,84	2,26E-05
367	<i>Tsp42E1</i>	FBgn0033134	0,90	1,29E-05	412	<i>CG5004</i>	FBgn0260748	0,84	5,20E-34
368	<i>Tep4</i>	FBgn0041180	0,90	1,49E-10	413	<i>CG10175</i>	FBgn0039084	0,83	9,89E-03
369	<i>GlcT-1</i>	FBgn0067102	0,90	5,09E-07	414	<i>SPE</i>	FBgn0039102	0,83	1,24E-03
370	<i>CG4991</i>	FBgn0030817	0,89	7,94E-08	415	<i>Myo31DF</i>	FBgn0086347	0,83	4,05E-22
371	<i>CG15861</i>	FBgn0035084	0,89	2,00E-03	416	<i>CG7083</i>	FBgn0035877	0,83	3,45E-06
372	<i>per</i>	FBgn0003068	0,89	9,92E-03	417	<i>CG30069</i>	FBgn0050069	0,83	5,55E-05
373	<i>CG6511</i>	FBgn0035923	0,89	1,36E-04	418	<i>CG12971</i>	FBgn0037078	0,83	1,37E-02
374	<i>Wnt6</i>	FBgn0031902	0,89	7,69E-04	419	<i>CG13024</i>	FBgn0036665	0,83	6,89E-03
375	<i>CG11141</i>	FBgn0033177	0,89	4,10E-10	420	<i>Ude</i>	FBgn0039226	0,83	3,76E-04
376	<i>GstT3</i>	FBgn0031117	0,89	1,95E-03	421	<i>cher</i>	FBgn0014141	0,82	1,33E-11
377	<i>Cyp4c3</i>	FBgn0015032	0,88	5,79E-03	422	<i>CG32137</i>	FBgn0052137	0,82	9,44E-36
378	<i>CG18812</i>	FBgn0042135	0,88	1,18E-34	423	<i>Cat</i>	FBgn0000261	0,82	1,79E-04
379	<i>loco</i>	FBgn0020278	0,88	1,46E-07	424	<i>Kr-h1</i>	FBgn0266450	0,82	1,28E-02
380	<i>E(spl)m6-HLH</i>	FBgn0002733	0,88	1,23E-07	425	<i>Vha100-2</i>	FBgn0028670	0,82	1,26E-09
381	<i>Spn55B</i>	FBgn0028983	0,88	1,62E-04	426	<i>Frl</i>	FBgn0267795	0,82	2,74E-07
382	<i>ana1</i>	FBgn0262167	0,87	1,61E-05	427	<i>CG7720</i>	FBgn0038652	0,82	1,76E-03
383	<i>Tspo</i>	FBgn0031263	0,87	3,61E-07	428	<i>CG32091</i>	FBgn0052091	0,82	2,41E-05
384	<i><math>\alpha</math>-Est9</i>	FBgn0015577	0,87	3,02E-08	429	<i>Lk6</i>	FBgn0017581	0,82	4,97E-16
385	<i>CG3394</i>	FBgn0034999	0,87	8,67E-05	430	<i>CG3259</i>	FBgn0038221	0,82	1,44E-03
386	<i>l(2)gd1</i>	FBgn0261983	0,87	6,24E-25	431	<i>CHMP2B</i>	FBgn0035589	0,82	3,26E-07
387	<i>Klp98A</i>	FBgn0004387	0,86	1,05E-37	432	<i>Cht6</i>	FBgn0263132	0,81	7,36E-04
388	<i>by</i>	FBgn0000244	0,86	3,26E-04	433	<i>CG3277</i>	FBgn0031518	0,81	1,43E-02
389	<i>Irc</i>	FBgn0038465	0,86	1,73E-04	434	<i>Vinc</i>	FBgn0004397	0,81	2,08E-04
390	<i>sigmar</i>	FBgn0034894	0,86	5,34E-08	435	<i>CG8281</i>	FBgn0035824	0,81	1,19E-03
391	<i>CG6051</i>	FBgn0039492	0,86	4,48E-06	436	<i>l(3)02640</i>	FBgn0010786	0,80	9,70E-11
392	<i>CG8740</i>	FBgn0027585	0,86	9,67E-05	437	<i>Dyb</i>	FBgn0033739	0,80	1,82E-09
393	<i>CG5059</i>	FBgn0037007	0,86	1,30E-06	438	<i>CG12290</i>	FBgn0039419	0,80	2,98E-05
394	<i>CG34133</i>	FBgn0083969	0,86	2,56E-14	439	<i>Ubi-p5E</i>	FBgn0086558	0,80	3,31E-16
395	<i>CG42365</i>	FBgn0259711	0,86	1,02E-05	440	<i>CG9990</i>	FBgn0039594	0,80	1,30E-06
396	<i>sas</i>	FBgn0002306	0,86	2,70E-06	441	<i>CG5191</i>	FBgn0038803	0,80	7,31E-06
397	<i>vri</i>	FBgn0016076	0,85	2,61E-05	442	<i>CG17258</i>	FBgn0031496	0,80	2,28E-02
398	<i>hebe</i>	FBgn0033448	0,85	4,27E-09	443	<i>Cpr49Ag</i>	FBgn0033730	0,79	2,13E-05
399	<i>Acs1</i>	FBgn0263120	0,85	9,46E-06	444	<i>Culd</i>	FBgn0035880	0,79	4,87E-04

