Neuronale Grundlagen appetitiven und konsumatorischen Verhaltens: Die Funktion des Neuropeptids SIFamid bei *Drosophila melanogaster*



Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades "Doctor rerum naturalium" der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie der Georg-August University School of Sciences (GAUSS)

> vorgelegt von Simon Kobbenbring

aus Bremerhaven Göttingen, 2013

Betreuungsausschuss:

Prof. Dr. André Fiala, Abteilung für Molekulare Neurobiologie des Verhaltens, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Martin Göpfert, Abteilung für Zelluläre Neurobiologie, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Georg-August-Universität Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission:

Referent:

Prof. Dr. André Fiala, Abteilung für Molekulare Neurobiologie des Verhaltens, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Georg-August-Universität Göttingen

Korreferent:

Prof. Dr. Martin Göpfert, Abteilung für Zelluläre Neurobiologie, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Georg-August-Universität Göttingen

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Ralf Heinrich, Abteilung für Zelluläre Neurobiologie, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Andreas Stumpner, Abteilung für Zelluläre Neurobiologie, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Ernst Wimmer, Abteilung für Entwicklungsbiologie, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 09.09.2013

Inhaltverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Die physiologischen Grundlagen motivierten Verhaltens	2
2.2 Neuropeptide	4
2.3 Die Regulationen der Nahrungsaufnahme bei Vertebraten und Invertebraten.	9
2.3.1 Die Regulation der Nahrungsaufnahme bei Vertebraten	9
2.3.2 Die Regulation der Nahrungsaufnahme bei Drosophila melanogaster	
2.4 Die Taufliege Drosophila melanogaster als Modellorganismus	
2.5 SIFamid: ein Neuropeptid mit bislang unklarer Funktion	27
2.6 Ziel der Arbeit	28
3. Materialien	30
3.1 Geräte	30
3.2 Verbrauchsmaterialien	
3.3 Chemikalien	32
3.4 Enzyme	32
3.5 Antibiotika	
3.6 Duftstoffe	33
3.7 Lösungen und Medien für die Molekularbiologie	33
3.8 Lösungen für Antikörperfärbungen	
3.9 Antikörper	35
3.9.1 Primäre Antikörper	35
3.9.2 Sekundäre Antikörper	36
3.10 Organismen	36
3.10.1 Bakterienstämme	36
3.10.2 Fliegenstämme	36
4. Methoden	38
4.1 Drosophila-Zucht	
4.1.1 Nährmedien für die Drosophila-Zucht	
4.1.2. Kultivierung von Drosophila-Stämmen	
4.2 Immunhistochemische Färbungen	39
4.2.1 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen	

4.2.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	39
4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
4.3.1 DNA-Aufreinigung und DNA-Extraktion	40
4.3.2 Durchführung der PCR	40
4.4 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	42
4.4.1 RNA-Aufreinigung und RNA-Extraktion	42
4.4.2 Durchführung der RT-PCR	44
4.5 Molekulare Klonierungen	45
4.5.1 Ligation	47
4.5.2 Transformation hitzekompetenter E. coli-Bakterien	47
4.5.3 Restriktionsverdau	48
4.5.4 LR-Rekombinations-Reaktion als Teil des Gateway-Klonierungssystems	48
4.6 In-vivo Calcium Imaging	50
4.6.1 Durchführung von in-vivo Calcium Imaging-Messungen	52
4.6.2 Auswertung der in-vivo Calcium Imaging Experimente	53
4.6.3 Datenanalyse der in-vivo Calcium Imaging Experimente	54
4.6.4 Erzeugung von Falschfarben-kodierten Darstellungen der räumlichen Verteilung von Ca ²⁺ -Aktivität im Antennallobus	ι 55
4.7 Methoden zur Quantifizierung des Balzverhaltens	55
4.7.1 Versuchsaufbau zu den Balzverhaltensexperimenten	55
4.7.2 Die Versuchsdurchführung zu den Balzverhaltensexperimenten	56
4.7.3 Datenanalyse der Balzverhaltensexperimente	57
4.8 Experimente zur Nahrungsaufnahme von Drosophila melanogaster	58
4.8.1 Durchführung der Experimente zur Nahrungsaufnahme	58
4.8.2 Quantifizierung der Nahrungsaufnahme	59
4.9 Quantitative Erfassung der olfaktorischen Präferenz	60
4.9.1 Versuchsdurchführung	60
4.9.2 Datenanalyse	62
4.10 Quantitative Erfassung der Rüsselreflexreaktionen (Proboscis Extension Reflex)	62
4.10.1 Aufzucht und Vorbereitung der Fliegen	63
4.10.2 Durchführung der Rüsselreflexexperimente	64
4.10.3 Datenanalyse	64
4.11 Verwendete Statistik	65
5. Ergebnisse	66

	5.1 Anatomische Studien	66
	5.1.1 Immunhistochemische Färbungen zur Verteilung von SIFamid	66
	5.1.2 Visualisierung der dendritischen Verzweigungen der SIFamidergen Neurone	68
	5.1.3 Kolokalisation von SIFamid mit anderen Neuropeptiden und Auffindung möglicher Z Zell-Kontakte mittels der split-GFP Technik	Zell- 70
	5.2 Einfluss des Neuropeptides SIFamid auf das Verhalten	79
	5.2.1 SIFamid inhibiert nicht das Balzverhalten der Taufliegen	80
	5.2.2 Die Aktivierung der SIFamidergen Neurone führt zu einer Zunahme der Nahrungsaufnahme	86
	5.2.3 Die thermogenetisch induzierte Ausschüttung von SIFamid führt zu einer erhöhten Reaktion auf einen appetitiven gustatorischen Stimulus	93
	5.2.4 SIFamid verstärkt die olfaktorische Präferenz gegenüber einem appetitiven Duft, abe beeinflusst nicht die Reaktion auf einem aversiven Duft	r 96
	5.3 In-vivo Calcium Imaging	100
	5.3.1 Überprüfung der SIFa-LexA und der LexAOP:dTrpA1-mCherry Linien	100
	5.3.2 SIFamid wirkt modulierend auf die olfaktorischen Rezeptorneurone in den Antennalloben	102
6	5. Diskussion	107
	6.1 Signalübertragung im Gehirn durch Peptide oder "klassische" Neurotransmitter: Unterschiede und Gemeinsamkeiten	108
	6.2 Aktivierung von Neuronen und Inaktivierung von Neuronen: methodische Zugänge	110
	6.3 Simultanes Messen und Aktivieren von Neuronen: eine neuartige Herangehensweise	. 111
	6.4 Eine mögliche orexigene Rolle von SIFamid	114
	6.5 Orexigene und Anorexigene Neuropeptide bei Vertebraten und Invertebraten	116
Ι	_iteratur:	122
A	Abkürzungsverzeichnis	i
A	Abbildungsverzeichnis	v
J	Γabellenverzeichnis	viii
S	Selbstständigkeitserklärung	ix
Ι	Danksagung	x
0	Curriculum Vitae	xi

1. Zusammenfassung

Für alle Tiere ist die Nahrungsaufnahme ein überlebenswichtiger Vorgang. Das konsumatorische Verhalten ist Teilaspekt eines homöostatischen Prozesses. Ausgelöst wird konsumatorisches und appetitives Verhalten durch interne, motivationale Zustände. Die internen Zustände "gesättigt" und "ungesättigt" werden bei vielen Tierarten durch ein Wechselspiel zwischen orexigen- und anorexigen-wirkenden Neuropeptiden vermittelt. Um die zentralnervöse Steuerung von Appetit und Sättigung genauer zu klären, wurde in dieser Studie die schwarzbäuchige Taufliege Drosophila melanogaster als Modellorganismus genutzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch eine artifizielle, thermogenetisch induzierte Aktivierung von Neuronen, welche das Neuropeptid SIFamid exprimieren, das Verhalten der Insekten verändert wird. Die Tiere zeigen vermehrte Nahrungsaufnahme und sind motivierter, auf appetitive gustatorische und olfaktorische Reize zu reagieren. Des Weiteren wurden Hinweise gesammelt, dass das Neuropeptid SIFamid keinen inhibitorischen Einfluss auf das Balzverhalten der Taufliegen ausübt. Mit immunhistochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass die Dendriten der SIFamidergen Neurone in unmittelbarer Nähe zu den Axonendigungen von Neuronen, die orexigen- oder anorexigen-wirkende Neuropeptide produzieren, liegen. Dieser Befund lässt auf ein mögliches Zusammenspiel zwischen den diversen peptidergen Neuronen schließen. Mit Hilfe der split-GFP-Technik konnte das peptiderge Netzwerk der SIFamidergen Neurone detaillierter untersucht werden. Es wurde gefunden, dass die SIFamidergen Neurone in enger räumlicher Nachbarschaft zu Neuronen, die in die Nahrungsaufnahme sowie die nervöse Steuerung des Metabolismus involviert sind, stehen. In Kombination mit einem zweiten, unabhängigen Expressionssystem konnten die SIFamidergen Neurone thermogenetisch depolarisiert werden und die neuronale Antwort der olfaktorischen Rezeptorneurone auf Duftstimuli in den Antennalloben mit Hilfe von in-vivo Calcium Imaging untersucht werden. Es konnte dadurch gezeigt werden, dass die neuronale Aktivität in den Duftsinneszellen erhöht ist. Aufgrund vorliegender Daten aus Anatomie, Verhaltensexperimenten und in-vivo Calcium Imaging lässt sich schlussfolgern, dass SIFamid ein bis dato unbekannter "Mitspieler" bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme ist und modulierend auf sensorische neuronale Schaltkreise sowie insgesamt appetitfördernd auf die Taufliege wirkt.

2. Einleitung

2.1 Die physiologischen Grundlagen motivierten Verhaltens

Alle Tiere zeigen motivierte Verhaltensweisen, um das Überleben des Individuums und der Art zu sichern (Toates, 1986; Thompson, 2001; Bear et al., 2009; Baldo et al., 2013). Im Grunde wird motiviertes Verhalten durch innere physiologische Ungleichgewichte hervorgerufen, die das Tier wiederum dazu veranlassen, das Gleichgewicht (Homöostase) wiederherzustellen (Berridge, 2004; Thompson, 2001; Bear et al., 2009). Der Begriff der Homöostase (Bernard, 1865 zitiert in Noble, 2007) wurde zuerst von Claude Bernard eingeführt als eine Bezeichnung für eine konstante Aufrechterhaltung des inneren Milieus (Gross, 1998; Noble, 2007; Gross, 2009). Motivierte Verhaltensweisen können unter anderem Schlaf, Durst, Hunger und das Reproduktionsverhalten sein (Bindra, 1974; Toates, 1986; Thompson, 2001; Bear et al., 2009; Baldo et al., 2013). An zwei Beispielen sollen Prinzipien motivierter Verhaltensweisen erläutert werden. Als erstes Beispiel soll der interne Motivationszustand "Durst" dienen, wobei "Durst" als die Motivation eines Tieres zu erhöhter Flüssigkeitsaufnahme angesehen wird (Antunes-Rodrigues et al., 2004). Das Bedürfnis, Flüssigkeit aufzunehmen, wird durch verschiedene Faktoren hervorgerufen. Bei Säugetieren wird Durst unter anderem durch eine minimale Erhöhung der Plasma-Osmolarität von 1-2% erzeugt (Millard-Stafford, 2012). Ebenso kann Durst durch eine etwa 10% ige Reduktion des Blutvolumens hergerufen werden (Antunes-Rodrigues et al., 2004). Eine Änderung in der Plasma-Osmolarität wird über Osmorezeptoren registriert, die im zirkumventrikulären Organ und im Organum subfornical lokalisiert sind (Fitzsimons, 1998). Diese Rezeptoren haben wiederum neuronale Verbindungen mit dem supraoptischen und paraventrikularen Nukleus des Hypothalamus, die Arginin-Vasopressin synthetisieren (Fitzsimons, 1998; Millard-Stafford, 2012). Eine Ausschüttung von Arginin-Vasopressin verursacht eine reduzierte Wasserexkretion der Niere und stimuliert das Trinkverhalten (Antunes-Rodrigues et al., 2004; McKinley et al., 2006; Johnson, 2007; Millard-Stafford, 2012). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass vegetativ-physiologische Abweichungen des internen Zustandes durch Signale ausgeglichen werden, die durch Neuropeptide vermittelt werden. Dem nächsten Beispiel zur Homöostase soll die Aufrechterhaltung des Blutzuckers dienen. Die Motivation der Tiere, Nahrung zu konsumieren, beruht, in erster Näherung und vereinfacht ausgedrückt, auf einem niedrigen

Glukose-Spiegel im Blut (Mayer und Thomas, 1967). Dieser Blutzuckerwert wird unter anderem von Glukosesensoren auf den Leberzellen überwacht (Kleine und Rossmanith, 2010). Sobald die Glukosekonzentration im Blut unter dem optimalen Wert von 5mM (Kleine und Rossmanith, 2010) absinkt, gerät die Energiebalance des Körpers "durcheinander" und das Tier ist dementsprechend bestrebt, das Gleichgewicht wiederherzustellen. Dies wird durch unterschiedliche Mechanismen gewährleistet (Morton et al., 2006). Die Leber sowie die Nieren sind hauptsächlich an der schnellen Bereitstellung von Glukose beteiligt (Gerich, 2000; Gerich, 2010). Die Expression des Enzyms Glukokinase (GK) in der Leber wird bei einem hohen Blutzuckerspiegel erhöht, GK phosphoryliert Glukose zu Glukose-6-Phosphat (Glc6P), welches als Glykogen gespeichert wird (Kleine und Rossmanith, 2010). Im Gegensatz dazu wird bei einem niedrigen Blutzuckerspiegel durch Glykogenolyse aus Glykogen Glc6P verfügbar, welches nach einer weiteren Spaltung durch das Enzym Glukose-6-Phosphatase in Glukose umgewandelt wird (Landau et al., 1996; Gerich, 2000; Gerich, 2010; Kleine und Rossmanith, 2010). Die Messung des Blutzuckerspiegels und die schnelle Bereitstellung durch periphere physiologische Prozesse damit hervorgerufene von Glukose Nahrungsaufnahme ist jedoch nur ein Puzzlestück der Nahrungsaufnahme bei der Wiederherstellung des Blutzuckerspiegels. Das appetitive und konsumatorische Verhalten wird durch ein neuropeptiderges Regulationssystem kontrolliert (Schwartz et al., 2006), dessen Zusammenspiel die Nahrungssuche fördert, die Nahrungsaufnahme initiert und die Beendigung der Nahrungsaufnahme einleitet (Thompson, 2001; Kleine und Rossmanith, 2010; Bear et al., 2009; Baldo et al., 2013; Chaudhri et al., 2008; Schwartz et al., 2000; Williams und Elmquist 2012; Yeo und Heisler, 2012; Zeltser et al., 2012). Im Zuge dieser Arbeit soll, wie nachfolgend detailliert beschrieben, mit Hilfe des Modellorganismus Drosophila melanogaster eine mögliche Funktion des Neuropeptides SIFamid geklärt werden. Besonderem Augenmerk liegen auf einem möglichen Zusammenhang zwischen einer artifiziell hervorgerufene Aktivierung der SIFamidergen Neurone und einer erhöhten Nahrungsaufnahme des Tieres. Um die SIFamidergen Neurone dahingehend zu manipulieren soll auf eine Vielzahl an Methoden zurückgegriffen werden. Darüber hinaus finden, wie nachfolgend beschrieben, zwei unabhängige Expressionssyteme, in-vivo Calcium Imaging und die split-GFP Technik Anwendung. In Bezugnahme auf alle angewendeten Methoden konnte die mögliche Rolle des Neuropeptides SIFamid im peptidergen System genauer untersucht werden.