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
445	<i>milt</i>	FBgn0262872	0,79	2,85E-29	490	<i>CG5618</i>	FBgn0036975	0,73	2,06E-02
446	<i>kraken</i>	FBgn0020545	0,79	8,87E-04	491	<i>Pvf1</i>	FBgn0030964	0,73	1,07E-03
447	<i>mtg</i>	FBgn0260386	0,79	8,25E-06	492	<i>ced-6</i>	FBgn0029092	0,73	1,06E-02
448	<i>stac</i>	FBgn0266719	0,78	2,16E-11	493	<i>CG11275</i>	FBgn0034706	0,73	1,57E-03
449	<i>Jra</i>	FBgn0001291	0,78	5,55E-07	494	<i>CG30460</i>	FBgn0050460	0,72	2,71E-02
450	<i>CG10337</i>	FBgn0032805	0,78	8,29E-03	495	<i>CG4199</i>	FBgn0025628	0,72	6,67E-12
451	<i>Tpc1</i>	FBgn0037852	0,78		496	<i>Desat1</i>	FBgn0086687	0,72	3,76E-08
452	<i>Dhc62B</i>	FBgn0013811	0,78	4,00E-11	497	<i>Mob2</i>	FBgn0259481	0,72	3,17E-07
453		FBgn0013984	0,78	4,14E-04	498	<i>rdgB</i>	FBgn0003218	0,72	6,38E-05
454	<i>CG8321</i>	FBgn0033677	0,78	8,44E-03	499	<i>CBP</i>	FBgn0026144	0,72	8,48E-04
455	<i>wun</i>	FBgn0016078	0,78	4,40E-03	500	<i>SMSr</i>	FBgn0052380	0,72	2,10E-07
456	<i>Strica</i>	FBgn0033051	0,78	1,35E-02	501	<i>Smg6</i>	FBgn0039260	0,72	1,12E-05
457	<i>PGRP-SA</i>	FBgn0030310	0,78	4,25E-07	502	<i>sick</i>	FBgn0263873	0,71	3,37E-07
458	<i>dnr1</i>	FBgn0260866	0,78	4,74E-03	503	<i>Sp7</i>	FBgn0037515	0,71	8,49E-04
459	<i>CG11695</i>	FBgn0030316	0,78	1,78E-10	504	<i>Smg5</i>	FBgn0019890	0,71	3,93E-13
460	<i>bun</i>	FBgn0259176	0,77	4,59E-04	505	<i>Dok</i>	FBgn0029944	0,71	2,69E-09
461	<i>mthl5</i>	FBgn0037960	0,77	2,96E-05	506	<i>fabp</i>	FBgn0037913	0,70	1,41E-03
462	<i>CG11658</i>	FBgn0036196	0,77	7,21E-03	507	<i>CG13659</i>	FBgn0039319	0,70	4,61E-02
463	<i>fbl</i>	FBgn0011205	0,77	1,56E-04	508	<i>CG13049</i>	FBgn0036592	0,70	4,58E-02
464	<i>CG10082</i>	FBgn0034644	0,77	2,44E-06	509	<i>dl</i>	FBgn0260632	0,70	1,17E-05
465	<i>Hydr2</i>	FBgn0014906	0,76	1,28E-07	510	<i>CG2841</i>	FBgn0003159	0,70	1,80E-02
466	<i>CG10550</i>	FBgn0039321	0,76	5,05E-12	511	<i>Tep3</i>	FBgn0041181	0,70	3,60E-12
467	<i>Timp</i>	FBgn0025879	0,76	2,57E-02	512	<i>cnc</i>	FBgn0262975	0,69	1,58E-13
468	<i>CG5973</i>	FBgn0031914	0,76	1,73E-02	513	<i>Tnks</i>	FBgn0027508	0,69	3,20E-11
469	<i>sra</i>	FBgn0086370	0,76	9,85E-04	514	<i>Pvr</i>	FBgn0032006	0,69	3,46E-08
470	<i>CG2975</i>	FBgn0031468	0,76	1,08E-11	515	<i>Tsp42Ef</i>	FBgn0033127	0,69	4,22E-11
471	<i>CG18659</i>	FBgn0027561	0,75	4,81E-03	516	<i>CG17982</i>	FBgn0030006	0,69	4,56E-03
472	<i>Men</i>	FBgn0002719	0,75	2,05E-06	517	<i>CG12795</i>	FBgn0031535	0,69	2,81E-03
473	<i>CG4115</i>	FBgn0038017	0,75	3,86E-02	518	<i>ITP</i>	FBgn0035023	0,69	9,60E-05
474	<i>dgo</i>	FBgn0086898	0,75	2,56E-02	519	<i>AOX1</i>	FBgn0267408	0,69	6,59E-07
475	<i>Idgf2</i>	FBgn0020415	0,75	5,29E-13	520	<i>Hmgs</i>	FBgn0010611	0,69	5,64E-04
476	<i>Hipk</i>	FBgn0035142	0,75	3,58E-10	521	<i>spin</i>	FBgn0086676	0,69	7,52E-06
477	<i>cv-2</i>	FBgn0000395	0,75	3,13E-07	522	<i>CG14257</i>	FBgn0039479	0,69	1,37E-02
478	<i>Zip99C</i>	FBgn0039714	0,75	9,17E-04	523	<i>CG17111</i>	FBgn0039048	0,69	4,42E-02
479	<i>CG11655</i>	FBgn0030638	0,75	1,85E-04	524	<i>Nak</i>	FBgn0015772	0,69	2,07E-22
480	<i>REPTOR</i>	FBgn0039209	0,74	6,06E-06	525	<i>neur</i>	FBgn0002932	0,68	3,36E-03
481	<i>Hsp83</i>	FBgn0001233	0,74	8,27E-05	526	<i>Kank</i>	FBgn0027596	0,68	4,56E-03
482	<i>CG10407</i>	FBgn0038395	0,74	6,90E-03	527	<i>CG42246</i>	FBgn0259098	0,68	2,86E-02
483	<i>Hrs</i>	FBgn0031450	0,74	1,56E-04	528	<i>CD98hc</i>	FBgn0037533	0,68	7,91E-11
484	<i>GstT4</i>	FBgn0030484	0,74	3,41E-05	529	<i>Svil</i>	FBgn0266696	0,68	1,09E-19
485	<i>rhea</i>	FBgn0260442	0,74	1,77E-02	530	<i>CG13631</i>	FBgn0040600	0,68	1,66E-04
486	<i>pcs</i>	FBgn0033988	0,73	1,06E-02	531	<i>drd</i>	FBgn0260006	0,68	1,21E-03
487	<i>Swim</i>	FBgn0034709	0,73	1,67E-08	532	<i>CG15547</i>	FBgn0039809	0,68	1,49E-04
488	<i>Nckx30C</i>	FBgn0028704	0,73	2,46E-02	533	<i>CG7432</i>	FBgn0038727	0,68	1,89E-03
489	<i>Dif</i>	FBgn0011274	0,73	7,15E-04	534	<i>CG14401</i>	FBgn0032900	0,68	7,95E-04

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
535	<i>CG14207</i>	FBgn0031037	0,68		578	<i>CG17104</i>	FBgn0040496	0,63	2,45E-02
536	<i>Drat</i>	FBgn0033188	0,68	2,24E-03	579	<i>T48</i>	FBgn0004359	0,63	8,70E-08
537	<i>GEFmeso</i>	FBgn0050115	0,67	4,55E-03	580	<i>Unc-115a</i>	FBgn0051352	0,63	1,26E-09
538	<i>CG14907</i>	FBgn0038455	0,67	2,20E-02	581	<i>Irbp</i>	FBgn0011774	0,63	1,73E-09
539	<i>pyd</i>	FBgn0262614	0,67	6,65E-05	582	<i>CG14995</i>	FBgn0035497	0,63	1,48E-02
540	<i>CG11897</i>	FBgn0039644	0,67	6,95E-08	583	<i>Buffy</i>	FBgn0040491	0,63	9,29E-05
541	<i>Pi4KII<math>\alpha</math></i>	FBgn0037339	0,67	1,75E-03	584	<i>ntc</i>	FBgn0035461	0,63	8,23E-03
542	<i>Nop17l</i>	FBgn0033224	0,66	1,65E-13	585	<i>geko</i>	FBgn0020300	0,63	4,30E-05
543	<i>CG9821</i>	FBgn0037636	0,66	1,34E-07	586	<i>CG5835</i>	FBgn0038682	0,63	1,34E-03
544	<i>koi</i>	FBgn0265003	0,66	5,91E-03	587	<i>CrebB</i>	FBgn0265784	0,62	1,53E-19
545	<i>CalpB</i>	FBgn0025866	0,66	1,83E-21	588	<i>ZnT77C</i>	FBgn0037000	0,62	1,34E-02
546	<i>RapGAP1</i>	FBgn0264895	0,66	1,65E-07	589	<i>CG5521</i>	FBgn0039466	0,62	4,83E-05
547	<i>az2</i>	FBgn0025185	0,66	2,05E-05	590	<i>SCAP</i>	FBgn0033052	0,62	3,14E-09
548	<i>spartin</i>	FBgn0037265	0,66	5,28E-05	591	<i>osp</i>	FBgn0003016	0,62	6,32E-06
549	<i>CG31955</i>	FBgn0051955	0,66	1,62E-03	592	<i>CG3355</i>	FBgn0031619	0,62	4,74E-02
550	<i>mv</i>	FBgn0265988	0,66	4,09E-02	593	<i>ena</i>	FBgn0000578	0,62	1,69E-02
551	<i>pwn</i>	FBgn0003174	0,66	1,07E-04	594	<i>snz</i>	FBgn0029976	0,62	1,27E-05
552	<i>CG2604</i>	FBgn0037298	0,66	1,06E-04	595	<i>prel</i>	FBgn0033413	0,62	6,24E-11
553	<i>CG34325</i>	FBgn0085354	0,66	1,24E-04	596	<i>Tgi</i>	FBgn0036373	0,61	2,21E-02
554	<i>Rcd5</i>	FBgn0263832	0,66	3,83E-05	597	<i>verm</i>	FBgn0261341	0,61	8,43E-03
555	<i>CG12075</i>	FBgn0030065	0,66	3,93E-03	598	<i>CG43340</i>	FBgn0263077	0,61	1,68E-05
556	<i>pall</i>	FBgn0036005	0,66	2,34E-05	599	<i>Mvb12</i>	FBgn0030894	0,61	4,84E-05
557	<i>CG11448</i>	FBgn0024985	0,65	2,76E-04	600	<i>CG11050</i>	FBgn0031836	0,61	6,53E-04
558	<i>Corp</i>	FBgn0030028	0,65	1,46E-09	601	<i>CG44325</i>	FBgn0265413	0,61	1,84E-03
559	<i>crm</i>	FBgn0000376	0,65	4,15E-02	602	<i>ect</i>	FBgn0000451	0,61	1,14E-03
560	<i>CG17265</i>	FBgn0031488	0,65	2,32E-04	603	<i>CG34383</i>	FBgn0085412	0,61	1,27E-04
561	<i>CG14906</i>	FBgn0015351	0,65	5,92E-09	604	<i>mthl4</i>	FBgn0034219	0,61	6,43E-04
562	<i>CG45050</i>	FBgn0266410	0,65	7,61E-03	605	<i>PTPMT1</i>	FBgn0039111	0,61	8,76E-04
563	<i>EcR</i>	FBgn0000546	0,65	4,38E-03	606	<i>Acox57D-d</i>	FBgn0034629	0,60	2,74E-02
564	<i>CG4630</i>	FBgn0033809	0,65	3,20E-07	607	<i>Sox14</i>	FBgn0005612	0,60	3,20E-02
565	<i>CG42674</i>	FBgn0261556	0,65	2,24E-02	608	<i>Nf-YC</i>	FBgn0029905	0,60	7,19E-06
566	<i>CG14636</i>	FBgn0037217	0,65	2,00E-33	609	<i>Wdr62</i>	FBgn0031374	0,60	4,81E-07
567	<i>Hnf4</i>	FBgn0004914	0,65	2,77E-02	610	<i>CG10898</i>	FBgn0037911	0,60	1,62E-07
568	<i>CG7139</i>	FBgn0027532	0,64	1,23E-12	611	<i>CG1657</i>	FBgn0030286	0,60	4,37E-08
569	<i>Ubi-p63E</i>	FBgn0003943	0,64	2,15E-06	612	<i>Cyp28d2</i>	FBgn0031688	0,60	4,65E-02
570	<i>Atg17</i>	FBgn0037363	0,64	1,03E-06	613	<i>Syx16</i>	FBgn0031106	0,60	1,37E-05
571	<i>subdued</i>	FBgn0038721	0,64	8,01E-06	614	<i>GCC185</i>	FBgn0037979	0,60	2,22E-07
572	<i>CG6966</i>	FBgn0038286	0,64	9,10E-05	615	<i>Pect</i>	FBgn0032482	0,60	6,64E-10
573	<i>serp</i>	FBgn0260653	0,64	2,97E-08	616	<i>Syx8</i>	FBgn0036643	0,60	4,14E-04
574	<i>CG43759</i>	FBgn0264090	0,63	1,14E-02	617	<i>CG6749</i>	FBgn0036040	0,59	6,22E-03
575	<i>Gasp</i>	FBgn0026077	0,63	6,31E-08	618	<i>kibra</i>	FBgn0262127	0,59	1,00E-04
576	<i>CG13796</i>	FBgn0031939	0,63	1,40E-10	619	<i>Tep2</i>	FBgn0041182	0,59	1,42E-04
577	<i>gol</i>	FBgn0004919	0,63	4,59E-04	620	<i>Fbxl7</i>	FBgn0038385	0,59	9,63E-10