2.2 Neuropeptide

Hormone, Neurohormone und Neuromodulatoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von homöostatischen Prozessen. Neuropeptide sind eine Klasse von Signalmolekülen, die in einigen Neuronen exprimiert und als Botenstoffe freigesetzt werden (Alberts et al., 2004; Kandel et al., 1995). Die Synthese von Neuropeptiden ist ein komplexer Vorgang, der sich von der Synthese anderer Transmitter unterscheidet (Kleine und Rossmanith, 2010), denn Neuropeptide werden ausschließlich im Zellkörper hergestellt (Kandel et al., 1995). Die Synthese und Exocytose sowie die Geschwindigkeit der Ausschüttung von Neuropeptiden unterscheidet sich ebenfalls von den klassischen Neurotransmittern (Bruns und Jahn, 1995; Sieburth et al., 2006). Die Vorläufer von Neuropeptiden sind längere, inaktive Prä-pro-Peptide, die am endoplasmatischen Retikulum durch Ribosomen synthetisiert werden (Hökfelt et al., 2000; Siegel et al., 1999, vgl. Abb. 1). Diese inaktiven Aminosäurenketten beinhalten ein 22 bis 30 Aminosäuren langes Signalpeptid, das von dem Enzym Signalpeptidase abgespalten und somit der N-Terminus des künftigen Neuropeptides freigelegt wird (Kleine und Rossmanith, 2010). Die entstehende Kette wird durch das Lumen des endoplasmatische Retikulums zum cis-Golgi-Apparat geschleust (Bean et al., 1994). Durch eine Reihe von Vesikelverschmelzungen und Vesikelknospungen wird das Prä-Neuropeptid vom cis-Golgi-Apparat zu dem trans-Golgi-Apparat transportiert (Bean et al., 1994). Während des Transportes zum Golgi-Apparat vollzieht sich die weitere Hormonreifung mit Hilfe von Prohormon-Konvertasen (PC). Diese Enzyme schneiden am C-Terminus des Vorläuferpeptides direkt hinter dem Dipeptidmotiv Lysin (K) und Arginin (R) (Kleine und Rossmanith, 2010). Allgemein schneiden Prohormon-Konvertasen generell das Motiv R/K-X-R↓ (KR), wobei ↓ für die Schnittstelle und X für eine beliebige Aminosäuren steht (Seidah und Chrétien, 1999). Bei Vertebraten wurden bislang sieben unterschiedliche Prohormon-Konvertasen gefunden (Seidah und Chrétien, 1999). Am Beispiel des hypothalamischen Neuropeptids Thyrotropin-Releasing Hormon (Trh) soll die Wirkung der Prohormon-Konvertasen erläutert werden. Das Thyrotropin-Releasing Hormon kommt beim Menschen sechsmal als repetitive Sequenzen des Prohormons vor (Kleine und Rossamith, 2010). Die Prohormon-Konvertase kann aus dem Trh-Vorläufer sechs unterschiedliche funktionsfähige Propeptide herausschneiden (Bear et al., 2009, Kleine und Rossmanith, 2010). Im darauffolgenden Schritt werden durch die Carboxypeptidase E (CPH) Arginine und Lysine vom C-Terminus entfernt sowie alle anderen Aminosäuren außer Glycin (Siegel et al., 1999,

Einleitung

Kleine und Rossmanith, 2010). Daraufhin kommt es zu einer Amidierung des C-terminalen Glycins durch das Enzym Peptidylglycin-α-amidierende Monooxygenase (PAM), wodurch das Peptid vor einem Abbau durch andere Enzyme geschützt wird (Kleine und Rossmanith, 2010). Prohormon-Konvertasen sind phylogenetisch sehr konservierte Enzyme (Veenstra, 2000). Bei Invertebraten schneiden Prohormon-Konvertasen häufig ebenfalls an einem KR-Motiv (Veenstra, 2000; Southey et al., 2006). Am trans-Golgi Apparat werden die Vorläuferhormone in "Large Dense Core" Vesikeln (LDCV) verpackt (Hökfelt et al., 2000). Von dort gelangen die LDCV durch anterograden Transport zu den Axonendigungen (Bean et al., 1994; Hökfelt et al., 2000; Siegel et al., 1999, vgl. Abb. 1). Dort können die LDC Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren und das fertige Neuropeptid ausschütten (Sieburth et al., 2006). Die "Large Dense Core" Vesikel gelangen anschließend durch retrograden Transport zurück zum Golgi-Apparat, um dort erneut "beladen" zu werden. In den neurosekretorischen Zellen der Invertebraten pendeln die LDC Vesikel also zwischen den Axonendigungen und dem Zellkörper. Mit Hilfe der Motor Kinase 3 gelangen die LDC Vesikel auf Mikrotubuli in anterograder Richtung zu der Synapse (Barkus et al., 2008). Auf dem retrograden Weg zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) nutzen die LDC Vesikel das Motor Protein Dynein (Morris und Pow, 1996). Im Gegensatz zu der relativ schnellen Ausschüttung klassischer Transmitter hat die langsamere Entladung von Neuropeptiden durch LDC Vesikeln in der Forschung bisher weniger Aufmerksamkeit erhalten (Hökfelt et al., 1991; Van der Pol, 2012).



Abbildung 1. Schematisches Modell und Aspekte der Peptidhormon Synthese und Transportes.

Das Vorläuferpeptid wird durch Ribosomen am Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Durch Vesikelverschmelzungen und Knospung wird das vorläufige Peptid vom cis-Golgi-Apparat zum trans-Golgi-Apparat transportiert. Am trans-Golgi Apparat werden die Neuropeptide in "Large Dense Core" Vesikel verpackt und durch axonalen Transport zu den Axonendigungen transportiert und dort gespeichert. Abbildung angefertigt in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Riemensperger modifiziert nach Dudel et al., 2001; Siegel et al., 1999 und Strausfeld, 1975.

Neuropeptide der Invertebraten, wie zum Beispiel bei *Drosophila melanogaster*, können eine Größe von 5 bis 80 Aminosäuren besitzen (Altstein und Nässel, 2010), wohingegen das kleinste funktionsfähige Neuropeptid bei Vertebraten das Thyrotropin-Releasing Hormon mit nur 3 Aminosäuren ist (Bøler et al., 1969). Bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* wurden bisher 42 Gene gefunden, die für Vorläuferpeptide kodieren (Nässel und Winther, 2010). Nach der Exocytose können Neuropeptide ganz diverse Funktionen übernehmen. Einige wirken in der Hämolymphe als zirkulierende Neurohormone, andere wirken als relativ lokale Neuromodulatoren im Gehirn. Darüber hinaus können Neuropeptide als Ko-Transmitter zusammen mit klassischen Transmittern ausgeschüttet werden (Nässel, 2009). Die meisten Neuropeptide binden an G-Protein gekoppelten

Rezeptoren (GPCR) (Nässel und Winther, 2010). Eine Bindung induziert eine Konformationsänderung in dem Rezeptor, was zu einer Aktivierung des intrazellulären G-Proteins, durch Austausch von GDP zu GTP führt (Van den Pol, 2012). Die Signaltransduktion kann z.B. eine Adenylatcyclase aktivieren, die zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) generiert.

Tabelle 1. Nachfolgend werden die hauptsächlichen Neuropeptide aufgeführt, die bislang bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* gefunden wurden (Tabelle 1, modifiziert nach Nässel, 2008; Nässel und Winther, 2010; Kleine und Rossmanith, 2010). Erstellung der Tabelle nach Nässel, (2002), Nässel und Homberg, (2006), Nässel und Winther, (2010), Kleine und Rossmanith, (2010), Ida et al., (2012). Es wurden die CG ("Computed Gene") Nummern des Gens angegeben. Einzusehen auf <u>http://flybase.org/</u>. Darüber hinaus wurden die CG Nummern der Rezeptoren, falls bekannt, und die bisweilen gefundene Funktion der Neuropeptide beschrieben.

Name des	Annotation	Rezeptor	Funktion
Neuropeptides			
Adipokinetisches	CG1171	CG11325	reguliert Stoffwechselvorgänge und die
Hormon (AKH)			Bereitstellung von Energie für die Flugmuskeln.
Allatostatin A (AstA)	CG13633	CG2872	Neurone die Allatostatin exprimieren sind in der
		CG10001	Sättigung involviert.
Allatostatin B	CG6456	CG30106	Allatostatin Typ B-Peptide sind in die Ecdysis
(AstB/MIP)		CG14484	involviert.
Allatostatin C (AstC)	CG14919	CG7285	Funktion noch nicht bekannt.
		CG13702	
Bursicon (Burs α)	CG13419	CG8930	Burs α bewirkt die Aushärtung von Haut und Flügel
			nach der Häutung.
Partner of bursicon	CG15284	CG8930	Burs β bewirkt die Aushärtung von Haut und Flügel
(Burs β)			nach der Häutung.
CAPA-PVK/PK	CG15520	CG14575	gilt als muskelstimulierendes Hormon,
		CG9918	stimuliert die Pheromon-Bildung.
CCAP	CG4910	CG6111	das Kardio-Akzeleratische Peptid (CCAP) gilt als
			konserviertes, multifunktionales Peptid. Es
			beeinflusst die Herzfrequenz.
CCHamide	NP650285	CG30106	CCHamide-2 erhöht in Schmeißfliegen die
		CG14593	Motivation, Nahrung aufzunehmen. Bei Drosophila
			noch nicht geklärt.
Corazonin (Crz)	CG3302	CG10698	in Drosophila könnte Crz die AKH-Ausschüttung

Einleitung

			regulieren und steht im Zusammenhang mit der	
			Nahrungsaufnahme.	
dFMRFamide	CG2346	CG2114	in Drosophila wurden dFMRFamide als	
			Muskelkontraktionspeptide identifiziert.	
dILP 1	CG13173	CG18402*	Funktion nicht bekannt.	
dILP 2	CG8167	CG18402*	steuert die Verwertung von Trehalose in Zellen.	
			Einfluss auf Lebensspanne.	
dILP 3	CG14167	CG18402*	steuert die Verwertung von Trehalose in Zellen.	
			Einfluss auf Lebensspanne.	
dILP 4	CG6737	CG18402*	Funktion noch nicht geklärt.	
dILP 5	CG33273	CG18402*	steuert die Verwertung von Trehalose in Zellen.	
			Einfluss auf die Lebensspanne.	
dILP 6	CG14049	CG18402*	Funktion noch nicht geklärt.	
dILP 7	CG13317	CG18402*	Funktion noch nicht geklärt.	
Diuretisches Hormon	CG8348	CG8422	DiuH stimuliert die Natriumchlorid-Ausscheidung	
44			und den Wassertransport.	
Diuretisches Hormon	CG13094	CG17415	DiuH stimuliert die Natriumchlorid-Ausscheidung	
31			und den Wassertransport.	
Drosulfakinin	CG18090	CG6857	Beeinflusst negativ die Nahrungsaufnahme und wirkt	
			auf den Metabolismus. Drosulfakinin wird	
			zusammen mit <i>d</i> ILP exprimiert.	
Dromyosuppressin	CG6440	CG8985 CG13803	Funktion ist unbekannt.	
Ecdysis-triggering	CG18105	CG5911	initiiert die Ecdysis (Häutung).	
Hormon				
Eclosion Hormon	CG5400	CG10738	synchronisiert die Häutung.	
Hugin-pyrokinin	CG5400	CG10738	beeinflusst die Nahrungsaufnahme.	
Ion transport peptide	CG13586	Nicht	möglicherweise Wirkung als Anti-Diuretisches	
		bekannt	Hormon.	
Leukokinin	CG13480	CG10626	Leukokinine stimulieren die Darmmuskulatur, vor	
			allem aber regen sie die Diurese an.	
Neuropeptid F	CG10342	CG1147	Funktion in der Nahrungsaufnahme. Im	
			Larvenstadium bewirkt NPF den "Fress"-Zustand.	
Neuropeptid F	CG13968	CG7395	Einfluss auf die Nahrungsaufnahme. Bewirkt die	
(kurzes NPF)			Nahrungsaufnahme.	
NPLP1	CG3441	CG1147	die Funktion ist bisher nicht bekannt.	
NPLP2	CG3441	Nicht	die Funktion wurde bisher noch nicht gezeigt.	
		bekannt		
NPLP3	CG13061	Nicht	Wirkungsweise wurde bisher noch nicht ermittelt.	
		bekannt		

Einleitung

NPLP4	CG15361	Nicht bekannt	die Funktion ist bisher unbekannt.
Pigment-dispersing	CG6496	CG13758	Einfluss auf Färbung der Cuticula. Rolle bei der
factor (PDF)			zirkadianen Rhythmik.
Proctolin	CG7105	CG6986	Wirkung auf Muskelaktivität und steigert die
			Häufigkeit von Muskelkontraktionen.
Prothoracicotropic	CG13687	CG1389	Einfluss auf die Entwicklung der Fliegen. Hemmt die
hormone			Ecdyson-Bildung in der Prothoraxdrüse.
Sex Peptid	CG8982	CG16752	hemmt die Pheromon-Biosynthese. Bewirkt nach
			Kopulation bei Weibchen die Nahrungsaufnahme.
SIFamid	CG4681	CG10823	Einfluss auf das Balzverhalten der Fliege.
Tachykinin	CG14734	CG6515	Einfluss auf chemosensorische Prozesse und auf die
(DTK)/Drotachykinin		CG7887	Lokomotion.

2.3 Die Regulationen der Nahrungsaufnahme bei Vertebraten und Invertebraten

2.3.1 Die Regulation der Nahrungsaufnahme bei Vertebraten

Die Nahrungsaufnahme von Vertebraten ist abhängig von dem täglichen Energiebedarf und dem Energieverbrauch (Schwartz et al., 2000) und gilt, wie eingangs schon erwähnt, als homöostatischer Prozess (Wilding, 2002). Die Kontrolle von internen Zuständen wie "Appetit" und "Sattheit" setzt ein Regulationssystem voraus, das zwischen dem Gastrointestinaltrakt, dem Enterischen Nervensystem und dem zentralen Nervensystem kommuniziert (Konturek, 2004; Kleine und Rossmanith, 2010). Die Regulation der Nahrungsaufnahme erfordert demnach eine Koordination von Signalen und hier sind als Signalstoffe vor allem Neuropeptide zu nennen (Williams und Elmquist, 2012). Die Verdauung und die Nährstoffabsorption vollzieht sich im Gastrointestinaltrakt (GI), wohingegen die Signale für "Hunger" und "Sättigung" ihren Ursprung im zentralen Nervensystem 2008). (ZNS) haben (Chaudhri Neuropeptide et al., des Gastrointestinaltraktes haben eine profunde Rolle beider Regulation von "Hunger" und "Sattheit" (Sam et al., 2012). Neuropeptide aus dem Gastrointestinaltrakt werden über den Blutstrom transportiert und können entweder direkt im Hypothalamus an ihren Zielzellen des Nukleus Arcuatus (N. ARC) (Meier und Gressner, 2004; Bewick et al., 2009; Myers und Olson, 2012) oder auf Rezeptoren Neuronen des Nucleus tractus solitarii (NTS) im Hirnstamm wirken (Schwartz, 2006; Murphy und Bloom, 2006). Im Folgenden wird erläutert, welche peripher freigesetzten Peptide auf den Hypothalamus wirken. Es gibt zahlreiche regulatorische Peptide die in endokrinen Zellentypen des Gastrointestinaltraktes gebildet werden und eine Vielzahl von physiologischen Prozessen beeinflussen (Sam et al., 2004; Murphy und Bloom, 2004). Nach bzw. während der Nahrungsaufnahme kommt es zu einer gastrischen Dehnung des Gastrointestinaltraktes und daraufhin werden Peptide, wie das Peptid-Tyrosyl-Tyrosin (PYY) (Eberlein et al., 1989), Oxyntomodulin (OXN) (Le Quellec et al., 1992), Cholezystokinin (CCK) (Chaudhri et al., 2008) und das Glukagon-ähnliche Peptid (GLP-1) (Ørskov et al., 1994) ausgeschüttet, die an Rezeptoren auf den Neuronen des NTS binden (King, 2007) (siehe Tabelle 2 und Abb. 2) und einen "sättigenden" Effekt ausüben (Schwartz, 2000). PYY wird in endokrinen L-Zellen des Ileum und Enddarm produziert (Anini et al., 1999) und führt ebenfalls ein Sättigungsgefühl herbei (Batterham et al., 2003). Bei einer intravenösen Verabreichung von PYY nahm die Testgruppe insgesamt 30% weniger Kalorien zu sich als die Kontrollgruppe (Batterham et al., 2003).

Insulin gilt als ein Schlüsselhormon bei der Aufrechterhaltung der Energiebalance und der Regulation der Nahrungsaufnahme (Schwartz und Porte, 2005). Insulin wird von den Langerhanszellen des Pankreas gebildet und nach einer Mahlzeit in den Blutstrom sezerniert (Myers und Olson, 2012). Insulin wirkt unter anderem auf die Leber, Muskelund Fettzellen, aber eben auch auf den Hypothalamus (Schwartz und Porte, 2005). Die Proopiomelanokortin- (POMC)-produzierende Zellen im N. ARC exprimieren neben Leptin Rezeptoren auch Rezeptoren für das Insulin (Hill et al., 2010).

Glukagon ist für die Energiehomöostase und Nahrungsaufnahme von zentraler Bedeutung (Jones et al., 2012). Es wird in α -Zellen der Pankreas gebildet und in den Blutkreislauf entlassen (Jiang und Zhang, 2003). Es gilt als Gegenspieler zum Insulin (Jiang und Zhang, 2003) und hat zahlreiche Wirkungen, unter anderem bei der Nahrungsaufnahme (Jones et al., 2012). Es wurde gefunden, dass Glukagon ein sättigenden Effekt ausübt (Le Sauter et al., 1991), aber die Mechanismen, wie Glukagon die Nahrungsaufnahme inhibiert, bleibt bis heute nicht gut geklärt (Jones et al., 2012).

Ein weiteres Signalpeptid ist das Leptin, das in Adipozyten (Fettzellen) in Abhängigkeit von deren Zahl gebildet und freigesetzt wird (Jequir und Tappy, 1999). Leptin wird in den Blutkreislauf entlassen und gelangt über den Blutstrom in den Hypothalamus (Meier und Gressner, 2004). Dort bindet das Neuropeptid an die Leptin-Rezeptoren der Neurone des N. ARCs, mit antagonistischen Effekten (Schwartz, 2000). Die neuronale Aktivität von POMC/Kokain-Amphetamin-regulierende Transkript (CART) produzierenden Neurone wird erhöht, wohingegen die neuronale Aktivität der NPY/AgRP produzierende Neurone inhibiert wird (Sahu, 2003).

Ghrelin ist das einzige orexigene Neuropeptid aus dem Gastrointestinaltrakt (Bewick et al., 2009; Sam et al., 2012) und wird im Ventriculus (Magen) gebildet (Bewick et al., 2008). In gesättigtem Zustand liegt ein geringer Ghrelin-Level vor (Ariyasu et al., 2001), wohingegen in ungesättigtem Zustand ein hoher Ghrelin-Level vorzufinden ist (Toshinai et al., 2001). Rezeptoren für Ghrelin finden sich im N. ARC des Hypothalamus (Hewes und Dickson, 2000). Ghrelin wirkt aus dem Magen über den N. vagus zurück in das ZNS, wo die Ghrelin-Signale unter anderem im ventrobasalen Hypothalamus zur Sekretion von NPY- und Agouti-ähnlichen Peptiden führen (Kleine und Rossmanith, 2010).

Somit gibt es viele Neuropeptide die im Gastrointestinaltrakt gebildet werden und durch Bindung in Nucleus tractus solitarii ein Sättigungsgefühl hervorrufen. Es gibt aber auch Neuropeptide, die direkt an Rezeptoren im Hypothalamus binden und somit direkt Wirkung zeigen (Schwartz, 2000). Der Hypothalamus, der eine Schlüsselrolle bei der Regulation von "Appetit" und "Sattheit" hat (Cone et al., 2001; Murphy und Bloom, 2004; Murphy und Bloom, 2006; Williams et al, 2011; Williams und Elmquist, 2012; Yu und Kim, 2012), erhält Informationen über den derzeitigen homöostatischen Zustand des Tieres durch diese neuralen und hormonellen Signale aus der Peripherie (Schwartz, 2000; Murphy und Bloom, 2006) und besteht aus verschiedenen Nuklei, u.a. dem Nukleus Arcuatus (N. ARC), dem paraventrikulären Nukleus (PVN), dem lateralen Hypothalamus (LHA), dem ventromedialen Nukleus (VMN) und dem dorsomedialen Nukleus (DMN) (Yu und Kim, 2012). Allem voran hat der N. ARC eine zentrale Rolle für die Integration von Hungerund Sattheits-auslösende Signalen (Murphy und Bloom, 2004; Chaudhri et al., 2008; Sam et al., 2012). Der N. ARC enthält zwei Populationen von Neuronen mit jeweils antagonistischen Wirkungen auf die Nahrungsaufnahme (Chaudhri et al., 2008). Medial sind appetitanregende (orexigene) Neurone lokalisiert, die das Neuropeptid Y (NPY) und das Agouti-ähnliche-Protein (AgRP) produzieren (Sam et al., 2012). Im lateralen N. Arc hingegen befinden sich appetitzügelnde (anorexigene) Neurone, die das Pro-Opiomelanokortin (Elias et al., 2008) und das Kokain-Amphetamin-regulierende Transkript (CART) produzieren (Kristensen et al., 1998). Das POMC ist ein Vorläuferprotein für sieben Peptidhormone (Kleine und Rossmanith, 2010). Durch die Prohormon-Konvertase 2 (PC2) entsteht aus POMC im Hypothalamus das Alpha Melanozyten-stimulierende Hormons (α-MSH) (Benjannet et al., 1991). Das α-MSH inhibiert Neurone, die orexigene Neuropeptide ausschütten und somit spielt dieses Hormon in der Vermittlung von Sättigung eine Rolle (Elias et al., 2008). Die Axone der beiden unterschiedlichen Zellpopulationen projizieren in den paraventrikulären Nukleus und den lateralen Hypothalamus (Elmquist et al., 1999; Stanley et al., 1993; Schwartz et al., 2000). Der Hirnstamm fungiert als eine Zwischenstation und gibt die Informationen aus dem Gastrointestinaltraktes in den Hypothalamus weiter (Ter Horst et al., 1989; King, 2007; Schwartz, 2006; Murphy und Bloom, 2006; Yu und Kim, 2012). Genauer gesagt verbindet der Vagus-Nerv (N. vagus) im Hirnstamm den Hypothalamus mit den Organen des Verdauungstraktes (Konturek et al., 2004).

In der nachfolgenden Tabelle sind orexigene und anorexigene Neuropeptide mit deren Freisetzungsort sowie deren Zielort aufgelistet. In Abbildung 2 ist das Regulationssystem zwischen Hunger- und Sattheitssignalen der Vertebraten vereinfacht und schematisch abgebildet.

Tabelle 2. Orexigene und anorexigene Neuropeptide bei Vertebraten. Angegeben wird der Name des Peptids, der Freisetzungsort, der Zielort und die Wirkung (orexigen oder anorexigen). ¹Aponte et al., (2011), ²Elias et al., (2008), ³Kristensen et al., (1998), ⁴Bewick et al., (2009), ⁵Le Sauter et al., (1991), ⁶Turton et al., (1996), ⁷Schwartz und Porte, (2005), ⁸Hanada et al., (2004), ⁹Clark et al., (1984), ¹⁰Sahu, (2003), ¹¹Cohen et al., (2002), ¹²Batterham et al., (2003) und als Überblick Schwartz, (2000).

Peptid	Freisetzungsort	Zielort	Wirkung
AgRP	Hypothalamus	Hypothalamus	orexigen ¹
α-MSH	Hypothalamus	Hypothalamus	anorexigen ²
CART	Hypothalamus	Hypothalamus	anorexigen ³
Ghrelin	Magen	Hypothalamus	orexigen ⁴
Glukagon	Pankreas	u.a. Leber/Hypothalamus	anorexigen ⁵
GLP	Darm	Hirnstamm	anorexigen ⁶
Insulin	Pankreas	Hypothalamus	anorexigen ⁷
Neuromedin U	Hypothalamus	Hypothalamus	anorexigen ⁸
	Hypophyse		
	Rückenmark		

	Gastrointestinaltrakt		
NPY	Hypothalamus	Hypothalamus	orexigen ⁹
Leptin	Weiße Fettzellen	Hypothalamus	anorexigen ¹⁰
OXN	Darm	Hirnstamm	anorexigen ¹¹
РҮҮ	Enddarm	Hypothalamus/Hirnstamm	anorexigen ¹²



Abbildung 2. Orexigene und anorexigene Neuropeptide bei der Regulation der Nahrungsaufnahme. Anorexigen-wirkende Neuropeptide wie Leptin und Insulin wirken direkt auf den Nucleus Arcuatus (N. ARC), inhibieren die Expression von NPY und Agouti-ähnlichem Peptid (AgRP) und stimulieren Pro-Opiomelanokortin (POMC) produzierende Neurone. POMC wirkt auf die paraventrikulären Nukleus (PVN) und den lateralen Hypothalamus (LHA). Der PVN und der LHA besitzen reziproke Verbindungen zu dem *Nucleus tractus solitarii* (NTS). Der paraventrikuläre Hypothalamus, der laterale Hypothalamus und der NTS verarbeiten ankommende Informationen über die internen Zustände "Hunger" und "Sättigung". Das Peptid-Tyrosyl-Tyrosin (PYY₃₋₃₆), Glukagon-ähnliche Peptid (GLP-1), Oxyntomodulin (OXN), Cholezystokinin (CCK) werden nach einer gastrischen Dehnung ausgeschüttet und binden an Rezeptoren des NTS. Von dort werden Informationen in den LHA und PVN weitergeleitet. Das orexigen wirkende Ghrelin wirkt auf ARC und dem NTS und löst Hunger aus. Das bedeutet, dass in der Regulation von "Hunger und "Sättigung" zahlreiche Neuropeptide und Bereiche des zentralen Nervensystem miteinander interagieren. Schwarze Pfeile: Wirkung direkt auf den N. ARC. Graue Pfeile: Wirkung auf den NTS. Abbildung modifiziert nach Yu und Kim, 2012. Zusammengefasst kann man sagen, dass die Vermittlung von den internen Zuständen wie "Hunger" oder "Sättigung" im ZNS erfolgt (Schwartz, 2000). Hormone aus der Peripherie wirken über den Hirnstamm oder direkt auf AgRP- und NPY-produzierende Zellen sowie auf POMC-produzierende Zellen im N. ARC, in der die Freisetzung von Peptiden stimuliert oder deren Freisetzung gehemmt wird (Schwartz, 2000; Murphy und Bloom, 2004; Murphy und Bloom, 2006; Williams et al, 2011; Williams und Elmquist, 2012; Yu und Kim, 2012).

2.3.2 Die Regulation der Nahrungsaufnahme bei Drosophila melanogaster

Invertebraten, wie die Taufliege *Drosophila melanogaster*, können auch für Studien über appetitives und konsumatorisches Verhalten herangezogen werden. Die Mechanismen, die konsumatorisches Verhalten auslösen und beenden, beziehungsweise wie solche Mechanismen koordiniert werden, wurden bisher nicht befriedigend geklärt (Söderberg et al., 2012). Analog zu den Vertebraten sind bei Insekten Neuropeptide bekannt, die Zustände wie "Hunger" und "Sattheit" regulieren (Nässel und Winther, 2010). Zudem ist bekannt, dass es viele funktionell und/oder strukturell homologe Neuropeptide bei Vertebraten und Invertebraten gibt (Nässel und Winther, 2010).

Bei Säugetieren ist es generell akzeptiert, dass Hormone aus dem Gastrointestinaltrakt und dem Gehirn die Nahrungsaufnahme regulieren (Williams et al., 2001). Das Zusammenspiel zwischen appetitanregenden und appetitreduzierenden Neuropeptiden ist, aber bis auf wenige Ausnahmen, nicht abschließend geklärt (Söderberg et al., 2012). Das um mehrere Größenordnungen kleinere Gehirn der Fruchtfliege kann daher als Modell dienen, um Prinzipien eines solchen Zusammenspiels mehrerer Hormone aufzudecken.

Bei *Drosophila melanogaster* übernehmen das NPF (Wu et al., 2003) und das sNPF (Lee et al., 2004) die Funktion orexigen-wirkender Neuropeptide. Für das NPF wurde gefunden, dass Larven in Abhängigkeit der An- oder Abwesenheit von NPF zwischen zwei Verhaltenszuständen, "Fressen" oder "Wandern", wechseln (Wu et al., 2003). Bei einer Aktivität der NPF-produzierenden Neurone befinden sich die Larven in dem Zustand "Fressen", wohingegen in dem Verhaltenszustand "Wandern" die NPF Neurone inaktiv

~ 14 ~

sind (Wu et al., 2003). Das short Neuropeptid F (sNPF) gilt ebenfalls als appetitförderndes Neuropeptid und ist in adulten *Drosophila* u.a. in der Medulla und im Pilzkörper vertreten (Lee et al., 2004). Bei einer verstärkten Exprimierung von sNPF zeigten Fliegen verstärktes konsumatorisches Verhalten (Lee et al., 2004). Im Gegensatz dazu führt eine Ablation von sNPF-produzierenden Neuronen bei Fliegen zu einer geringeren Nahrungsaufnahme (Lee et al., 2004). Auch das Sex-Peptid steigert die Nahrungsaufnahme (Carvalho et al., 2006). Das Besondere an dem Sex-Peptid ist, dass es in Männchen gebildet und während der Begattung des Weibchens mit den Spermien übertragen wird (Carvalho et al., 2006). Es bewirkt, dass das Weibchen nach der Paarung mit der Nahrungsaufnahme beginnt (Carvalho et al., 2006).

Bei Drosophila spielt das Insulin-ähnliche Peptid (dILP) eine gewichtige Rolle für die Regulation zwischen "Hunger" und "Sattheit" (Ikeya et al., 2002; Wu et al., 2005a; Wu et al., 2005b; Lee et al., 2008; Broughton et al., 2010). Das Drosophila Genom enthält sieben Gene für das Drosophila Insulin-ähnliche Peptid, gekennzeichnet mit dILP1-7 (Rulifson et al., 2002). In der Taufliege werden dILP1, dILP2, dILP3 und dILP5 in Insulinproduzierende Zellen (IPC) von neurosekretorische Zellen im Pars intercerebralis gebildet (Brogiolo et al., 2001). Das Drosophila Insulin-ähnliche Peptid 2 hat die größte Ähnlichkeit zum Insulin der Vertebraten (Baker und Thummel, 2007). Es wurde gefunden, dass *d*ILP6 im Fettkörper (Slaidina et al., 2009) und *d*ILP7 in einer Gruppe von Neuronen im Abdominalganglion synthetisiert wird (Yang et al., 2009). Die Drosophila Insulinähnlichen Peptide 2, 3 und 5 weisen homologe Funktionen zum Insulin der Vertebraten auf (Brogiolo et al., 2001). Zellen, die dILP4 ausschütten, konnten bisher nicht eindeutig zugeordnet werden (Nässel und Winther, 2010). Wu et al. (2005b) konnten zeigen, dass das dILP den Signalweg von Neuropeptid F inhibiert. Eine Exprimierung von dInR Rezeptoren auf NPFR1-Zellen führt zu einer Unterdrückung des Fressverhaltens (Wu et al., 2005b). In einer neueren Studie von Söderberg et al. (2012) wurde die Rolle von dILP und Drosulfakinine (DSK) untersucht. Drosulfakinin werden von IPC zusammen mit dILP exprimiert (Park et al., 2008; Söderberg et al., 2012). Taufliegen mit verminderter Expression von DSK zeigten verstärkte Nahrungsaufnahme im Gegensatz zu den Kontrollen und waren bei der Futterwahl nicht wählerisch (Söderberg et al., 2012). Daraus folgt, dass das Drosulfakinin als ein Sättigungssignal fungiert und mit dILP die Nahrungsaufnahme und den Metabolismus der Taufliege beeinflusst (Söderberg et al., 2012). Für das Neuropeptid Allatostatin A (AstA) wurde kürzlich gefunden, dass es die Nahrungsaufnahme inhibiert und die Wirkung unabhängig von dem homöostatischen Gleichgewicht der Taufliege ist (Hergarden et al., 2012). In dieser Studie wurde mit Hilfe eines induzierbaren Ionenkanals die neuronale Erregbarkeit von AstA-produzierenden Zellen erhöht. Des Weiteren konnte Hergarden et al. (2012) zeigen, dass die gleichzeitige Aktivierung von NPF-produzierenden Zellen und AstA-produzierenden Neuronen die Inhibition der Nahrungsaufnahme aufhebt. Die Autoren schlossen daraus, dass Allatostatin A von den Signalweg des NPF beeinflusst und der Effekt von AstA aufgehoben wird (Hergarden et al., 2012). Leucokinin (leuc) und der Rezeptor (lkr) stehen in Zusammenhang mit der Regulation der aufgenommenen Nahrung (Al-Anzi et al., 2010). Leucokinin gilt als homolog zum Tachykinin der Vertebraten (Terhzaz et al., 1999). Drosophila melanogaster mit Mutationen in den Genen, die für Leucokinin und für dessen Rezeptor kodieren, nehmen während einer "Mahlzeit" vermehrt Nahrung auf. Dafür zeigen solche Fliegen jedoch größere Abstände bis zur nächsten Fressperiode (Al-Anzi et al., 2010). Die Autoren schlossen daraus, dass die Zunahme der Nahrungsmenge während einer "Mahlzeit" an einen fehlenden Stoppsignal liegt, das vermutlich auf eine gestörte Kommunikation zwischen Darm und Gehirn zurückgeht (Al-Anzi et al., 2010). Für das Neuropeptid Hugin konnte gezeigt werden, dass es die Initiation der Nahrungsaufnahme inhibiert, wenn Larven der Taufliege auf ein neues Futtermedium gesetzt werden (Melcher und Pankratz, 2005). Demnach wird vermutet, dass Hugin-Neurone in den Schaltkreis involviert sind, welcher die Nahrungsaufnahme reguliert (Melcher und Pankratz, 2005; 2010). Das Neuropeptid Corazonin Nässel und Winther, ist weiterhin in ernährungsbedingte Stresssignale involviert und reguliert möglicherweise die AKH-Ausschüttung (Zhao et al., 2010). Tabelle 3 fasst die Neuropeptide, die in die Nahrungsaufnahme involviert sind, zusammen.