Tab. IV: Deregulierte Gene in Tracheen weiblicher Larven nach Tabakrauchexposition im Vergleich zur Luftexposition.

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2\text{-fold}$ <i>change</i>	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2\text{-fold}$ <i>change</i>	FDR
1	<i>Sgs3</i>	FBgn0003373	-3,70	2,16E-20	43	<i>CG8087</i>	FBgn0038241	-1,67	3,26E-03
2	<i>Sgs4</i>	FBgn0003374	-3,48	1,67E-16	44	<i>CG6012</i>	FBgn0032615	-1,66	1,37E-05
3	<i>Sgs8</i>	FBgn0003378	-3,09	6,74E-14	45	<i>Lgr1</i>	FBgn0016650	-1,65	1,68E-03
4	<i>CG7587</i>	FBgn0038523	-3,00	1,97E-10	46		FBgn0083006	-1,61	2,89E-03
5	<i>Sgs7</i>	FBgn0003377	-2,84	4,04E-10	47	<i>rn</i>	FBgn0267337	-1,61	1,89E-03
6	<i>Sgs5</i>	FBgn0003375	-2,82	1,26E-09	48	<i>pdm2</i>	FBgn0004394	-1,60	1,45E-03
7	<i>Sgs1</i>	FBgn0003372	-2,80	5,73E-12	49	<i>tsh</i>	FBgn0003866	-1,60	1,11E-04
8	<i>CG7606</i>	FBgn0040565	-2,52	1,24E-07	50	<i>CG6296</i>	FBgn0039470	-1,59	3,07E-04
9	<i>Tom</i>	FBgn0026320	-2,50	2,09E-09	51	<i>Muc68Ca</i>	FBgn0036181	-1,59	2,01E-03
10	<i>ana</i>	FBgn0011746	-2,40	6,59E-07	52	<i>Sox102F</i>	FBgn0039938	-1,58	1,67E-04
11	<i>CG15905</i>	FBgn0034462	-2,27	9,16E-06	53	<i>D</i>	FBgn0000411	-1,57	4,59E-03
12	<i>CG12310</i>	FBgn0036467	-2,23	1,32E-06	54	<i>CG31198</i>	FBgn0051198	-1,57	3,37E-03
13	<i>CG3649</i>	FBgn0034785	-2,18	3,83E-05	55	<i>CG7465</i>	FBgn0035551	-1,56	2,98E-05
14	<i>C15</i>	FBgn0004863	-2,11	1,86E-05	56	<i>tutl</i>	FBgn0010473	-1,56	3,79E-04
15	<i>Eig71Ee</i>	FBgn0004592	-2,11	4,42E-06	57	<i>mey</i>	FBgn0039851	-1,54	1,51E-03
16	<i>sca</i>	FBgn0003326	-2,10	9,59E-07	58	<i>eyg</i>	FBgn0000625	-1,54	2,76E-03
17	<i>CG8563</i>	FBgn0035777	-2,09	1,94E-05	59		FBgn0086057	-1,52	3,68E-04
18	<i>twz</i>	FBgn0034636	-2,09	1,45E-05	60	<i>LysD</i>	FBgn0004427	-1,52	6,41E-04
19	<i>dve</i>	FBgn0020307	-2,06	7,43E-07	61	<i>hoe2</i>	FBgn0031649	-1,51	2,66E-03
20	<i>CG15404</i>	FBgn0031512	-2,04	2,64E-05	62	<i>CG6283</i>	FBgn0039474	-1,51	1,55E-05
21	<i>CG11912</i>	FBgn0031248	-2,04	3,19E-05	63	<i>CG3812</i>	FBgn0030421	-1,51	4,95E-03
22	<i>CG34279</i>	FBgn0085308	-2,02	8,68E-05	64	<i>CG10472</i>	FBgn0035670	-1,50	2,00E-03
23	<i>Brd</i>	FBgn0000216	-2,01	3,21E-05	65		FBgn0000099	-1,50	3,08E-03
24	<i>Tsp</i>	FBgn0031850	-1,91	3,14E-10	66	<i>Him</i>	FBgn0030900	-1,49	9,31E-03
25	<i>Jon74E</i>	FBgn0023197	-1,90	7,65E-05	67		FBgn0267665	-1,49	5,38E-03
26	<i>CG42460</i>	FBgn0259950	-1,89	2,10E-04	68		FBgn0042650	-1,48	2,72E-03
27		FBgn0267793	-1,87	4,24E-04	69	<i>ImpE2</i>	FBgn0001254	-1,48	1,57E-03
28	<i>Wnt2</i>	FBgn0004360	-1,79	4,05E-04	70	<i>CG3868</i>	FBgn0036422	-1,48	1,84E-03
29	<i>ImpE1</i>	FBgn0001253	-1,79	2,02E-04	71	<i>Nek2</i>	FBgn0029970	-1,48	1,93E-05
30	<i>CG5866</i>	FBgn0038508	-1,78	3,80E-04	72	<i>en</i>	FBgn0000577	-1,47	5,09E-04
31	<i>vg</i>	FBgn0003975	-1,78	1,65E-04	73	<i>mag</i>	FBgn0036996	-1,47	2,40E-04
32	<i>ths</i>	FBgn0033652	-1,77	2,27E-04	74	<i>CG14314</i>	FBgn0038581	-1,47	1,03E-03
33	<i>nub</i>	FBgn0085424	-1,76	3,35E-04	75	<i>yellow-e3</i>	FBgn0038150	-1,47	1,95E-03
34	<i>CG13196</i>	FBgn0033645	-1,76	4,70E-09	76	<i>disco</i>	FBgn0000459	-1,47	3,46E-03
35	<i>LysE</i>	FBgn0004428	-1,76	7,35E-05	77	<i>htl</i>	FBgn0010389	-1,46	3,04E-04
36	<i>CG15212</i>	FBgn0040842	-1,71	1,18E-03	78	<i>CG33306</i>	FBgn0053306	-1,46	4,43E-03
37	<i>CG42500</i>	FBgn0260226	-1,70	6,90E-05	79	<i>CG44215</i>	FBgn0265146	-1,45	6,56E-03
38		FBgn0265422	-1,70	1,10E-03	80	<i>CG9259</i>	FBgn0032913	-1,45	7,40E-03
39	<i>Doc1</i>	FBgn0028789	-1,68	9,55E-04	81	<i>nab</i>	FBgn0259986	-1,44	2,97E-03
40	<i>tok</i>	FBgn0004885	-1,68	2,29E-04	82	<i>ato</i>	FBgn0010433	-1,44	7,94E-03
41	<i>Optix</i>	FBgn0025360	-1,68	1,30E-03	83	<i>CG11656</i>	FBgn0038109	-1,43	1,12E-03
42	<i>Doc2</i>	FBgn0035956	-1,67	1,88E-03	84	<i>CG31785</i>	FBgn0051785	-1,43	2,01E-03



	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
85	<i>CG15829</i>	FBgn0035743	-1,42	1,31E-03	130	<i>beat-11b</i>	FBgn0038494	-1,29	2,69E-02
86	<i>spheroide</i>	FBgn0030774	-1,42	1,19E-02	131	<i>CG42806</i>	FBgn0261975	-1,29	6,89E-06
87	<i>CG7912</i>	FBgn0039736	-1,41	3,62E-06	132	<i>CG6409</i>	FBgn0036106	-1,29	5,07E-03
88	<i>CG34330</i>	FBgn0085359	-1,41	9,79E-03	133	<i>FucTA</i>	FBgn0036485	-1,29	2,56E-02
89		FBgn0267111	-1,41	1,03E-02	134		FBgn0063127	-1,29	1,65E-02
90		FBgn0082919	-1,41	1,31E-02	135	<i>otk2</i>	FBgn0267728	-1,28	1,67E-07
91	<i>CG9902</i>	FBgn0030757	-1,41	9,32E-07	136	<i>CG33993</i>	FBgn0053993	-1,28	4,41E-03
92	<i>so</i>	FBgn0003460	-1,40	9,30E-04	137	<i>Spn47C</i>	FBgn0033574	-1,28	3,24E-03
93	<i>Scr</i>	FBgn0003339	-1,40	3,05E-03	138		FBgn0265691	-1,27	2,51E-02
94	<i>CG10505</i>	FBgn0034612	-1,40	1,19E-02	139	<i>Fancl</i>	FBgn0037781	-1,27	1,24E-02
95	<i>Sdr</i>	FBgn0038279	-1,39	2,78E-03	140	<i>ss</i>	FBgn0003513	-1,27	1,61E-02
96	<i>ara</i>	FBgn0015904	-1,39	2,77E-05	141	<i>shakB</i>	FBgn0085387	-1,27	2,13E-02
97		FBgn0086039	-1,39	5,28E-04	142	<i>CG42249</i>	FBgn0259101	-1,26	2,36E-02
98	<i>nord</i>	FBgn0050418	-1,39	2,35E-03	143	<i>CG13284</i>	FBgn0032614	-1,26	8,96E-03
99		FBgn0263380	-1,38	1,17E-02	144	<i>RhoGAP102A</i>	FBgn0259216	-1,26	1,94E-02
100	<i>ϑTry</i>	FBgn0011555	-1,38	1,55E-04	145	<i>CG31496</i>	FBgn0051496	-1,26	1,62E-02
101	<i>CG42741</i>	FBgn0261705	-1,38	8,25E-03	146	<i>Ctr1B</i>	FBgn0062412	-1,26	2,31E-02
102	<i>hh</i>	FBgn0004644	-1,38	1,89E-03	147	<i>ac</i>	FBgn0000022	-1,26	2,72E-02
103		FBgn0267723	-1,38	2,60E-02	148	<i>CG34305</i>	FBgn0085334	-1,25	8,59E-03
104		FBgn0052111	-1,38	1,00E-02	149	<i>klu</i>	FBgn0013469	-1,25	1,12E-02
105	<i>SmydA-9</i>	FBgn0030102	-1,38	7,65E-03	150	<i>Mal-A6</i>	FBgn0050360	-1,25	2,39E-02
106		FBgn0065064	-1,37	4,50E-05	151	<i>tio</i>	FBgn0028979	-1,24	2,14E-02
107	<i>Dr</i>	FBgn0000492	-1,37	7,23E-03	152	<i>CG18649</i>	FBgn0036469	-1,24	1,90E-02
108	<i>caup</i>	FBgn0015919	-1,36	2,79E-05	153	<i>miple1</i>	FBgn0027111	-1,24	9,08E-05
109	<i>CG7695</i>	FBgn0038631	-1,36	1,49E-02	154	<i>CG9413</i>	FBgn0030574	-1,24	8,27E-03
110	<i>CG9416</i>	FBgn0034438	-1,35	1,49E-03	155	<i>E(spl)m6-BFM</i>	FBgn0002632	-1,24	3,75E-02
111		FBgn0082974	-1,35	2,69E-03	156	<i>NimC2</i>	FBgn0028939	-1,23	4,95E-03
112	<i>CG12708</i>	FBgn0030666	-1,35	1,12E-03	157	<i>CG5326</i>	FBgn0038983	-1,23	4,81E-03
113	<i>CG31262</i>	FBgn0051262	-1,34	1,36E-02	158	<i>CG15890</i>	FBgn0030576	-1,23	1,65E-02
114	<i>CG3292</i>	FBgn0034710	-1,34	1,38E-02	159	<i>CG9040</i>	FBgn0036394	-1,23	3,06E-02
115	<i>CG4576</i>	FBgn0038366	-1,34	2,89E-03	160	<i>CG34227</i>	FBgn0085256	-1,23	6,50E-03
116	<i>Cpr11B</i>	FBgn0030398	-1,34	2,97E-04	161	<i>CG17211</i>	FBgn0032414	-1,23	5,11E-07
117	<i>Rgk3</i>	FBgn0085426	-1,34	9,94E-03	162	<i>CG4842</i>	FBgn0036620	-1,22	3,07E-02
118	<i>Nrt</i>	FBgn0004108	-1,33	3,25E-05	163	<i>CG11892</i>	FBgn0039313	-1,22	3,08E-02
119	<i>E(spl)mδ-HLH</i>	FBgn0002734	-1,32	8,61E-03	164	<i>Alk</i>	FBgn0040505	-1,22	2,29E-02
120		FBgn0263467	-1,32	1,53E-02	165	<i>CG32845</i>	FBgn0052845	-1,22	8,83E-04
121	<i>nyo</i>	FBgn0039852	-1,31	2,41E-04	166	<i>H15</i>	FBgn0016660	-1,22	2,76E-02
122	<i>sc</i>	FBgn0004170	-1,31	6,14E-06	167		FBgn0026169	-1,21	4,79E-02
123	<i>upd1</i>	FBgn0004956	-1,31	1,28E-02	168	<i>Mdr50</i>	FBgn0010241	-1,21	3,95E-02
124	<i>E(spl)m8-HLH</i>	FBgn0000591	-1,31	3,24E-03	169	<i>CG13737</i>	FBgn0036382	-1,21	3,87E-02
125		FBgn0267189	-1,31	2,48E-02	170	<i>Adat1</i>	FBgn0028658	-1,21	1,95E-04
126	<i>Cyp313a2</i>	FBgn0038006	-1,30	1,43E-02	171	<i>mid</i>	FBgn0261963	-1,21	3,24E-02
127		FBgn0266005	-1,30	1,29E-04	172	<i>Obp44a</i>	FBgn0033268	-1,21	2,47E-05
128	<i>CG12481</i>	FBgn0030542	-1,30	3,81E-03	173	<i>Amy-p</i>	FBgn0000079	-1,20	7,64E-03
129	<i>CG10182</i>	FBgn0039091	-1,29	2,82E-03	174	<i>CG9269</i>	FBgn0038161	-1,20	2,96E-02