Tabelle 3. Übersicht über Neuropeptide, die die Nahrungsaufnahme regulieren. ¹Isabel et al., (2005), ²Hergarden et al., (2012), ³Ida et al., (2012), ⁴Zhao et al., 2010, ⁵Söderberg et al., (2012), ⁶Melcher und Pankratz, (2005), ⁷Rulifson et al., (2002), ⁸Al-Anzi et al., (2010), ⁹Wu et al., (2003), ¹⁰Carvalho et al., (2006), ¹¹Lee et al., (2004) und Nässel und Winther, 2010.

Peptid	Freisetzungsort	Zielort	Wirkung
Adipokinetisches	Corpora cardiaca	Fettkörper	anorexigen ¹
Hormon			
Allatostatin A	Corpora allata	Corpora allata	anorexigen ²
CCHamide	Nicht bekannt	Fettkörper	orexigen? ³
Corazonin	Corpora cardiaca	Corpora cardiaca	anorexigen ⁴

Einleitung

Drosulfakinin	Gehirn	Darmmuskelzellen	anorexigen ⁵
Hugin	Corpora cardiaca/	Corpora cardiaca/	anorexigen ⁶
	Corpora allata	Corpora allata	
		Protocerebrum	
		Pars intercerebralis	
Insulin-like	Corpora cardiaca	Fettkörper	anorexigen ⁷
Peptide			
Leucokinin	Vorderdarm	Darmmuskelzellen	anorexigen ⁸
NPF	Gehirn	Gehirn	orexigen ⁹
Sex-Peptid	Männliche Drüsen	Weibchen	orexigen ¹⁰
sNPF	Gehirn	Gehirn	orexigen ¹¹

Bisher ist das Zusammenspiel zwischen appetitanregenden und appetitreduzierenden Neuropeptiden nicht hinreichend genau geklärt worden (Söderberg et al., 2012). Dies gilt sowohl für Neuropeptide bei Vertebraten als auch für Neuropeptide bei Invertebraten. Aufgrund der größeren Komplexität des Nervensystems der Vertebraten kann jedoch auf Organismen zurückgegriffen werden, deren Komplexität überschaubarer ist, wie zum Beispiel bei der Taufliege *Drosophila melanogaster*.

2.4 Die Taufliege Drosophila melanogaster als Modellorganismus

Drosophila melanogaster eignet sich als Modellorganismus hervorragend für die Erforschung des Nervensystems. In Komplexität zwischen dem Fadenwurm *C. elegans* und dem Säugetier angeordnet (Gordon und Scott, 2008), ermöglicht die Taufliege derzeit die am weitesten ausgereifte genetische Manipulation von allen höheren Eukaryoten (Venken et al., 2011). Die Erforschung komplexer Nervensysteme dient unter anderem dem allgemeinen Verständnis, wie neuronale Schaltkreise und Netzwerke das Verhalten von Tieren steuern. Erkenntnisse aus weniger komplexen Nervensystemen, wie dem der Taufliege, können gegebenenfalls auf komplexere Nervensysteme, wie dem des Menschen, übertragen werden. So gibt es verschiedene genetische Werkzeuge, um gezielt Neurone und Gene zu manipulieren, zu lokalisieren und "an- oder auszuschalten" (Venken et al., 2011). Basierend auf der Fragestellung, wie Verhaltensweisen generiert werden, ist es beispielsweise möglich, die Funktion verschiedener Gene und Neurone zu erforschen oder

zu erfahren, welche Nervenzellen an welchem neuronalen Schaltkreis beteiligt sind und wie genau spezifische Informationen verarbeitet werden. Um die Rolle identifizierbarer Neurone für bestimmte Verhaltensweisen zu erforschen, kann man die Aktivität und die Funktion von Neuronen steigern oder senken und beobachten, ob das Tier Veränderungen im Verhalten aufweist. Eine der größten Vorteile der Taufliege Drosophila melanogaster ist die Verfügbarkeit von Balancerchromosome. Balancerchromosome unterdrücken die **DNA-Rekombination** mit den homologen Chromosomen. Zudem sind Balancerchromosome homozygot letal und tragen einen dominanten Marker, dessen Expression in adulten Fliegen sichtbar ist. Dadurch können Transgene in den Fliegen nachverfolgt werden, sich stabil halten und nicht mit dem homologen Chromosomen rekombinieren (Greenspan, 2004; Lattao et al., 2011). Weiterhin bieten binäre Expressionssysteme, wie das UAS/Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993), einen enormen Vorteil, wenn es darum geht, Trans-Gene in bestimmten oder mehreren Populationen von Neuronen zu exprimieren (Venken et al., 2011). Hierbei wird ein Transkriptionsfaktor, z.B. das Regulator-Element Gal4, das unter der Kontrolle eines zellspezifischen Promotors steht, exprimiert. Kreuzt man diese sogenannte "Treiber-Linie", die Gal4 exprimiert, mit einer "Responder-Linie", bindet das Gal4-Protein an die UAS-Sequenz (Upstream Activation Sequence) und bewirkt dadurch die Expression des Genes, welches an die UAS Sequenz gekoppelt ist (Abb. 3) (Brand und Perrimon, 1993; Venken et al., 2011).



Abb. 3. Das UAS/Gal4-System.

Das Transaktivatorprotein Gal4 wird in einer Fliegenlinie ("Driver-Line") exprimiert. In dem zweiten Fliegenstamm" ist die UAS Sequenz vor dem Zielgen (X) gekoppelt (Effektor-Linie). Nach der Kreuzung der beiden Fliegenstämme befinden sich das Gal4 und das UAS in der gleichen F1-Generation. Das Protein Gal4 bindet an der UAS-Sequenz und das Zielgen wird exprimiert (modifiziert nach Brand und Perrimon, 1993).

Abbildung 3 zeigt die oben beschriebene Funktionsweise des binären Transkriptionssystems. Ein Transaktivator, dessen Expression über einen schwachen Promotor reguliert wird, bindet upstream an der Bindestelle, woraufhin das Responder-Element in downstream-Richtung abgelesen und transkribiert wird. An Hand des UAS/Gal4-Systems können bei dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* einzelne Komponenten des Nervensystems und deren Einfluss auf das Verhalten untersucht werden. Um herauszufinden, welche Neurone für welche spezifischen Verhaltensweisen notwendig und ausreichend sind, kann man Neurone "ausschalten" oder "aktivieren".

Um Neurone gezielt zu ablatieren, kann z.B. das Drosophila-Protein "Reaper" (Gen: rpr) genutzt werden (White et al., 1996). Das Protein "Reaper" induziert in der Entwicklung den programmierten Zelltod von spezifischen Neuronen (White et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit, um Neurone der Taufliege zu manipulieren, ist es, das Membranpotential der Nervenzellen zu hyperpolarsieren. Dieses "Silencing" von Neuronen ist entsprechend mit verschiedenen Verfahren, wie dem Blockieren von depolarisierenden Membranpotential-Veränderungen möglich (Hodge, 2009). Bei dieser Methode wird ein einwärts gleichrichtender K⁺ Kanal (Kir2.1) (Baines et al., 2001) in der jeweiligen Zielzelle überexprimiert. Dieser Kanal öffnet bereits bei dem Ruhemembranpotential. Folglich wird die Nervenzelle hyperpolarisiert und kann nicht mehr depolarisiert werden (Hodge, 2009). Eine weitere elegante Methode, um Neurone "stillzulegen", ist die Überexprimierung des Drosophila "Offener Gleichrichter K⁺-Kanal" (dORKΔ) (Nitabach et al., 2002). Der dORK-Kanal verhält sich wie ein Kalium-selektives "Loch" in der Zellmembran. Nitabach und Kollegen exprimierten dORK in Oozyten des Afrikanischen Krallenfrosches (Xenopus *laevis*) und fanden, dass das Ruhemembranpotential von -40mV auf -90mV sinkt. Daher ist der dORK-Kanal geeignet, um gezielt Neurone stillzulegen. Durch eine Überexpression des Kanals wird sich das Ruhemembranpotential der Zellmembran dem Gleichgewichtspotential von Kalium annähern. Folglich kann die Zelle nicht mehr depolarisiert werden (Nitabach et al., 2002; siehe Abbildung 4).



Abbildung 4. Der *Drosophila* Offene Gleichrichter K^+ dORK als Methode zur Stilllegung von Zellen.

Transmitter oder Neuropeptide aktivieren Liganden gesteuerte Kationenkanäle oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (hier nicht gezeigt), dadurch können Calcium (Ca^{2+}) und Natrium (Na^+) in die Zelle einströmen und diese depolarisieren. Bei einer verstärkten Expression des dORK Kanals diffundiert Kalium (K^+) aufgrund des Gleichgewichtspotentials aus der Zelle und senkt das Ruhemembranpotential der Zelle auf -90mV. Die Zelle kann nicht mehr elektrisch erregt werden. Abbildung modifiziert nach Nitabach et al., (2002).

Eine weitere, elegante Methode zur "Stilllegung" von Zellen ist es, die synaptische Transmitter Ausschüttung zwischen den Synapsen zu unterbinden. Hierfür wurde eine hitzesensitive Mutation des Dynamin Gens von *Drosophila (shibire^{ts1})* mit dem UAS/Gal4-System kombiniert (Chen et al., 1991; van der Bliek und Meyerowitz, 1991; Kitamoto, 2001; Kitamoto, 2002). Es ist essentiell für das Vesikel-Recycling der präsynaptischen Endigung (Kosaka und Ikeda, 1983). Dynamin ist eine 100-kDA GTPase und vermittelt die Abschnürung der Clathrin-ummantelten Vesikel an der Plasmamembran; ohne funktionierendes Dynamin "kleben" die Vesikel an der Plasmamembran und stehen für eine weitere Transmitterausschüttung nicht mehr zur Verfügung (Henley et al., 1999; Abbildung 5). Bei der *shibire^{ts}*-Mutante ist eine einzelne Aminosäure in der GTPase Domäne substituiert, so dass dieses Enzym bei höheren Temperaturen inaktiviert ist (Kitamoto, 2001; Kasuya et al., 2009). Die temperaturabhängige Inaktivierung des Enzyms ist reversibel (Kitamoto, 2001).



Abbildung 5. Schematische Darstellung zur Störung der synaptischen Übertragung durch Expression von shibire^{ts}.

Das temperatursensitive Protein Shibire^{ts} (shi^{ts}) wird exprimiert und ab einer Temperatur von ca. 32°C funktionell inaktiviert. Folglich ist das Recycling der Vesikel unterbrochen. Dieser Vorgang ist reversibel, d.h. bei einer geringeren permissiven Temperatur können sich die Vesikel von der Plasmamembran abschnüren. Abbildung modifiziert nach Kasuya et al., (2009).

~ 20 ~

Einleitung

Eine andere Möglichkeit, um neuronale Aktivität artifiziell zu steuern, beruht auf der Entwicklung des Gal4-Repressors Gal80 (Lee und Luo, 1999; Riemensperger et al., 2012). Bei einer Ko-Expression des Proteins Gal80 bindet dieses an eine 28 Aminosäuren lange Sequenz am C-Terminus des Gal4 Proteins (Melcher und Xu, 2001). Diese Bindung blockt das Gal4 Protein (Wu et al., 1996; siehe Abb. 6). Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, das Ablesen des Zielgens zu verhindern und erst durch Temperaturstimulus zu induzieren. Dies kann man mit Hilfe des temperatursensitiven Gal80-Proteins erreichen (Zeidler et al., 2004). Bei Temperaturen unter 25°C bindet das temperaturempfindliche Gal80 Protein zuverlässig an Gal4 und verhindert die Transkription des Zielproteins. Bei einer Temperatur von 29°C löst sich Gal80 vollständig von Gal4 und das Zielgen kann abgelesen werden (Zeidler et al., 2004; Abb. 6).



Abb. 6. Schematische Darstellung des UAS/Gal4-Systems in Kombination mit Gal80. Das Protein Gal80 bindet an Gal4 und unterdrückt dadurch effizient die Expression des Zielgens (X). Bei einer Temperatur ab 29°C löst sich das Protein Gal80 vollständig vom Gal4-Protein. Somit kann Gal4 an die UAS-Sequenz binden, wodurch das Zielgen exprimiert wird (Lee und Luo, 1999; Abbildungen der Fliegen aus Brand und Perrimon, 1993; Abbildung modifiziert nach Riemensperger et al., 2012).

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein konservierter Prozess zur Regulation der Translation, der in fast allen Eukaryoten zu finden ist (Fire et al., 1998; Hammond et al., 2000; Hannon, 2002; MacRae et al., 2006). Bei der RNA-Interferenz besteht der erste Schritt in der Applikation oder Expression doppelsträngiger RNA (dsRNA). Die dsRNA bindet an eine Endoribonuklease, genannt DICER, die die doppelsträngige RNA in kurze, ebenfalls doppelsträngige Fragmente zerschneidet (Hannon, 2002). DICER ist ein RNase-III-ähnliches Enzym (Lee et al., 2004), welche zwei RNase-III und eine PAZ-Domäne enthält (MacRae et al., 2006). Die PAZ-Domäne erkennt und bindet spezifisch an den 3'-Zwei Basen-Überhängen der dsRNA (Song et al., 2003). Die gebundene, doppelsträngige RNA wird dann durch die zwei Ribonukleasene III-Domänen in kurze, einzelsträngige 21-25bp große Fragmente geschnitten (Rand et al., 2005; MacRae et al., 2006), die short interfering RNA (siRNA) genannt werden (Hammond et al., 2000). DICER katalysiert den ersten

Schritt in der RNA-Interferenz. Nach der Zerschneidung binden die RNA-Fragmente an den DICER2/R2D2 Komplex, der essentiell für die Bildung des RNA-induced silencingcomplex (RISC) ist (Lee et al., 2004; Rand et al., 2005). RISC beinhaltet die Endonuklease Argonaute2 (Ago2), die siRNA bindet und dieses Fragment als Erkennungsmuster für die Nukleaseaktivität von Ago2 nutzt (MacRae et al., 2006). An das siRNA Fragment bindet nun nach der Watson-Crick Basenpaarung die messenger RNA (mRNA) und daraufhin Ago2 zwischen der zehnten und elften Phosphodiester Bindung des 5'-Stranges (MacRae et al., 2006). Daher fungiert die RNA-Interferenz als Gen-spezifischer Abwehrmechanismus der mRNA (Hannon, 2002). Schematisch ist dieser Prozess in Abbildung 7 dargestellt.