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
175	<i>yellow-e2</i>	FBgn0038151	-1,20	9,43E-03	220	<i>GluRIIC</i>	FBgn0046113	-1,12	4,42E-02
176	<i>Oatp58Db</i>	FBgn0034715	-1,20	4,46E-02	221	<i>CG6700</i>	FBgn0032305	-1,12	1,25E-23
177	<i>CG42656</i>	FBgn0261508	-1,19	4,16E-02	222	<i>TpnC25D</i>	FBgn0031692	-1,12	4,55E-02
178	<i>CG15597</i>	FBgn0037420	-1,19	1,99E-02	223	<i>Pen</i>	FBgn0267727	-1,12	7,21E-08
179	<i>Cyp49a1</i>	FBgn0033524	-1,19	3,77E-02	224	<i>CG4766</i>	FBgn0027546	-1,12	3,35E-04
180	<i>otk</i>	FBgn0004839	-1,19	3,08E-04	225		FBgn0086601	-1,12	4,10E-02
181	<i>CG31601</i>	FBgn0051601	-1,19	3,63E-02	226	<i>CG4465</i>	FBgn0038750	-1,11	2,13E-02
182	<i>ab</i>	FBgn0264442	-1,19	4,43E-03	227		FBgn0086048	-1,11	4,37E-02
183	<i>CG5804</i>	FBgn0035926	-1,19	7,25E-04	228	<i>dac</i>	FBgn0005677	-1,11	3,42E-02
184	<i>toe</i>	FBgn0036285	-1,19	2,84E-02	229	<i>FucTC</i>	FBgn0044872	-1,10	3,63E-02
185		FBgn0266211	-1,18	4,40E-02	230		FBgn0083989	-1,10	1,80E-02
186	<i>CG7916</i>	FBgn0028534	-1,18	2,95E-02	231	<i>fd96Ca</i>	FBgn0004897	-1,10	4,45E-02
187		FBgn0052207	-1,18	2,18E-02	232	<i>cuff</i>	FBgn0260932	-1,09	3,87E-02
188	<i>ouib</i>	FBgn0037618	-1,18	1,07E-02	233	<i>bab2</i>	FBgn0025525	-1,09	4,54E-03
189	<i>Msh6</i>	FBgn0036486	-1,18	1,68E-05	234		FBgn0083001	-1,09	2,24E-02
190		FBgn0004426	-1,17	2,43E-04	235	<i>CG10918</i>	FBgn0031178	-1,09	4,17E-02
191	<i>gsb</i>	FBgn0001148	-1,17	4,66E-02	236	<i>pxb</i>	FBgn0053207	-1,09	4,14E-05
192		FBgn0086664	-1,16	3,42E-02	237	<i>aurB</i>	FBgn0024227	-1,08	8,25E-06
193	<i>CG8641</i>	FBgn0035733	-1,16	4,61E-02	238	<i>CG33521</i>	FBgn0250819	-1,08	3,99E-02
194	<i>CG13403</i>	FBgn0030544	-1,16	2,41E-02	239	<i>CG31125</i>	FBgn0051125	-1,08	1,20E-02
195		FBgn0260002	-1,16	3,16E-02	240	<i>CG7352</i>	FBgn0037581	-1,08	1,84E-02
196		FBgn0015543	-1,16	2,60E-02	241	<i>Reck</i>	FBgn0036463	-1,07	1,92E-02
197	<i>CG10513</i>	FBgn0039311	-1,16	4,25E-02	242	<i>CG9759</i>	FBgn0038160	-1,07	1,14E-04
198	<i>Tsp42Eh</i>	FBgn0033129	-1,16	3,59E-02	243		FBgn0004009	-1,07	8,81E-06
199		FBgn0086672	-1,16	1,89E-02	244	<i>ppk29</i>	FBgn0034965	-1,07	2,49E-03
200	<i>rdo</i>	FBgn0243486	-1,16	2,27E-02	245	<i>Dhit</i>	FBgn0028743	-1,07	2,86E-02
201	<i>sqd</i>	FBgn0259678	-1,16	3,51E-02	246	<i>CG3630</i>	FBgn0023540	-1,06	1,89E-02
202	<i>Doc3</i>	FBgn0035954	-1,16	3,85E-02	247	<i>Mal-A5</i>	FBgn0050359	-1,06	4,84E-02
203	<i>Mal-A1</i>	FBgn0002570	-1,15	1,55E-02	248	<i>pre-lola-G</i>	FBgn0264817	-1,05	3,20E-02
204	<i>sals</i>	FBgn0051374	-1,15	1,28E-02	249	<i>Cyp6g1</i>	FBgn0025454	-1,05	4,01E-02
205	$\alpha$ Try	FBgn0003863	-1,15	3,50E-03	250	<i>rec</i>	FBgn0003227	-1,05	2,46E-06
206	<i>CG32633</i>	FBgn0052633	-1,15	8,03E-03	251	<i>Kebab</i>	FBgn0028952	-1,05	5,83E-03
207	<i>Dll</i>	FBgn0000157	-1,14	7,40E-03	252		FBgn0051781	-1,05	4,00E-02
208	<i>Cyp310a1</i>	FBgn0032693	-1,14	4,64E-02	253	<i>Ance-3</i>	FBgn0032536	-1,04	4,15E-02
209	<i>TfAP-2</i>	FBgn0261953	-1,14	3,12E-02	254	<i>Lcp65Aa</i>	FBgn0020645	-1,04	1,67E-02
210	<i>Mal-A8</i>	FBgn0033297	-1,14	4,72E-03	255	<i>Pabp2</i>	FBgn0005648	-1,04	2,39E-16
211	<i>CG15247</i>	FBgn0030156	-1,14	4,72E-02	256		FBgn0029128	-1,04	1,10E-07
212	<i>CG9757</i>	FBgn0003060	-1,14	4,06E-02	257	<i>twi</i>	FBgn0003900	-1,04	1,72E-02
213	<i>Cyp4ac3</i>	FBgn0031695	-1,14	4,61E-02	258	<i>CG14109</i>	FBgn0036364	-1,03	4,12E-02
214		FBgn0082945	-1,13	4,75E-02	259	<i>LBR</i>	FBgn0034657	-1,03	5,90E-15
215	<i>Gld</i>	FBgn0001112	-1,13	4,17E-02	260	<i>Awh</i>	FBgn0013751	-1,03	1,34E-02
216	<i>ng3</i>	FBgn0010295	-1,13	4,33E-02	261		FBgn0086671	-1,03	4,44E-02
217	<i>bib</i>	FBgn0000180	-1,13	7,12E-07	262	<i>sr</i>	FBgn0003499	-1,03	1,97E-02
218	<i>CG5597</i>	FBgn0034920	-1,13	4,60E-02	263	<i>CG14688</i>	FBgn0037819	-1,02	4,49E-02
219	<i>CG7409</i>	FBgn0035817	-1,12	3,37E-02	264	<i>Cdk2</i>	FBgn0004107	-1,02	2,90E-10

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
265		FBgn0083015	-1,02	8,78E-03	310		FBgn0013688	-0,92	7,20E-03
266	<i>CG31233</i>	FBgn0051233	-1,02	1,86E-02	311	<i>msb1l</i>	FBgn0027949	-0,92	1,15E-02
267	<i>comt</i>	FBgn0000346	-1,02	4,33E-03	312	<i>CG12288</i>	FBgn0032620	-0,92	1,64E-03
268	<i>CG9837</i>	FBgn0037635	-1,02	3,87E-02	313	<i>CG32248</i>	FBgn0052248	-0,92	1,35E-03
269	<i>Nep1</i>	FBgn0029843	-1,01	9,37E-04	314	<i>Spc25</i>	FBgn0087021	-0,92	1,39E-02
270		FBgn0263617	-1,01	1,17E-03	315	<i>Pif1</i>	FBgn0031540	-0,91	1,20E-13
271	<i>CG7173</i>	FBgn0037099	-1,01	4,65E-02	316	<i>fzy</i>	FBgn0001086	-0,91	1,98E-04
272	<i>nesd</i>	FBgn0032848	-1,01	1,39E-06	317	<i>TwdIX</i>	FBgn0052571	-0,91	2,31E-02
273		FBgn0051044	-1,01	6,98E-03	318	<i>CycB</i>	FBgn0000405	-0,91	2,03E-04
274		FBgn0264821	-1,00	3,20E-04	319	<i>sls</i>	FBgn0086906	-0,90	3,18E-02
275	<i>CG18135</i>	FBgn0036837	-1,00	1,23E-07	320	<i>Zmynd10</i>	FBgn0266709	-0,88	1,31E-02
276	$\epsilon$ Try	FBgn0010425	-1,00	1,25E-06	321	<i>CG13492</i>	FBgn0034662	-0,88	3,95E-02
277	<i>CG17075</i>	FBgn0031239	-1,00	2,33E-02	322	<i>CG6295</i>	FBgn0039471	-0,88	2,12E-02
278	<i>LysB</i>	FBgn0004425	-1,00	7,07E-03	323	<i>CG10912</i>	FBgn0034296	-0,88	3,42E-02
279	<i>Cdk1</i>	FBgn0004106	-1,00	1,83E-06	324	<i>pav</i>	FBgn0011692	-0,87	4,70E-04
280	<i>NaPi-III</i>	FBgn0260795	-0,99	1,64E-02	325	<i>hoip</i>	FBgn0015393	-0,87	7,57E-08
281	<i>Ac3</i>	FBgn0023416	-0,99	4,41E-02	326	<i>CG31778</i>	FBgn0051778	-0,87	2,81E-02
282	<i>pdm3</i>	FBgn0261588	-0,99	2,87E-03	327	<i>CG15561</i>	FBgn0039829	-0,86	1,66E-11
283	<i>Jon99Ci</i>	FBgn0003358	-0,99	1,99E-02	328	<i>kuk</i>	FBgn0038476	-0,86	1,76E-05
284	<i>Scp2</i>	FBgn0020907	-0,98	2,79E-02	329	<i>CG9123</i>	FBgn0030629	-0,86	1,79E-03
285	<i>Dh31-R</i>	FBgn0052843	-0,98	4,41E-02	330	<i>CG32373</i>	FBgn0052373	-0,86	2,31E-02
286	<i>cid</i>	FBgn0040477	-0,98	2,17E-02	331	<i>CG5724</i>	FBgn0038082	-0,86	1,87E-02
287	<i>CG43980</i>	FBgn0264711	-0,98	7,29E-04	332	<i>CG13690</i>	FBgn0031252	-0,85	2,82E-06
288	<i>CG42514</i>	FBgn0260388	-0,97	9,54E-03	333	<i>feo</i>	FBgn0030241	-0,84	2,77E-04
289	<i>NT5E-2</i>	FBgn0050104	-0,97	9,94E-03	334	<i>CG10026</i>	FBgn0032785	-0,84	2,94E-02
290		FBgn0262945	-0,96	1,40E-02	335	<i>Cks30A</i>	FBgn0010314	-0,84	1,55E-02
291	<i>CG10581</i>	FBgn0037046	-0,96	1,21E-02	336	<i>mael</i>	FBgn0016034	-0,84	2,86E-02
292	<i>Ten-a</i>	FBgn0267001	-0,96	2,88E-03	337	<i>CG14419</i>	FBgn0029639	-0,84	1,91E-02
293	<i>fax</i>	FBgn0014163	-0,95	2,30E-04	338	<i>CG14275</i>	FBgn0032022	-0,84	1,40E-02
294	<i>mms4</i>	FBgn0033549	-0,95	9,18E-03	339	<i>Kmn1</i>	FBgn0027259	-0,84	1,40E-02
295	<i>CG43729</i>	FBgn0263980	-0,95	2,42E-02	340	<i>CG15473</i>	FBgn0029719	-0,84	3,86E-03
296	<i>CG34008</i>	FBgn0054008	-0,95	6,60E-03	341	<i>asp</i>	FBgn0000140	-0,84	8,01E-03
297	<i>Klp67A</i>	FBgn0004379	-0,95	1,16E-03	342		FBgn0020546	-0,83	2,86E-02
298	<i>drm</i>	FBgn0024244	-0,95	3,97E-12	343	<i>Grip71</i>	FBgn0032705	-0,83	1,56E-13
299	<i>kcc</i>	FBgn0261794	-0,95	9,93E-04	344		FBgn0266167	-0,83	3,79E-02
300	<i>Ir51b</i>	FBgn0050081	-0,94	5,62E-03	345		FBgn0267495	-0,83	4,08E-06
301		FBgn0020556	-0,94	1,94E-02	346	<i>CG3823</i>	FBgn0029863	-0,82	4,00E-03
302	<i>Sema2b</i>	FBgn0264273	-0,94	1,47E-02	347	<i>CycA</i>	FBgn0000404	-0,82	3,36E-04
303	<i>shf</i>	FBgn0003390	-0,94	1,13E-03	348	<i>HEATR2</i>	FBgn0051320	-0,82	1,23E-02
304	<i>CG9752</i>	FBgn0034614	-0,94	1,94E-06	349	<i>PCNA</i>	FBgn0005655	-0,82	2,99E-07
305	<i>brk</i>	FBgn0024250	-0,93	1,00E-06	350	<i>odd</i>	FBgn0002985	-0,81	9,45E-04
306	<i>B-H2</i>	FBgn0004854	-0,93	4,73E-02	351	<i>CG31712</i>	FBgn0051712	-0,80	1,87E-07
307	<i>ZC3H3</i>	FBgn0035900	-0,93	8,10E-11	352	<i>msd5</i>	FBgn0035210	-0,80	1,40E-03
308	<i>aurA</i>	FBgn0000147	-0,92	3,31E-03	353		FBgn0046696	-0,80	9,63E-03
309	<i>TotC</i>	FBgn0044812	-0,92	1,67E-02	398	<i>Tollo</i>	FBgn0029114	-0,70	8,19E-03