RISC schneidet Ziel mRNA

Abbildung 7. Mechanismus der RNA-Interferenz-Technik.

Im ersten Schritt bindet DICER an die doppelsträngige RNA und zerschneidet diese in kleine siRNA Fragmente. Diese Fragmente binden anschließend an den RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex). Der RISC-Komplex ist nun aktiviert. Sobald mRNA an die komplementären Basen der siRNA bindet, werden diese durch die Endonuklease Argonaute2 und geschnitten somit unbrauchbar gemacht. Abbildung modifiziert von Campell und Choy, (2005).

Komplementär zum "Silencing" durch Expression von K⁺-Kanälen, kann neuronale Aktivität über Kationenkanäle gesteigert werden. Ein beliebtes Werkzeug für derartige genetische Manipulationen stellt der temperaturabhängige Kationenkanal dTrpA1 dar (Hamada et al., 2008). Der dTrpA1 Ionenkanal ist ein Mitglied der TRP-Familie, ist sensitiv gegenüber Temperaturen über 27°C und bildet eine Grundlage für die Wärmevermeidung der Taufliege (Rosenzweig et al., 2005; Hamada et al., 2008; Rosenzweig et al., 2008; Pulver et al., 2009; Hodge, 2009).



Abbildung 8. Wirkungsweise des *Drosophila* Transient Rezeptor Potential Kanals A1 (dTrpA1).

Der temperatursensitive Kationenkanal dTrpA1 ist ein 6-Transmembran-Protein, dessen Domänen die Lipiddoppelschicht durchziehen. Dieser Kanal ist bei 18°C geschlossen, aber ab einer Temperatur von 27°C vollziehen die Domänen eine Konformationsänderung, so dass Kationen aus dem extrazellulären Raum in die Zelle einströmen können und diese depolarisiert wird. Abbildung modifiziert nach Montell, (2005).

Eine weitere Strategie, um die neuronale Aktivität zu beeinflussen, wurde von Nagel et al. auf (2003)beschrieben. Diese Strategie beruht der Charakterisierung des Channelrhodopsin (CHR-1, CHR-2 und VChR-1) der Grünalgen Chlamydomonas reinhardtii und Volvox carteri (Nagel et al., 2003; Zhang et al., 2008; Fiala et al., 2010). Zur neuronalen Manipulation wird Channelrhodopsin2 (ChR-2) am geläufigsten verwendet. Channelrhodopsine gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wobei ChR-2 ein nicht spezifischer Kationenkanal ist (Nagel et al., 2003). Das Protein ChR-2 bindet all-trans-Retinal (Fiala et al., 2010), ein durch Licht isomerisierbares Chromophor (Nagel et al., 2003). Bei einer Belichtung von ca. 480nm wird das Licht durch das Retinal absorbiert und zu 11-cis-Retinal isomerisiert, wodurch das Protein seine Konformation ändert (Nagel et al., 2003). Die Konformationsänderung des Proteins verursacht das Öffnen des Kanals (Nagel et al., 2003), wodurch Natrium und Calcium in die Zelle einströmen und diese depolarisiert wird (Fiala et al., 2010). Nach kurzer Zeit relaxiert das 11-cis Retinal zurück zum all-trans-Retinal, wodurch der G-Protein-gekoppelte Rezeptor geschlossen wird und somit der Ionenfluss unterbrochen wird (Nagel et al., 2003). Channelrhodopsin2 eröffnet in der Optogenetik viele Möglichkeiten, die Funktion bzw. Effekte von Neuronen zu studieren, da Zellen innerhalb von Millisekunden depolarisiert werden können (Zhang et al., 2007). In Abbildung 9 ist die optogenetische Strategie zur Manipulation von Neuronen dargestellt, modifiziert nach Fiala et al. (2010).



Abb. 9. Optogenetische Strategie zur Aktivierung von Neuronen mittels Channelrhodopsin-2.

Das Protein Channelrhodopsin2 hat das Chromophor, all-trans-Retinal, kovalent gebunden, welches sensitiv für Licht mit der Wellenlänge von ca. 480nm ist. Belichtung mit blauem Licht führt zu einer Konformationsänderung des all-trans-Retinal zu 11cis-Retinal und zu einer Öffnung der Pore. Dadurch können Natrium und Calcium in die Zelle einströmen und depolarisieren (modifiziert nach Fiala et al., 2010).

Alle eingeführten Techniken zur Manipulation von Neuronen beruhen auf Genexpressions-Systemen. Das UAS/Gal4 System hat jedoch seine Grenzen. In diesem Expressionssystem können bei "enhancer trap lines" oder Promotor-getriebenen Transgenen auch Zellen, die nicht von Interesse sind, manipuliert werden. Dieser Umstand erschwert es, den gefundenen Phänotyp den spezifischen Zellen zuzuordnen (Potter et al., 2010). Aufgrund dieser Limitation haben Potter et al. (2010) das Q-System entwickelt (Abb. 10). Das Q-System nutzt regulatorische Gencluster des roten Schimmelpilzes *Neurospora crassa* (Potter et al., 2010). Dieses Gencluster enthält fünf Strukturgene und zwei Regulator Gene, qa 1F = QF und qa 1S = QS. QF ist ein transkriptionaler Aktivator, welcher upstream an einer 16bp Sequenz, QUAS, bindet und die Expression des Zielgens aktiviert (Potter et al., 2010; Abb. 10).



Abbildung 10. Schematische Wirkungsweise des Q-Systems.

In der Abwesenheit des Transkriptionsfaktors QF wird das Zielgen nicht transkribiert, es folgt somit keine Gen-Expression. Es kommt zu einer Expression des Zielgens erst dann, wenn der Trankriptionsfaktor (QF) und QUAS in der gleichen Zelle vorhanden sind (Abb. modifiziert nach Potter et al., 2010); Abbildungen der Fliegen aus Brand und Perrimon, (1993). Ein drittes, binäres Expressionssystem ist das LexA/LexAOP System, das 2006 von Lai und Lee entwickelt wurde (Abb. 11). Hier wurden die Gal4-Domäne und eine bakterielle Bindungsdomäne des LexA-Proteins fusioniert. Als Ergebnis wurde eine LexA-"Driver-Linie" geschaffen. Bei den Effektor Linien wird vor dem Zielgen eine LexA-Operator Sequenz (LexAOP) eingefügt (Lai und Lee, 2006). LexA bindet an LexAOP, dies führt zur Expression des Zielgens (Abb. 11).



Abb. 11. Schematische Darstellung des LexA/LexAOP Systems.

Das Protein LexA bindet an die LexAOP Sequenz und führt zur Expression des Zielgens. Das Protein LexA bindet an die LexAOP Sequenz und löst dadurch die Transkription des Zielgens aus. Abb. modifiziert nach Lai und Lee, (2006); Abbildungen der Fliegen aus Brand und Perrimon, (1993).

Die Kombination von zwei binären Systemen kann unter anderem dazu benutzt werden, Kontakte zwischen zwei Zellen zu lokalisieren, z.B. mit Hilfe der GRASP-Technik (Feinberg et al., 2008). Typischerweise trennen im Gehirn zwei synaptische Partner nur 100nm voneinander. Diese Distanz kann durch ein Transmembran-Protein überbrückt werden (Feinberg et al., 2008). Dies ist die Grundlage der split-GFP-Technik. Das erste Fragment, genannt spGFP1-10 enthält 10 von 11 Stränge der "Beat-Barrel" Struktur mit 214 Aminosäuren des besonders stabilen GFP-Proteins. Das zweite Fragment, genannt spGFP11, enthält den 11ten Strang mit 16 Resten des GFP-Beta-Barrels (Feinberg et al., 2008). Beide Fragmente fluoreszieren nicht, sondern nur, wenn sich beide split-GFP-Fragmente in enger räumlicher Nähe zueinander befinden (Feinberg et al., 2008; siehe Abbildung 12). In der Fliege kann mittels binärer Expressionssysteme ein Teil des split-GFP mittels UAS/Gal4 in einer Population von Neuronen exprimiert werden, das andere mittels LexA/LexAOP in einer anderen Population von Neuronen (Feinberg et al., 2008).



Abb. 12. Schematische Darstellung der split-GFP Technik.

Die split-GFP Technik kann benutzt werden, um Kontakte zwischen zwei Membranen in lebenden Organismen zu markieren (Feinberg et al., 2008). Zwei komplementäre GFP-Fragmente werden in zwei unterschiedlichen Zellen exprimiert. Wenn beide Fragmente in enger Nachbarschaft sich zueinander befinden fusionieren diese zu einem fluoreszierenden-Protein und das GFP Signal kann visualisiert werden (Feinberg et al., 2008; Abbildung von Ulrike Pech).

Eine Möglichkeit, die neuronale Aktivität zu messen besteht durch der Calcium Imaging, erstmals beschrieben in der neuromuskulären Endplatte in Larven von (Reiff et al., 2002) und im zentralen Gehirn von *Drosophila melanogaster* (Fiala et al., 2002). Darüber hinaus kann durch die Kombination mehrerer binärer Systeme eine Zellpopulation aktiviert und der direkte Effekt in einer anderen Zellpopulation mittels genetisch kodierter Calciumsensoren visualisiert werden. Die Entwicklung des Calcium-Sensors G-CaMP, bestehend aus einem modifizierten GFP-Molekül, hatte enormen Einfluss auf die Weiterentwicklung des *in-vivo* Calcium Imaging (Nakai et al., 2001). Dieses Protein ist am N-Terminus mit einem M13-Fragment verbunden und weist eine hohe Affinität zu Ca²⁺ auf. Darüber hinaus ist das M13-Fragment die Zielsequenz von Calmodulin und sobald Ca²⁺ am Calmodulin bindet, vollzieht sich eine Konformationsänderung (Nakai et al., 2001). Hervorgerufen durch die Konformationsänderung ändert sich ebenfalls die emittierte Fluoreszenzintensität (Nakai et al., 2001; Tian et al., 2009; Koldenkova und Nagai, 2013) (Abb. 13).



Abbildung 13. Schematischer Aufbau und Funktion des Proteins G-CaMP.

G-CaMP ist ein einzelnes zirkulierendes Protein, dass Calmodulin am C-Terminus und eine M13-Domäne am N-Terminus besitzt. Ca^{2+} bindet am Calmodulin, wodurch eine Konformationsänderung hervorgerufen wird und es zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität kommt. Abbildung modifiziert aus Koldenkova und Nagai, (2013). 2.5 SIFamid: ein Neuropeptid mit bislang unklarer Funktion

Das Neuropeptid AYRKPPFNGSIFamide (SIFamide) der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, ist eine von zwei Varianten, die sich durch eine Aminosäure im N-Terminus voneinander unterscheiden und bei verschiedenen Insektenarten vorkommen. Entdeckt wurde das Neuropeptid im Rahmen einer umfassenden Isolationsarbeit aus den Extrakten von 350000 Fleischfliegen der Gattung *Neobellieria bullata* (Jannsen et al., 1996). Sowohl das Neuropeptid als auch die SIFamid-Rezeptoren kommen hochgradig konserviert bei allen bislang untersuchten Arthropoden vor (Jørgensen et al., 2006).

Beschrieben wurde SIFamid in der Honigbiene Apis mellifera (Verleyen et al., 2004), im Tabakschwärmer Manduca sexta (Heuer et al., 2011), im Seidenspinner Bombyx mori (Roller et al., 2008), in der Erbsenlaus Acyrthosiphon pisum (Verleyen et al., 2009). In Tribolium castaneum (Li et al., 2008), dem rotbraunen Reismehlkäfer, wurde SIFamid mit Hilfe von Massenspektrometrie im Gehirn nachgewiesen. Des Weiteren wurden in der Amerikanischen Großschabe Periplaneta americana (Neupert et al., 2011) dichte Aborizationen im Neuropil der Antennalloben und des Tritocerebrum nachgewiesen, die SIFamid-immunreaktiv waren. Darüber hinaus wurde SIFamid in der Hirschzecke Ixodes scapularis (Šimo et al., 2009) gefunden. In dieser Spezies wurde gefunden, dass SIFamiderge Neurone die Speicheldrüsen der Hirschzecke innervieren. Es wird angenommen, dass das Neuropeptid SIFamid eine Rolle bei der neuronalen Kontrolle der Speicheldrüsen hat (Šimo et al., 2009). SIFamid konnte auch in Crustaceen, wie Procambarus clarkii (Yasuda et al., 2004), nachgewiesen werden. Yasuda et al. (2004) fanden, dass SIFamid im olfaktorischen System des Lousiana-Flusskrebses Procambarus clarkii und dort als Modulator wirkt. SIFamid wurde auch noch in weiteren Crustacea gefunden, wie dem Amerikanischen Hummer Homarus americanus (Christie et al., 2006). Hier wurde gefunden, dass SIFamid verstärkt in endokrinen Zellen im Magen vorkommen. Eine Injektion von SIFamid führte zu einer Stimulation der Muskelkontraktion des Magenpförtnermuskels, welcher den Durchfluss von Nahrungspartikel in den Vorderdarm zum Mitteldarm reguliert (Christie et al., 2006). Ebenso konnte SIFamid im gemeinen Wasserfloh Daphnia pulex nachgewiesen werden (Verleyen et al., 2009). In Scorpiops jemdiki wurden kürzlich zwei weitere Isoformen (ESRNPPLNGSMFamide und ESKNPPLNGSMFamide) des Neuropeptids SIFamid nachgewiesen (Christie et al., 2010). Terhzaz et al. (2007) fanden anhand von Drosophila, dass SIFamid einen Einfluss auf das Sexualverhalten der Taufliegen ausübt. In dieser Studie wurde die Konzentration von SIFamid mit Hilfe der RNA Interferenz-Technik reduziert oder Zellen mit Hilfe von "Reaper" ablatiert.

In der Taufliege *Drosophila melanogaster* wird das Neuropeptid SIFamid in vier neurosekretorischen Zellen im *Pars intercerebralis* gebildet (Terhzaz et al., 2007). In Immunofärbungen konnte SIFamid im gesamten Gehirn, aber vermehrt in den Antennalloben nachgewiesen werden (Terhzaz et al., 2007). Terhzaz et al. (2007) konnten zeigen, dass männliche *Drosophila melanogaster* ein verstärktes Balzverhalten zu anderen männlichen Artgenossen aufweisen. Weibliche Taufliegen waren empfänglicher für das Balzen der Männchen (Terhzaz et al., 2007). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass SIFamid das Balzverhalten der Fruchtfliege unterdrückt (Terhzaz et al., 2007). SIFamid steht somit seit der Entdeckung stärker im Fokus der Wissenschaft, jedoch ist die Funktion dieses Neuropeptides weitgehend ungeklärt.

2.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle des Neuropeptides SIFamid bezüglich des Verhaltens von *Drosophila melanogaster* genauer zu untersuchen. Laut einer Studie von Terhzaz soll AYRKPPFNGSIFamide (SIFamide) einen Einfluss auf das Sexualverhalten der Taufliege ausüben (Terhzaz et al., 2007). Die Verzweigungen der Neurone, die SIFamid ausschütten, sind im Gehirn von *Drosophila* beschrieben (Verleyen et al., 2004; Terhzaz et al., 2007). Unklar ist jedoch, ob diese Zellen spezialisierte Dendriten haben und welche Bereiche des Gehirns die putativen Dendriten der SIFamidergen Neurone innervieren. Zudem ist es interessant zu ermitteln, welche anderen Neuropeptide die Aktivität der SIFamidergen Neurone beeinflussen. Dies kann anatomisch mit immunhistochemischen Färbungen detektiert und durch physiologische Messungen mit Hilfe von *in-vivo* Calcium-Imaging geklärt werden.