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
355	<i>CRMP</i>	FBgn0023023	-0,79	2,11E-04	400	<i>HmgD</i>	FBgn0004362	-0,70	1,70E-10
356	<i>Ski6</i>	FBgn0032487	-0,79	1,87E-08	401	<i>Fs(2)Ket</i>	FBgn0262743	-0,70	7,50E-03
357	<i>Tet</i>	FBgn0263392	-0,79	1,29E-05	402	<i>insv</i>	FBgn0031434	-0,70	3,37E-02
358	<i>CG13023</i>	FBgn0036677	-0,79	2,45E-02	403	<i>CG33213</i>	FBgn0053213	-0,70	1,40E-02
359		FBgn0263659	-0,79	2,12E-02	404	<i>CG13096</i>	FBgn0032050	-0,69	3,42E-07
360	<i>hid</i>	FBgn0003997	-0,79	1,30E-02	405	<i>CG6752</i>	FBgn0038296	-0,69	2,76E-04
361	<i>miple2</i>	FBgn0029002	-0,77	2,24E-09	406	<i>WRNexo</i>	FBgn0038608	-0,69	8,08E-03
362	<i>Rbp1-like</i>	FBgn0030479	-0,77	1,24E-09	407	<i>Ercc1</i>	FBgn0028434	-0,69	3,17E-02
363	<i>ninaD</i>	FBgn0002939	-0,76	2,26E-02	408	<i>CG6136</i>	FBgn0038332	-0,69	2,54E-02
364	<i>CG5235</i>	FBgn0036565	-0,76	2,24E-02	409	<i>CG7974</i>	FBgn0035254	-0,69	1,54E-04
365	<i>CG3679</i>	FBgn0027521	-0,75	2,14E-03	410	<i>dah</i>	FBgn0015926	-0,69	3,26E-02
366	<i>CG14223</i>	FBgn0031053	-0,75	7,66E-03	411	<i>CG11555</i>	FBgn0086856	-0,68	8,41E-04
367	<i>CG8173</i>	FBgn0030864	-0,75	4,73E-03	412	<i>Rfc3</i>	FBgn0032244	-0,68	1,74E-04
368	<i>Mcm10</i>	FBgn0032929	-0,75	4,19E-04	413	<i>eg</i>	FBgn0000560	-0,68	8,46E-03
369	<i>icl</i>	FBgn0029079	-0,75	6,08E-05	414	<i>CG15535</i>	FBgn0039764	-0,68	1,74E-02
370	<i>CG5589</i>	FBgn0036754	-0,75	1,58E-11	415	<i>CG44838</i>	FBgn0266101	-0,68	2,19E-03
371	<i>CG12909</i>	FBgn0033507	-0,75	2,60E-04	416	<i>sli</i>	FBgn0264089	-0,68	8,86E-03
372	<i>mus81</i>	FBgn0040347	-0,74	3,03E-04	417	<i>Lhr</i>	FBgn0034217	-0,67	2,47E-03
373	<i>Mt2</i>	FBgn0028707	-0,74	1,05E-03	418	<i>wls</i>	FBgn0036141	-0,67	3,19E-04
374	<i>DNApol-<math>\alpha</math>60</i>	FBgn0259676	-0,74	9,24E-06	419	<i>CG31950</i>	FBgn0051950	-0,67	9,53E-03
375	<i>CG8924</i>	FBgn0030710	-0,74	1,22E-03	420	<i>Ag5r2</i>	FBgn0020508	-0,66	2,04E-02
376	<i>Nnf1a</i>	FBgn0034523	-0,74	2,81E-02	421	<i>sip2</i>	FBgn0031878	-0,66	8,37E-03
377	<i>Fen1</i>	FBgn0025832	-0,74	1,88E-09	422	<i>Sirt6</i>	FBgn0037802	-0,66	4,40E-03
378	<i>thr</i>	FBgn0003701	-0,74	1,35E-02	423	<i>Drep1</i>	FBgn0024732	-0,66	4,44E-08
379		FBgn0262109	-0,74	1,34E-05	424	<i>mab-21</i>	FBgn0029003	-0,66	1,36E-02
380	<i>Gs1</i>	FBgn0001142	-0,73	2,85E-02	425	<i>Sdhaf3</i>	FBgn0038437	-0,66	5,06E-04
381	<i>Amy-d</i>	FBgn0000078	-0,73	3,86E-02	426	<i>E(spl)m7-HLH</i>	FBgn0002633	-0,66	2,91E-02
382	<i>CG34371</i>	FBgn0085400	-0,73	4,56E-03	427	<i>CG13484</i>	FBgn0036406	-0,66	1,46E-03
383	<i>CG13639</i>	FBgn0265266	-0,73	5,56E-04	428	<i>dnt</i>	FBgn0024245	-0,66	3,00E-02
384	<i>CG11911</i>	FBgn0031249	-0,73	1,31E-02	429	<i>CG3420</i>	FBgn0033100	-0,65	4,28E-07
385	<i>snRNP-U1-70K</i>	FBgn0016978	-0,72	3,69E-11	430	<i>CG43295</i>	FBgn0262987	-0,65	3,02E-02
386	<i>Lam</i>	FBgn0002525	-0,72	3,66E-10	431	<i>CG11920</i>	FBgn0039274	-0,65	1,46E-03
387	<i>Zip89B</i>	FBgn0038412	-0,72	1,70E-02	432	<i>Chd3</i>	FBgn0023395	-0,65	2,19E-02
388	<i>PNUTS</i>	FBgn0053526	-0,72	7,19E-10	433	<i>Sas10</i>	FBgn0029755	-0,65	2,35E-06
389	<i>Ak6</i>	FBgn0033754	-0,72	6,49E-05	434	<i>CG15387</i>	FBgn0031403	-0,65	8,83E-04
390	<i>Chrac-16</i>	FBgn0043001	-0,72	1,08E-04	435	<i>CG6767</i>	FBgn0036030	-0,65	3,90E-08
391	<i>d</i>	FBgn0262029	-0,72	4,94E-04	436	<i>Naa40</i>	FBgn0039687	-0,65	8,41E-04
392	<i>CG6044</i>	FBgn0034725	-0,72	2,13E-03	437	<i>mira</i>	FBgn0021776	-0,65	4,84E-02
393	<i>CG7137</i>	FBgn0034422	-0,71	4,11E-07	438	<i>CG11837</i>	FBgn0039627	-0,65	1,02E-05
394	<i>CG11360</i>	FBgn0039920	-0,71	1,53E-02	439	<i>wech</i>	FBgn0259745	-0,65	1,80E-03
395	<i>CG2199</i>	FBgn0035213	-0,71	2,66E-07	440	<i>CG43901</i>	FBgn0264502	-0,65	1,64E-03
396		FBgn0266046	-0,71	4,76E-02	441	<i>esn</i>	FBgn0263934	-0,64	3,83E-02
397	<i>CG15168</i>	FBgn0032732	-0,71	2,87E-05	442	<i>Surf6</i>	FBgn0038746	-0,64	2,34E-05
398	<i>Tollo</i>	FBgn0029114	-0,70	8,19E-03	443	<i>polo</i>	FBgn0003124	-0,64	1,69E-02
399	<i>Oseg1</i>	FBgn0265102	-0,70	2,64E-02	444	<i>CG4619</i>	FBgn0032166	-0,64	9,55E-04

	Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR		Gensymbol	Ensembl-ID	$\log_2$ -fold change	FDR
<b>445</b>	<i>Sep5</i>	FBgn0026361	-0,64	2,82E-02	<b>463</b>	<i>Ote</i>	FBgn0266420	-0,62	6,44E-03
<b>446</b>	<i>Muc55B</i>	FBgn0034294	-0,64	3,33E-02	<b>464</b>	<i>CG8097</i>	FBgn0030660	-0,62	1,20E-02
<b>447</b>	<i>ft</i>	FBgn0001075	-0,64	1,40E-03	<b>465</b>	<i>CG14544</i>	FBgn0039407	-0,61	4,97E-04
<b>448</b>	<i>CG14882</i>	FBgn0038429	-0,64	5,09E-04	<b>466</b>	<i>CG32409</i>	FBgn0052409	-0,61	9,53E-05
<b>449</b>		FBgn0083027	-0,64	1,80E-03	<b>467</b>	<i>CG12259</i>	FBgn0039557	-0,61	3,72E-05
<b>450</b>	<i>squ</i>	FBgn0267347	-0,63	1,05E-02	<b>468</b>	<i>nemy</i>	FBgn0261673	-0,61	4,32E-02
<b>451</b>	<i>barr</i>	FBgn0014127	-0,63	1,47E-02	<b>469</b>	<i>scra</i>	FBgn0261385	-0,61	4,10E-03
<b>452</b>	<i>CG11076</i>	FBgn0039929	-0,63	2,30E-06	<b>470</b>	<i>mad2</i>	FBgn0035640	-0,61	2,79E-02
<b>453</b>	<i>Hs2st</i>	FBgn0024230	-0,63	6,35E-07	<b>471</b>	<i>msd1</i>	FBgn0035209	-0,61	3,63E-02
<b>454</b>	<i>Oseg4</i>	FBgn0035264	-0,63	1,02E-03	<b>472</b>		FBgn0000497	-0,61	1,27E-02
<b>455</b>	<i>ana3</i>	FBgn0266111	-0,63	3,97E-02	<b>473</b>	<i>DNAPol-ε58</i>	FBgn0035644	-0,61	2,60E-03
<b>456</b>	<i>CG1142</i>	FBgn0037504	-0,62	2,85E-13	<b>474</b>	<i>Cap-D2</i>	FBgn0039680	-0,60	2,29E-02
<b>457</b>	<i>CG8177</i>	FBgn0036043	-0,62	1,14E-05	<b>475</b>	<i>stan</i>	FBgn0024836	-0,60	6,25E-03
<b>458</b>	<i>esg</i>	FBgn0001981	-0,62	1,64E-03	<b>476</b>	<i>Mip</i>	FBgn0036713	-0,60	3,67E-02
<b>459</b>	<i>Dbp73D</i>	FBgn0004556	-0,62	9,26E-04	<b>477</b>	<i>vito</i>	FBgn0052418	-0,60	9,31E-06
<b>460</b>		FBgn0250876	-0,62	2,70E-10	<b>478</b>	<i>RnrS</i>	FBgn0011704	-0,59	3,22E-07
<b>461</b>	<i>NKCC</i>	FBgn0051547	-0,62	3,51E-02	<b>479</b>	<i>sob</i>	FBgn0004892	-0,59	2,29E-04
<b>462</b>	<i>sofe</i>	FBgn0030242	-0,62	4,06E-02	<b>480</b>	<i>Smu1</i>	FBgn0038666	-0,59	2,05E-07

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer und meiner Betreuerin nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Ich versichere, dass die Arbeit bisher nicht schon an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat, veröffentlicht worden ist oder zur Veröffentlichung eingereicht wurde. Zudem sichere ich zu, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist und mir kein akademischer Grad entzogen worden ist.

Neumünster, der 26. April 2020

.....  
(Karolina-Theresa Sirocko)

## Danksagung

Ein jeder weiß, dass in stressvollen Zeiten Unterstützung benötigt wird, um diese zu überstehen. Die Zeit während meiner Promotion war bestimmt nicht immer einfach, jedoch verdanke ich eine Vielzahl an Leuten, dass diese vor allem mit sehr vielen schönen Momenten gesegnet war, indem sie mich auf jedmögliche Art und Weise unterstützt hatten.

Meinen Dank gilt

- natürlich in erster Linie Prof. Dr. Thomas Roeder und Prof. Dr. Holger Heine, die sich dafür bereit erklärt haben, die Begutachtung der vorliegenden Arbeit vorzunehmen.
- Prof. Dr. Heinz Fehrenbach, der für mich von Anfang bis Ende ein Fels in der Brandung gewesen ist.
- meiner Mentorin und Chefin, „Herrin der Fliegen“ Dr. Christina Wagner, die mich in ihrer Nachwuchsforschungsgruppe aufgenommen und mir *Drosophila* als wirklich genialen und faszinierenden Modellorganismus nähergebracht hat.
- meiner Co-Mentorin Prof. Dr. Susanne Krauss-Etschmann, die mein Projekt mit vielen guten Ideen vorangetrieben hat.
- der „großen Fliege“ Dr. Karin Uliczka, die mir während der gesamten Zeit am Forschungszentrum nicht nur mit viel Rat, sondern auch mit viel Tat beiseite stand und die viel Zeit und Mühe in die Korrektur dieser Arbeit investiert hat.
- der anderen „großen Fliege“ Dr. Stephanie Papenmeier, die viele Tipps und Tricks nicht nur in Sachen *Drosophila* parat gehabt hat.
- der „kleinen Fliege“ Beate Höschler, die sich nicht nur als großartige und engagierte TA profilierte, sondern sich auch als gutherzig und großzügig erwies und zu jedem erdenklichen Zeitpunkt (jedem!) und zu jeder Thematik (jeder!) immer zwei offene Ohren für mich gehabt hat.
- Dr. Johanna Ehlers und Dr. Hanna Angstmann, die nicht nur mit mir auf (m)einer Hochzeit getanzt haben, sondern die mir während dieser Zeit nicht nur als Kollegen und Mitleidensgenossen, sondern auch als Freunde sehr ans Herz gewachsen sind. Zusammen sind wir durch dick und dünn gegangen.
- den „Mäusen“ Franziska Beyersdorf, Linda Lang, Patricia Prilla, Juliane Artelt, Rebecca Bodenstein-Sgró, Dr. Alexandra Schröder, Dr. Sina Webering, Dr. Lars Lunding, Dr. Christina Vock und Dr. Michael Wegmann. Für die Teilung der Labore, für die vielen, wunderbaren Gespräche zur Mittagsstunde in einer (wirklich!) viel zu kleinen Küche, für herrliche Grillaktionen und einzigartige Ausflügen – einfach für eine wundervolle Gemeinschaft.

- meinen „*smoke-buddies*“ Janin Braun und Martin Wolff, die vieles an der Rauchmaschine möglich gemacht haben.
- Prof. Dr. Jochen Kruppa und Dr. Viola Dreyer, die mir bei der Statistik geholfen haben.
- meinen Eltern, die mir wirklich alles ermöglicht haben. Dir mir immer Rückendeckung geben oder auch, wenn erforderlich, Gegenwind. Die mich mit Tee und Leckereien versorgt haben. Die mich motivieren. Und die stolz auf mich sind.
- meiner Oma, der ich immer alles anvertrauen konnte und die immer für mich da war. Ich vermisse sie schmerzlich.
- meinen Schwiegereltern Conny und Frank Sirocko, die mich auf ihre eigene Art immer ermutigt, unterstützt und zum Lachen gebracht haben.
- meinem Schwesterlein, meiner Freundin und meiner Trauzeugin Louisa, die mich zum Lachen bringt, die mich auf den Boden der Tatsachen zurückholt, die mich motiviert, die mir ein Fels in der Brandung ist, mein Leuchtturm in der Dunkelheit und die mich inspiriert.
- Rixa Köhn für das sehr spontane Korrekturlesen.
- meiner besten Freundin und wundervollen Trauzeugin, Freya Rudloff, die egal, wie lang wir uns nicht gesehen haben, mir immer das Gefühl gibt, als wäre es gestern gewesen und mich durch ihre Verrücktheit und Unbeschwertheit immer zum Lachen bringt. Mit ihr kann man einfach mal abschalten.
- Leonie Fitschen, Ramona Jurgeleit und Irene Lautenschläger – wir haben zusammen das Studium gerockt. Mädels, ich vermisse unsere gemeinsame Zeit!
- Janosch - denn er ist einer, der immer lacht, und die ganze Welt ist wieder in Ordnung - und Oscar - dem jüngsten Familienmitglied, der mir auch so viel Freude in das Leben bringt. Ich möchte ihn nicht mehr missen.
- Beau Bloecker, der viel Arbeit in die finale Korrektur dieser Arbeit gesteckt hat. Und weil er ein großartiger Trauzeuge und vor allem Freund ist.
- das Beste immer zum Schluss – Marius, meinem Ehemann, meinem Freund, meinem Seelenverwandten, meinem Kampfkiwi. Ich kann mich überaus glücklich schätzen, ihn an meiner Seite zu wissen. Zusammen sind wir flauschig, wild und unbesiegbar. Ohne ihn würde dieses Dokument hier vermutlich nicht existieren. Ich liebe Dich über alles!

Von ganzem Herzen danke!