In dieser Arbeit sollen zwei unabhängige Expressionssyteme miteinander kombiniert werden. Hierfür war es unerlässlich, neue transgene Fliegen zu kreieren, zum einem eine Linie, bei der LexA unter der Kontrolle des SIFamid Promotors steht, und eine dTRPA1-mCherry Linie unter der Kontrolle von LexAOP. Anschließend sollen diese neuen Fliegenlinien charakterisiert und auf ihre Funktionsfähigkeit getestet werden. Mit Hilfe der Kombination des UAS/Gal4- und des LexA/LexAOP-Systems soll abschließend die mögliche neuronale Wirkungsweise der SIFamidergen Neuronen geklärt werden. Dadurch sind wir in der Lage, die SIFamidergen Neurone artifiziell mit einem Temperaturstimulus zu aktivieren und gleichzeitig die neuronale Aktivität mi Hilfe eines Calcium-Sensors GCaMP3.0 in potenziellen Effektorzellen zu messen. Zum Beispiel sollte die Wirkung von SIFamid auf neuronale Schaltkreise am Beispiel Duft-induzierter Aktivität im Antennallobus untersucht werden.

Darüber hinaus soll mit Hilfe der split-GFP-Technik die SIFamidergen Neuronen in ein mögliches Netzwerk eingeordnet werden, das die neuronale Grundlage zur Nahrungsaufnahme bildet. Auch hier ermöglicht der Einsatz von zwei unabhängigen binären Expressionssyteme einen Teil des split-GFP Systems in den SIFamidergen Neuronen zu exprimieren, während der komplementäre Teil des split-GFPs in distinkten Zellpopulationen exprimiert werden kann.

Des Weiteren soll die Rolle des Neuropeptides SIFamid in Verhaltensexperimenten untersucht werden. Hierfür soll das Verhalten von genetisch manipulierten Fliegen während einer thermisch induzierten Aktivierung des temperatursensitiven Ionenkanals dTrpA1 und damit einhergehender verstärkter Depolarisation der SIFamidergen Neurone getestet werden. Dies soll über eine Reihe von Verhaltensexperimenten, unter anderem zur Duftpräferenz, zur Nahrungsaufnahme, zum Rüsselreflex und zum Balzverhalten geschehen.

Die Ergebnisse sollen dazu dienen, Erkenntnisse darüber zu erhalten, ob SIFamid das Verhalten, und wenn ja, in welchem Funktionskontext verändert. Im Fokus dabei steht eine hypothetische Rolle von SIFamid bei der Nahrungsaufnahme und Verhaltensweisen im Kontext der Futtersuche.

3. Materialien

Dieser Abschnitt gibt in tabellarischer Form eine Übersicht über die Geräte, Chemikalien und Reagenzien, die im Laufe der Arbeit genutzt wurden.

3.1 Geräte

Geräte	Herkunft/Firma
2-Photonen-Mikroskop, LSM-7-MP, Software:	Zeiss
ZEN2011, Objektiv: WPlan-Apochromat 20x1	
Wasser, Laser: Cameleon Coherent.	
Binokulare (Stemi2000)	Zeiss
Box für T-Maze (90cm x 64cm x 62cm)	Institutswerkstatt, Bild siehe Seite 61
Box für Balzverhaltensexperimente	Institutswerkstatt, Bild siehe Seite 56
Box für Rüsselreflexexperimente	Institutswerkstatt, Bild siehe Seite 56
(Gleiche Box, wie für die Balzverhaltens-	
experimente	
C1000 Touch TM Thermal Cycler	Bio-Rad
Balzarena	Institutswerkstatt, Bild siehe Seite 56
Digitalkamera für Aufnahme des Balzverhaltens	Sony DCR-SR57
ELISA Reader EPOCH	BioTek Instruments GmbH
Gel-Kammern	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Genoplex für Gel Dokumentation	VWR International
Halogen Heizgerät	Elta GmbH, Art. Nr. 9738
Klemmkragen für Rüsselreflexexperimente	Institutswerkstatt, Bild siehe Seite 64
Inkubator für Fliegenzucht	Binder, KBWF 720 E5.2
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Leica TC SP2
Kühlzentrifuge	Eppendorf, 5804R
Fluoreszenz Stereomikroskop LED Bino, Axio	Zeiss
Cam	
Luftbefeuchter für konstante Luftfeuchtigkeit	Wick, Art. Nr. 3100-E
Luftfeuchtigkeitsmessgerät	Conrad Electronics, Art. Nr. 561092

Magnetrührer	IKA, Art. Nr. RH B2
Mikrowelle	Alaska, Art. Nr. MWD2923G
PCR-Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH
Peristaltik-Pumpe	MS-CA 4/820, Ismatec GmbH
Temperaturmessgerät	TFA 37.3000 Thermo Timer
Thermomixer compact	Eppendorf
Vakuum Pumpe	Art. Nr. 847-676-8806
	Welch Vacuum Technology, Inc.
Tischkühlzentrifuge	Thermoscientific, Heraeus Fresco 21
Tischzentrifuge	Thermoscientifc, Heraeus Pico 17
UV-Transilluminator BioView	Biostep GmbH
Vortex Genius 3	IKA, Vortex Genius 3
Waage	Kern EG
Wärmeschrank	Heraeus
Wasserbad	Memmert GmbH

3.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Herkunft/Firma	
Alu-Folie	Roth, Art. Nr. 1399.1	
Deckgläser, 18 x 18mm	Menzel Gläser, Art. Nr. BB018018A1	
DNeasy Kit (Blood & Tissue)	Qiagen, Art. Nr. 69504	
Gelblot Filterpapier	Whatman, Art. Nr. 10426892	
Injektionsnadel	Braun, Sterican, Art. Nr. 4665120	
iScript [™] cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Art. Nr. 170-8891	
Objektträger	Th. Geyer Gruppe, Art. Nr. 7695021	
Parafilm	Roth, Karlsruhe, Art. Nr. 11951.1	
Plasmid-Midi Kit	Qiagen, Art. Nr. 12143	
Plexiglasgefäß (klein \emptyset 64mm)	Greiner Bio-one, Art. Nr. 205101	
Plexiglasgefäß (mittel \emptyset 82mm)	Greiner Bio-one, Art. Nr. 217101	
Plexiglasgefäß (groß \varnothing 100mm)	Greiner Bio-one, Art. Nr. 960177	
Protemp [™] II 3M ESPE	3M Deutschland GmbH, Art. Nr. 46090	
Ma	teria	lien
----	-------	------

Rasierklinge	Martor Solingen, No. 35
RNAse-Free DNase Set	Qiagen, Art. Nr. 79254
Rneasy Kit (RNA Extraction)	Qiagen, Art. Nr. 74004
SsoFast TM Probes Supermix	Bio-Rad, Art. Nr. 172-5231

3.3 Chemikalien

Chemikalien	Firma
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Art. Nr. 200-464-6
Agarose	Biozym, Art. Nr. 840004
Chloroform	Merck, Art. Nr. 2431
Einbett Lösung VECTASHIELD	Vector Laboratories, USA, Art. Nr. H-100
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Art. Nr. 2218.2
Ethanol	Merck KGaA, Art. Nr. 603.002.005
Isopropanol	Merck KGaA, Art. Nr. K31802934310
Rote Lebensmittelfarbe	Ruth, Bochum, Art. Nr. L3138
Saccharose	AppliChem, Art. Nr. A4734
TEMED	Carl Roth GmbH, Art. Nr. 2367.3
Trizol	Invitrogen, Art. Nr. 15596-026
Tween ^R -20	Carl Roth GmbH, Art. Nr.9127.1
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Art. Nr. 3051.2

3.4 Enzyme

Für die Generierung neuer transgener Fliegen wurden nachfolgende Reagenzien benutzt. Die Enzyme stammten von Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wenn nicht anders angegeben. Verwendet wurden NheI, MluI, BcuI, NotI, Dream Taq Polymerase, LR-Klonase Mix Reaction (Invitrogen), dNTPs und das TOPO Cloning Kit (Invitrogen).

3.5 Antibiotika

Ampicillin und Spectinomycin wurde von Sigma Aldrich bezogen. Jedes Antibiotikum wurde in einer Stocklösung bei -20°C gelagert. Genutzt wurden die Antibiotika in einer Endkonzentration von 100µg/ml.

3.6 Duftstoffe

Duftstoffe	Firma
Benzaldehyd	Fluka [®] Analytical, Art. Nr. 1201-250ML-F
Ethylacetat	Sigma-Aldrich, Art. Nr. 270989-100ML
Mineralöl als Lösungsmittel	Sigma-Aldrich, Art. Nr. M8410-1L

3.7 Lösungen und Medien für die Molekularbiologie

S.O.C. Medium (super optimal broth with catabolite repression):

Diese Medium wurde aus dem pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit von Invitrogen entnommen. Es enthält folgende Reagenzien:

- 2 % Tryptone
- 0,5% Hefe-Extrakt
- 10mM NaCl
- 2,5mM KCl
- 10mM MgCl₂
- 10mM MgSO₄
- 20mM Glukose

Salz Lösung:

- 1,2M NaCl
- 0,06M MgCl₂

Standard LB Medium (lysogeny broth medium):

Um 1 Liter vom LB-Medium herzustellen wurden

- 950ml ddH₂O
- 10g Bacto-Trypton
- 5g Hefe Extrakt
- 10g NaCl

vermischt und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde mit ddH₂O auf 11 aufgefüllt und autoklaviert.

LB-Agar-Platten:

- 11 LB Medium
- 15g Agar

wurden vermischt und autoklaviert. Nach kurzer Abkühlzeit wurde 1ml der erforderlichen Antibiotika in das flüssige Medium gegeben. Lösung wurde dann in Petrischalen gegossen und ausgehärtet sowie bis zur Nutzung bei 4°C aufbewahrt.

3.8 Lösungen für Antikörperfärbungen

Rezept für die Fixierlösung: 4% Paraformaldehydlösung (PFA):

- Paraformaldehyd 2g
- 0,15M KH₂PO₄ 25ml
- 0,15M Na₂HPO₄, 6ml

PFA wurde abgewogen, mit dH₂O auf 15ml aufgefüllt, auf 58°C erhitzt und mit 1M NaOH geklärt. Dann wurden die restlichen Stoffe zugegeben und gut vermischt.

Rezept für die Ringerlösung (pH 7,4):

- 5mM HEPES-Puffer, pH 7,4
- 130mM NaCl
- 5mM KCl
- 2mM MgCl₂

- 2mM CaCl₂
- 36 mM Saccharose

Rezept für Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

- 130mM NaCl
- 7mM Na₂HPO₄
- 3mM KH₂PO₄

Die Stoffe wurden abgewogen und mit dH₂O aufgefüllt.

Rezept für PBS-Tx:

• PBS + 0,5% Triton X-100

Rezept für Blocklösung:

• PBS + Rinderserumalbumin (BSA) 2% oder "Normal Goat Serum"(NGS) 3%

3.9 Antikörper

3.9.1 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Firma/Spender	Verwendete	Referenz
			Verdünnung	
Anti-Corazonin	Hase	Ladislav Roller,	1:500	Roller et al., 2003
		Bratislava		
Anti-nc82	Maus	Erich Buchner,	1:50	Wagh et al., 2006
		Würzburg		
Anti-SIFamid	Hase	Jan Veenstra, Bordeaux	1:500	Terhzaz et al., 2007
Anti-SIFamid	Hase	Peter Verleyen, Leuven	1:500	Verleyen et al., 2004
Anti-dILP	Hase	Ernst Hafen, Zürich	1:500	Rulifson et al., 2002
Anti-RFP	Ratte	ChromoTek, 5f8	1:700	Rottach et al., 2008
Anti-sNPF	Hase	Jan Veenstra, Bordeaux	1:250	Lee et al., 2004
Anti-GFP	Maus	Sigma G 6539	1:200	Gordon und Scott, 2009
Anti-GFP	Huhn	Abcam 13970	1:50	Sykes und Condra, 2005
Anti-GFP	Maus	Invitrogen A 11120	1:500	Chalfie et al., 1994
Anti-TDC	Hase	Covalab pab0822-P	1:200	Pech et al., 2013

3.9.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Spezies	Firma/Spender	Verwendete Verdünnung
Anti-rat-Cy3	Ziege	Invitrogen A 10522	1:300
Anti-mouse Alexa 633	Ziege	Invitrogen A 11034	1:500
Anti-rabbit Alexa 488	Ziege	Invitrogen A 1101	1:250
Anti-chicken Alexa 488	Ziege	Invitrogen A 11039	1:250
Anti-mouse-Cy3	Ziege	Invitrogen A 10522	1:500

3.10 Organismen

3.10.1 Bakterienstämme

Die Bakterienstämme von *Escherichia coli* TOP10 und Mach1[™]-T1^R (pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®]Kit von Invitrogen) wurden für die molekulare Klonierung benutzt.

3.10.2 Fliegenstämme

Fliegenstämme	Referenz
Canton-S (CS)	Stocksammlung der Arbeitsgruppe
+/+	
Crz-Gal4 (II):	Choi et al., 2006
w ⁺ /+;Crz-Gal4;+/+	
GH146-Gal4 (II):	Stocker et al., 1997
w ⁺ /+;GH146-Gal4;+/+	
Hugin-Gal4 (III):	Melcher und Pankratz, 2005
w ⁺ /+;+/+;Hugin-Gal4	
LexAOp::dTrpA1mCherry (II):	Kobbenbring, diese Arbeit
w ⁺ /+;LexAOP::dTrpA1mCherry;+/+	
Dilp2-Gal4 (III):	Rulifson et al., 2002
w ⁺ /+;+/CyO;dILP2-Gal4/TM3sb	
UAS:Shibire ^{ts} (III):	Kitamoto, 2001
w ⁻ ;+;20xUAS-TTS-Shibire ^{ts1}	

Or83b-Gal4 (II):	Larson et al.,2004
w ⁺ /+;Or83b-Gal4;+/+	
SIFa2-Gal4 (II):	Terhzaz et al., 2007
w ⁺ /+;SIFa2-Gal4;+/+	
SIFa LexA (III):	Kobbenbring, diese Arbeit
w ⁺ /+;+/+;SIFa LexA	
sNPF-Gal4 (II):	Lee et al., 2004
w ⁺ /+;sNPF-Gal4;+/+	
SIFa2-Gal4;tubulin-Gal80 ^{ts} /TM3sb:	Kobbenbring, diese Arbeit
w ⁺ /+;SIFa2-Gal4;tubulin-Gal80 ^{ts} /TM3sb	
tubP-LexA::GAD;Pin/CyO,y+	Lai und Lee, 2006
UAS:Cameleon 2.1-82 (II):	Diegelmann et al., 2002
w ⁺ /+;UAS:Cameleon;+/+	
UAS:DenMark (I):	Nicolaï et al., 2010
w ⁺ /UAS:DenMark;+/+;+/+	
UAS:dTrpA1 (II):	Hamada et al., 2008
w ⁺ /+;UAS:dTrpA1;+/+	
UAS:Dicer (II):	Baumgardt et al., 2007
w ⁺ /+;UAS:Dicer;+/+	
UAS:GCaMP 3.0 (III):	Tian et al., 2009
UAS:GCaMP 3.0 (III): w ⁺ /+;+/+;UAS:GCaMP 3.0	Tian et al., 2009
UAS:GCaMP 3.0 (III): w ⁺ /+;+/+;UAS:GCaMP 3.0 UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP:	Tian et al., 2009 Birman, S. und Riemensperger, T.,
UAS:GCaMP 3.0 (III): w ⁺ /+;+/+;UAS:GCaMP 3.0 UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP: w ⁺ /UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP;+/+	Tian et al., 2009 Birman, S. und Riemensperger, T., unveröffentlicht
UAS:GCaMP 3.0 (III): w ⁺ /+;+/+;UAS:GCaMP 3.0 UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP: w ⁺ /UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP;+/+ UAS:hid;UAS:rpr (I):	Tian et al., 2009 Birman, S. und Riemensperger, T., unveröffentlicht Zhou et al., 1997
UAS:GCaMP 3.0 (III): w ⁺ /+;+/+;UAS:GCaMP 3.0 UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP: w ⁺ /UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP;+/+ UAS:hid;UAS:rpr (I): w ⁺ /UAS:hid;UAS:rpr;+/+;+/+	Tian et al., 2009 Birman, S. und Riemensperger, T., unveröffentlicht Zhou et al., 1997
UAS:GCaMP 3.0 (III): w ⁺ /+;+/+;UAS:GCaMP 3.0 UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP: w ⁺ /UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP;+/+ UAS:hid;UAS:rpr (I): w ⁺ /UAS:hid;UAS:rpr;+/+;+/+ UAS:RNA _i SIFamide (I):	Tian et al., 2009 Birman, S. und Riemensperger, T., unveröffentlicht Zhou et al., 1997 Terhzaz et al., 2007
UAS:GCaMP 3.0 (III): $w^+/+;+/+;UAS:GCaMP 3.0$ UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP: $w^+/UAS:sjb$ -GFP;UAS:CD8-GFP;+/+ UAS:hid;UAS:rpr (I): $w^+/UAS:hid;UAS:rpr;+/+;+/+$ UAS:RNA _i SIFamide (I): $w^+/UAS:RNA_i$ SIFamide;+/+;+/+	Tian et al., 2009 Birman, S. und Riemensperger, T., unveröffentlicht Zhou et al., 1997 Terhzaz et al., 2007
UAS:GCaMP 3.0 (III): w ⁺ /+;+/+;UAS:GCaMP 3.0 UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP: w ⁺ /UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP;+/+ UAS:hid;UAS:rpr (I): w ⁺ /UAS:hid;UAS:rpr;+/+;+/+ UAS:RNA _i SIFamide (I): w ⁺ /UAS:RNA _i SIFamide;+/+;+/+ w ⁺ /UAS:RNA _i SIFamide;SIFa2-	Tian et al., 2009 Birman, S. und Riemensperger, T., unveröffentlicht Zhou et al., 1997 Terhzaz et al., 2007 Kobbenbring, diese Arbeit
UAS:GCaMP 3.0 (III): w ⁺ /+;+/+;UAS:GCaMP 3.0 UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP: w ⁺ /UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP;+/+ UAS:hid;UAS:rpr (I): w ⁺ /UAS:hid;UAS:rpr;+/+;+/+ UAS:RNA _i SIFamide (I): w ⁺ /UAS:RNA _i SIFamide;+/+;+/+ w ⁺ /UAS:RNA _i SIFamide;+/+;+/+	Tian et al., 2009 Birman, S. und Riemensperger, T., unveröffentlicht Zhou et al., 1997 Terhzaz et al., 2007 Kobbenbring, diese Arbeit
UAS:GCaMP 3.0 (III): w ⁺ /+;+/+;UAS:GCaMP 3.0 UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP: w ⁺ /UAS:sjb-GFP;UAS:CD8-GFP;+/+ UAS:hid;UAS:rpr (I): w ⁺ /UAS:hid;UAS:rpr;+/+;+/+ UAS:RNA _i SIFamide (I): w ⁺ /UAS:RNA _i SIFamide;+/+;+/+ w ⁺ /UAS:RNA _i SIFamide;SIFa2- Gal4/+;TubulinGal80 ^{ts} /+ UAS:rpr (I):	Tian et al., 2009 Birman, S. und Riemensperger, T., unveröffentlicht Zhou et al., 1997 Terhzaz et al., 2007 Kobbenbring, diese Arbeit Zhou et al., 1997

4. Methoden

4.1 Drosophila-Zucht

4.1.1 Nährmedien für die Drosophila-Zucht

102,5g Faden-Agar wurden in 51 Wasser über Nacht eingeweicht. Am nächsten Morgen wurde der eingeweichte Agar für 2h gekocht, bis dieser vollständig gelöst war. Anschließend wurden folgende Zutaten hinzugegeben: Zunächst wurde 100g Sojamehl und 180g Hefe gelöst in 11 Wasser hinzugegeben. 800g Maismehl wurden in 2l Wasser gelöst und ebenfalls in den Topf überführt. In 1l Wasser wurden 220g Rübensirup gelöst und zu den übrigen Zutaten gegeben. 800g Malzin wurden in 1l Wasser gelöst und in den Topf geschüttet. Nach der Zugabe von Malzin wurde der Kocher auf 55°C eingestellt. Sobald die Temperatur des Fliegenfutters zwischen 55°C-60°C lag, wurden 63ml Propionsäure in den Futterbrei gegossen. Als letztes wurden 15g Nipagin (gelöst in 50ml Ethanol) hinzugefügt, der Futterbrei wurde abgekühlt und abgefüllt.

4.1.2. Kultivierung von Drosophila-Stämmen

Die *Drosophila* Stämme wurden in Plexiglasgefäßen mit unterschiedlichen Durchmessern, die Fliegennährmedien enthielten (siehe oben), gezüchtet. Die *Drosophila*-Zuchtstämme wurden in 18°C-Inkubatoren oder 25°C-Inkubatoren mit definiertem 12/12 Licht/Dunkel Rhythmus bei 60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Zuchtstämme der Taufliegen wurden jeweils einmal wöchentlich umgesetzt. Dadurch wurde erreicht, dass nur die Parentalfliegen umgesetzt wurden und es zu keiner Mischung von Parental- und Tochtergeneration kam.

4.2 Immunhistochemische Färbungen

4.2.1 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

3-7 Tage alte Fliegen wurden in Eis-gekühltem Ringer präpariert und anschließend für 2h auf Eis in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Gehirne wurden bei Raumtemperatur 3x20min mit 0,5% Triton (PBST) gewaschen. Daraufhin wurden die Gehirne für 2h in eine Blocklösung (PBST + 2% BSA) gegeben. Danach wurden die primären Antikörper appliziert (siehe Seite: 35) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die primären Antikörper entfernt und die Gehirne wurden für 3 x 20min mit PBST gewaschen. Danach wurden die Gehirne einmal mit PBS + 3% NGS (Normal Goat Serum) für 30min gewaschen und anschließend die sekundären Antikörper hinzugegeben (Konzentration siehe Seite: 36). Daraufhin wurden die Gehirne bei 4°C über Nacht inkubiert. Am dritten Tag wurden die sekundären Antikörper abgenommen und die Gehirne mit PBST 3 x 30min gewaschen und über Nacht in PBS gelassen. Am folgenden Tag wurden die Gehirne in Vectaschield eingebettet.

4.2.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Mit Hilfe der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (Leica TC SP2, Leica Microsystems GmbH) wurden die Daten erhoben. Für die Aufnahmen wurde das Leica Apochromat 20x 0,7NA Wasser-Immersions-Objektiv genutzt. Es wurde mit einer Pinhole-Öffnung von 1,0 und mit einem Abstand in den Fokalen Ebenen von 1,5µm gearbeitet. Die verwendeten Wellenlängen für die Fluoreszenzanregung waren 488nm für Alexa488, 633nm für Alexa633 und 550nm für Cy3. Nach der Durchführung der Konfokal Mikrokopie wurden die Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (National Institutes of Health, USA) ausgewertet und mit Photoshop (Adobe Systems, Inc., USA) als Bild visualisiert.

4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.3.1 DNA-Aufreinigung und DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde das "Kit" DNeasy Blood/Tissue Kit (Qiagen) benutzt. Die Fliegen wurden für 10min bei 50Hz mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators homogenisiert, danach wurde jeweils 180µl Buffer ATL hinzugefügt und die Proben erneut für 10min bei 50Hz homogenisiert. Daraufhin wurden die Proben mit 20µl Proteinase K behandelt und bei 56°C mit einer Schüttelfrequenz von 300rpm für 1,5h lysiert. Anschließend wurden die Proben für 15s gevortext und unmittelbar danach 200µl Buffer AL hinzugegeben. Als nächstes wurden 200µl Ethanol (100%) in die Proben gegeben und erneut gevortext. Die Lösung wurde in ein neues DNeasy Mini Spin-Column umgefüllt, das sich in einem 2ml Sammelgefäß befand. Die Proben wurden bei 8000rpm für 1min zentrifugiert, die durchgeflossene Lösung anschließend verworfen. Die DNeasy Mini Spin Column wurden daraufhin in neue Sammelgefäße gesetzt und 500µl Buffer AW1 hinzugegeben. Diese Proben wurden 1min bei 8000rpm zentrifugiert, die durchgeflossene Lösung sowie Sammelgefäße wurde erneut verworfen, die DNeasy Mini Spin Column auf neue Sammelgefäße überführt und nach Zugabe von 500µl AW2 Buffer für 3min bei 14.000rpm zentrifugiert. DNeasy Mini Spin Column wurden auf 1,5ml Eppendorf Gefäße gesetzt und direkt auf die Membran wurden 200µl AL Buffer pipettiert. 1min wurden die Gefäße bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1min bei 8000rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde mit Hilfe eines NanoDrop (Epoch) der DNA Gehalt ermittelt und die PCR durchgeführt.

4.3.2 Durchführung der PCR

Die DNA-Fragmente von Gal80 und Gal4 wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert (Saiki et al., 1988).

Es wurden Primer für den Gal4 und Gal80 Nachweis benutzt. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Eurofins MWG.

Für Gal4:

Forward 5'-TCTAACCGTCCACCCTCT-3'

Reverse 5'-CGCCACCAAACAAAGCA-3'

Die Produktgröße war 150 Basenpaare (bp).

Für Gal80^{ts}:

Forward 5'-ACACATTACCCCGCCATAC-3'

Reverse 5'-CGCCATTTCCAGCAATCTC-3'

Die Produktgröße betrug 477bp.

Die gewonnene DNA aus der DNA-Extraktion wurde direkt für die PCR verwendet. Das Protokoll für die beiden Nachweise war identisch:

- Dream-Taq Buffer: 2,5µl (Fermentas, Thermo Scientific)
- dNTP: 0,5µl
- DNA: 2µl
- Primer Forward: 1µl
- Primer Reverse: 1µl
- Dream Taq: 0,5µl (Fermentas, Thermo Scientific)
- Autoklaviertes Wasser: 17,5µl

Die Proben wurden in einer PCR Maschine PeqSTAR gegeben, wobei das ausgewählte Programm folgende Schritte umfasste:

- Aufheizen auf 110°C
- Denaturieren bei 98°C für 2min
- (30x): 98°C für 40s, 58°C für 59s und 72°C für 25s
- Extension bei 72°C für 5min halten
- Abkühlen auf 4°C

Die Proben wurden direkt nach der PCR auf Eis gelegt und mit 5 μ l Loading Dye beschwert. Es wurde ein 2% ig Gel + 6 μ l Ethidiumbromid gegossen. 20 μ l der Probe wurden in die Taschen gefüllt. Als Ladder wurde "100bp plus" benutzt (5 μ l). Das Gel lief

für 1h mit 90V. Daraufhin wurde das Gel aus der Gelelektrophoresekammer genommen, die Banden wurden unter UV-Licht (VWK Genoplex) sichtbar gemacht.

4.4 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die quantitative RT-PCR (qPCR) kann verwendet werden, um präzise Aussagen über die Menge einer spezifischen DNA Sequenz zu erhalten (Bar et al., 2012). Diese Technik wurde benutzt, um mRNA von SIFamid zu quantifizieren. Folgende Genotypen wurden verwendet:

> UAS:RNA_i SIFamide/+;SIFa2-Gal4/+;TubulinGal80^{ts}/+ UAS:RNA_i SIFamide/+;SIFa2-Gal4/+;TM3sb UAS:RNA_i SIFamide (I) SIFa2-Gal4;TubulinGal80^{ts}/TM3sb Canton-S

Sämtliche *Drosophila*-Genotypen wurden im 18°C-Inkubator aufgezogen. Nach dem Schlüpfen wurden die Taufliegen in mittelgroße Plexiglasgefäße überführt und in einem Wärmeschrank (29°C) für 3-4 Tage inkubiert. Die Dauer der Inkubation wurde so gewählt, um eine mögliche Reduktion der mRNA zu erhalten.

4.4.1 RNA-Aufreinigung und RNA-Extraktion

Die Taufliegen wurden mit Hilfe eines Trichters in Falcon-Röhrchen (15ml) geschüttet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Falcon-Röhrchen wurde kurz gevortext und anschließend wieder in flüssigen Stickstoff gelegt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt, um sicherzustellen, dass sämtliche Köpfe vom Thorax gelöst waren. Die Zellbestandteile und Köpfe wurden durch ein gekühltes Sieb auf ein weißes Stück Papier ausgeschüttet, die Köpfe wurden schnell gesammelt und in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt, welches eine Metallkugel beinhalteten. Die Gefäße wurden direkt wieder in flüssigem Stickstoff gelegt und bis zur weiteren Nutzung aufbewahrt. Die 2ml Eppendorfgefäße wurden einzeln vom flüssigen Stickstoff entnommen und auf Eis gestellt, 500µl Trizol wurden hinzugegeben. Trizol beinhaltet Phenol, das die Zellmembran lysiert. Anschließend wurden die Proben bei 50Hz für 10min homogenisiert. Nach dem Homogenisieren wurden die Proben bei 4°C für 3min mit 6000rpm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgenommen, in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und für 5min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde zu den Proben 100µl Chloroform gegeben, gevortext sowie für 5min bei RT inkubiert. Die Proben wurden dann für 15min mit 14800rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5ml Gefäß gegeben. Hinzu kam die gleiche Menge an Isopropanol. Die Proben wurden erneut gevortext und 1h bei 4°C aufbewahrt. Daraufhin wurden die Proben für 30min mit 14800rpm bei 4°C zentrifugiert, so dass sich ein Pellet bildete. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das gewonnene Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und bei 4°C für 10min mit 10000rpm zentrifugiert.

Anschließend wurden die Proben mit DNase aus den "RNase-Free DNase Set" für die RNA Reinigung weiter behandelt, die Reagenzien wurden wie folgt:

87,5μl RNA-freies Wasser
10μl Buffer RDD
2,5μl DNase I
hinzugegeben und für 10min bei RT inkubiert.

Danach wurde nach dem Protokoll von dem RNeasy Kit (Qiagen) die weitere Behandlung durchgeführt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration gemessen und cDNA aus der RNA hergestellt. Die cDNA wurde mit dem iScript "cDNA Synthesis Kit" (Bio-Rad) wie folgt hergestellt:

4μ1 5x iScript Reaction Mix
1μl Reverse Transkriptase
RNA = 1000ng
Auffüllen mit RNA-freiem Wasser: Gesamtvolumen 20μl.

Die Proben wurden für 5min bei 25°C inkubiert, unmittelbar danach für 30min bei 42°C, und um die Reaktion zu stoppen für 5min auf 85°C inkubiert.

4.4.2 Durchführung der RT-PCR

Es wurden Primer für SIFamid und Rp49 sowie SIFa Proben und Rp49 Proben verwendet. Die Herstellung der Primer sowie der Probe erfolgte durch die Firma "Eurofins MWG".

Für SIFamid:

Forward5'-CGTTCAACGGCAGCATCTTCGG-3' Reverse 5'-TCGCAGGGCGTGGTCCTATTTG-3' SIFa Probe 5'-FAM-TATCCCCTTCCAGACTACGACAGCGCCA-BHQ1-3'

Für Rp49:

Forward 5'-ATCCGCCCAGCATACAG-3' Reverse 5'-ATCTCGCCGCAGTAAACG-3' Probe 5'-TEX-CTTCAAGGGACAGTATCTGATGCCCAACA-BHQ1-3'

Die designte Proben sind fluorogene Oligonukleotide, am 5' Ende ist ein Fluoreszenz Reporter gebunden, hier bei der SIFa-Probe FAM und für Rp49 das Fluor TEX. Am 3'-Terminus ist der Quencher BHQ1 gebunden (Arya et al., 2005). Die Probe selbst bindet komplementär an den vorliegenden DNA-Strang. Solange die Probe intakt ist, verhindert die dichte räumliche Nähe die Emission von Fluoreszenzsignalen (Arya et al., 2005). Erst durch Abspaltung der Probe durch die 5' Endonuklease Aktivität der DNA-Polymerase kann eine Zunahme der Fluoreszenz, auf Grundlage der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), detektiert werden (Cardulla et al., 1988). Mit jedem qPCR Cycle werden mehr Proben abgespalten, was zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität führt (Arya et al., 2005). Der Zeitpunkt während der qPCR, ab welcher die Fluoreszenz der Reporterproben höher ist als der Hintergrund (Schwelle) kann für Aussagen über die Menge der vorliegenden DNA herangezogen werden (Arya et al., 2005).

Für eine einzelne Reaktion wurde 10µl SsoFast Mix aus dem SsoFast[™] Probes Supermix (Bio-Rad) genommen. Das SsoFast Mix ist ein zweifach konzentrierter, "readyto-use" Reaktionscocktail, welcher alle Komponenten, außer Primer und Proben, für die Durchführung einer qPCR enthielt. Neben 10µl SsoFast wurden jeweils 0,6µl pro Primer und 0,4µl je Probe zusammengemixt. Daraufhin wurde die cDNA in einer Konzentration von 50ng/µl hinzugegeben. Das Reaktionsvolumen wurde auf ein Gesamtvolumen von 20µl mit RNA-freiem Wasser aufgefüllt. Dies gilt als ein biologisches Replikat. In jeder qPCR-Reaktion wurden jedoch pro biologisches Replikat, drei technische Replikate durchgeführt.

Die qPCR wurde mit einem Thermocycler (Bio-Rad CFX96[™]) mit dem Programm: "CFX_2StepAMP.qpcr" durchgeführt. Das Programm enthält folgende Schritte:

1	95°C für 1min	
2	95°C für 10s	39x
3	55°C für 30s	57X

Anschließend wurden die erhobenen Daten mit dem Programm CFX visualisiert. Die folgende Auswertung wurde mit dem Statistik-Programm Origin8.5 durchgeführt. Es wurden die cq-Werte für das ribosomales Protein Rp49 und die cq-Werte für SIFamid der einzelnen Gruppen entnommen. Je Gruppe wurden die cq-Werte für SIFamid durch die cq-Werte für Rp49 dividiert. Aus dem cq-Werten für CS wurde das arithmetische Mittel gebildet. Das arithmetische Mittel von CS wurde daraufhin durch die ermittelten Werte der einzelnen Gruppen dividiert. Dadurch wurden die Gruppen auf CS normalisiert. Somit konnte eine mögliche Reduktion des Neuropeptides SIFamid festgestellt werden. Für die graphische Darstellung wurden die Mittelwerte ± Standardfehler der Gruppen aufgetragen. Es wurde mit Origin8,5 mit den erhobenen Daten eine ANOVA durchgeführt und anschließend als post-hoc Entscheidung eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

4.5 Molekulare Klonierungen

Für die Generierung von neuen transgenen Fliegen (SIFa-LexA und LexAOp:dTrpA1mCherry) wurden verschiedene Vektoren benutzt. Es wurde ein LexA Konstrukt unter der Kontrolle des SIFpromotors (Terhzaz et al., 2007) und ein dTrpA1-mCherry Konstrukt (Atefeh Pooryasin, nicht veröffentlicht) unter Kontrolle von LexAOp generiert. Die DNA wurde mit Hilfe einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und wurde dann in die Vektoren kloniert. Die Keimbahntransformation wurde von Best Gene Inc. durchgeführt. Für die Klonierung wurde das Gateway[®] cloning system (Hartley et al., 2000) genutzt. Als Entry-Vektoren dienten für beide Klonierungen der pCR[®]8/GW/TOPO[®] Vektor von Invitrogen. Das Konstrukt dTrpA1-mCherry wurde anschließend in den "Destination"-Vektor pLOT-W Vektor kloniert, zur Verfügung gestellt von Sören Diegelmann (Diegelmann et al., 2008). Das SIFa Promotor Konstrukt wurde in den "Destination"-Vektor pCasper-LexA::GAD Vektor kloniert.

Die DNA Fragmente von SIFprom und dTrpA1-mCherry wurden mit folgender PCR-Reaktion amplifiziert.

Dream Taq Buffer	5µ1
dNTP	1µ1
Primer Forward	0,25µ1
Primer Reverse	0,25µ1
DNA	1µ1
Taq (Dream Taq)	0,5µl
H ₂ O	42µ1
	Gesamt: 50µl

Primer für SIFamid Promotor:

Forward: 5'-GCTGAATCTCCTGACCCTCAGTCCAGCT-3' Reverse: 5'-CTTGCAGTTTTCGGTGAGCGTTGTGGGC-3'

Primer für dTrpA1-mCherry:

Forward: 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACA-3'

Reverse: 5'-CTACATGCTCTTATTGAAGCTCAGGG-3'

Das folgende Programm wurde für beide PCR Reaktionen benutzt:

PCR Schritt		
Initiale Denaturierung	95°C 1min	
Denaturierung	95°C 30s)
Annealing	68°C für 3min	3 0x
Extension	68°C für 3min	

4.5.1 Ligation

Die frisch amplifizierten PCR-Produkte wurden nach den Herstellerangaben $pCR^{\$}8/GW/TOPO^{\$}$ TA Cloning[®] Kit User Manual (Version E, 10 April 2006, 25-0706, Invitrogen) weiterverwendet. Es wurden 4µl der frischen PCR-Produkte, 1µl Salt Solution und 1µl vom TOPO[®] Vektor zusammengegeben, vorsichtig gemixt und anschließend für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde, wie nachfolgend beschrieben, die Transformation durchgeführt.

4.5.2 Transformation hitzekompetenter E.coli-Bakterien

Jeweils 4µl der Ligation der TOPO[®] Cloning Reaktion wurden in ein Gefäß mit One Shot[®] Mach1[™]-T1^R kompetenten *Escherichia coli (E. coli, Stratagene)* überführt und vorsichtig gemixt. Daraufhin wurden die Proben für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42°C für 30s im Wasserbad ausgesetzt. Unmittelbar darauf wurden die Proben für 2min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 250µl SOC zugegeben und für 1h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Auf den vorgewärmten LB Platten (enthielten 100µg/ml Spectinomycin) wurden die Transformationen ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze vorsichtig abgenommen und in Reagenzgläser mit 5ml LB-Medium, einer Antibiotika-Konzentration von 100µg/ml (Spectinomycin) angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Ein weiterer Teil wurde auf neues Medium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA (Miniprep) nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen.

4.5.3 Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob ein "Insert" in einem Vektor vorhanden und in richtiger Orientierung vorliegt, wurden Restriktionsverdaue durchgeführt. Für den Restriktionsverdau wurde das folgende Rezept benutzt:

- 5µ1 DNA
- 5µl Puffer
- 1µl Enzym
- 39µl H₂O Gesamt: 50µl

Die Ansätze wurden für 1h bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert und anschließend mit "6x Loading Dye" gestoppt. Als nächstes wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden in der UV-Kammer (VWK Genoplex) visualisiert.

4.5.4 LR-Rekombinations-Reaktion als Teil des Gateway-Klonierungssystems

Der nächste Schritt beinhaltete die LR Rekombination Reaktion. Das Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzym Mix enthält eine Buffer und Enzym Rezeptur und von der Bakteriophage lambda die Rekombination Proteine Integrase (Int) und Excicionase (Xis) sowie das von *E. coli* kodierte Protein "Integration Host Factor (IHF)". Das Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzym Mix katalysiert *in-vitro* die Rekombination zwischen des attL-flankiertes "Gen" des Entry-Vektor und den attR-Seiten des Destination Vektor, um einen attB-enthaltenden Expressionsklon zu generieren. Für die LR Reaktion wurde nach dem Herstellerangaben des Invitrogen pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit User Manual (Version E, 10 April 2006, 25-0706) gearbeitet:

- Entry Clone 150ng
- Destination Vector (150ng/µl)
- TE buffer, pH 8.0

Für LR-Reaktion für die SIFa-LexA Linie ergaben sich folgende Volumen:

- 0,66µl Entry Vektor
- 1,12µl Destination Vektor
- 6,33µl TE-Buffer Gesamt: 8,11µl

Für die LR-Reaktion für die LexAOP:dTrpA1-mCherry Linie ergaben sich folgende Volumen:

- 0,76µl Entry-Vektor
- 1,11µl Destination-Vektor
- 6,13µl TE-Buffer
 Gesamt: 8µl

Zu den Proben wurden 2µl LR-Klonase II hinzugegeben und für 1h bei 25°C inkubiert (Abb. 14). Es wurden anschließend 1µl Proteinkinase K zu den Proben gegeben und für 10min bei 37°C inkubiert, um die Reaktion zu beenden. 1µl jeder Probe wurde danach in 50µl von One Shot[®] OmniMaxTM2 T1 Phage-Resistant Zellen gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 30s bei 42°C im Wasserbad hitzegeschockt. Es wurden 250µl S.O.C.-Medium zu den Proben gegeben und bei 37°C für 1h inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf LB-Agar Platten (mit Ampicillin, Konzentration 100µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine DNA-Aufreinigung und zur Überprüfung der Transformation ein Restriktionsverdau durchgeführt (vgl. 4.5.3). Die erhaltende DNA wurde durch die Bestgene Inc. in die embryonalen Taufliegen injiziert und eine Keimbahntransformation durchgeführt.



Abb. 14. Schema der LR Klonase Reaktion.

Das Gateway[®] LR Klonase[™] II Enzym beinhaltet von der Bakteriophage lambda die Rekombinationsproteine Integrase, und die Excisionase und das von *E. coli* stammende Protein Integration Host Factor (IHF). Das Gateway[®] LR Klonase[™] II Enzym katalysiert die Rekombination zwischen den attL-flankierten Genen des Entry-Vektors und den attR Stellen des Destination Vektors, um einen neuen Vektor zu generieren. Die Vektoren Karte wurde mit Hilfe des Programms ApE-Plasmid Editor erstellt.

4.6 In-vivo Calcium Imaging

Um die neuronale Aktivität in spezifischen Gehirnregionen zu untersuchen, wurden neue Fliegenlinien benutzt, die zwei unabhängige Expressionssyteme kombinierten (vgl. 2.4). Hierbei handelte es sich zum einen um das UAS/Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993) und zum anderen um das LexA/LexAOP-System (Lai und Lee, 2006). Dadurch waren wir in der Lage, SIFamiderge Neurone mit einem Temperaturstimulus künstlich zu aktivieren und gleichzeitig die neuronale Aktivität mit Hilfe des genetisch kodierten Calcium-Sensors GCaMP3.0 (Tian et al., 2009) in den olfaktorischen Rezeptorneuronen zu messen. Die *invivo* Calcium Imaging-Experimente wurden mit einem 2-Photonen-Mikroskop (MP7, Zeiss) und der Software ZEN 2011 durchgeführt. Um das Gehirn auf eine definierte Temperatur zu erwärmen, wurde von der institutszugehörigen Werkstatt eine Durchflusskammer gebaut (Abb. 15A), die einen konstanten, aber temperierbaren

Ringerfluss über das Gehirn ermöglicht. Die Durchflusskammer besteht unter anderem aus einem Einsatz aus Edelstahl, in den die zu messende Fliege eingebettet wurde (Abb. 15A).



Abb. 15. Durchflusskammer, Olfaktometer und schematische Übersicht über den experimentellen Aufbau zum *in-vivo* Calcium Imaging.

A) In Einzelteile zerlegte Durchflusskammer. Der weiße Pfeil zeigt die Position der Fliege in der Halterung an. B) Olfaktometer verbunden mit Duftröhrchen C) Schematischer Aufbau der *in-vivo* Calcium Imaging Methode. In diesem geschlossenen Kreislauf konnte die Ringerlösung beim Durchtritt durch sogenannte "Perfusion Cubes" erwärmt oder abgekühlt werden. Dadurch können die SIFamidergen Neurone thermogenetisch aktiviert werden.

Zur Präparation wurden die Fliegen für 5min auf Eis immobilisiert und anschließend in die Halterungskammer überführt. Der Kopf der Fliege wurde mit einem Drei-Komponentenkleber (Protemp[™] II 3M ESPE) bestrichen und ein dünnes, durchsichtiges Klebeband wurde über den Kopf gespannt. Mit einem Skalpell wurde ein Fenster in das Klebeband geschnitten, um Zugang zum Kopf der Fliege und um eine Orientierung für die weitere Präparation zu bekommen. Die Kopfkapsel wurde mit Pinzetten geöffnet und Tracheen sowie Fettkörper entfernt, um das Gehirn frei zu legen. Anschließend wurde 1,5%ige "Low melting-Agarose" in Ringerlösung in den Kopf gegeben, um mögliche Bewegungen des Kopfes zu minimieren.

Die Halterungskammer mit der lebenden Fliege wurde daraufhin an das geschlossene Durchflusssystem angeschlossen. Für die Duftgabe wurde ein Olfaktometer (Abb. 15B), mit Duftverdünnungen von 1:1000 in Mineralöl, benutzt. Die Duft-Austrittöffnung des Olfaktometers wurde über eine Injektionsnadel (Sterican, Braun), direkt mit der Halterungskammer verbunden, um eine zielgenaue Duftgabe an die Antennen der Fliegen zu gewährleisten. Eine Peristaltik-Pumpe (MS-CA 4/820, Ismatec) stellte einen konstanten Ringerfluss durch das System sicher. Die Temperatur der Ringerlösung in den Perfusion Cubes konnte durch ein Temperatur-Regulator Element (TC-20, Two Channel Controller, NPI) überwacht und bei Bedarf manuell geändert werden.

Die getesteten Fliegen wurden von mir generiert und bereitgestellt. Die Durchführung der Experimente und die Auswertung wurden in Kooperation mit Dr. Mandy Jauch, Jonas Schweig, Eva Poland und Dr. Jonas Barth durchgeführt, die einige Versuche praktisch durchführten.

4.6.1 Durchführung von in-vivo Calcium Imaging-Messungen

Für die Durchführung der *in-vivo* Calcium Imaging Messungen wurde das 2-Photonen-Mikroskop (LSM-7-MP, Zeiss) mit einem 20x Wasser-Immersion Objektiv und einer 5Hz Bildaufnahmerate benutzt. Mit Hilfe des genetisch kodierten Calcium Sensors GCaMP3.0 (Tian et al., 2009) konnte eine Zunahme in der Fluoreszenz Intensität in den Antennalloben der Fliegen während einer Duftpräsentation gemessen werden. Anschließend wurde eine Serie von optischen Schnitten (z-Stacks) aufgenommen, um einzelne Glomeruli in den Antennalloben zu identifizieren.

Zur Registrierung Duftevozierter neuronaler Aktivität wurde der in der Durchflusskammer befindlichen Fliege eine definierte Reihenfolge verschiedener Düfte präsentiert (Abb. 16). Das Umschalten zwischen den verschiedenen Duftpräsentationen wurde von dem Programm Labview, welches das Olfaktometer ansteuerte, kontrolliert. Eine Messung wurde bei entsprechend temperierter Ringerlösung dreimal wiederholt (Abb. 16).

5s	2s	10s	20s	•	
Luft	Mineralöl	Luft	Pause		Abbildung
5s	2s	10s	20s	-	Calcium Mes
Luft	Ethylacetat	Luft	Pause	18°C	In den erste
5s	2s	10s	20s	-	Fliege reine
Luft	Benzaldehyd	Luft	Pause	٦ 🖌 🗌	wurden für
5s	2s	10s	20s	_ •	Duft gegeber
Luft	Mineralöl	Luft	Pause		dem Testobje
5s	2s	10s	20s	-	wurde. Ans
Luft	Ethylacetat	Luft	Pause	32°C	Sekunden ein
5s	2s	10s	20s	-	und Luft/Duf
Luft	Benzaldehyd	Luft	Pause	ן ך	mit jewe
5s	2s	10s	20s		unterschiedlic
Luft	Mineralöl	Luft	Pause	 	geführt.
5s	2s	10s	20s		
Luft	Ethylacetat	Luft	Pause	18°C	
5s	2s	10s	20s	_	
Luft	Benzaldehyd	Luft	Pause		
	Zei	it (s)		- 7	

Abbildung 16. Protokoll von *in-vivo* Calcium Messung.

In den ersten fünf Sekunden wurde der Fliege reine Luft angeboten. Daraufhin wurden für zwei Sekunden der jeweilige Duft gegeben, woraufhin für 10 Sekunden dem Testobjekt erneut reine Luft präsentiert wurde. Anschließend erfolgte für 20 Sekunden eine Pause ohne jegliche Messung und Luft/Duftgabe. Die Messungen wurden mit jeweils einer Fliege bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt.

In der ersten Messung wurde den Fliegen bei 18°C für 5s reine Luft angeboten und sofort im Anschluss für 2s Mineralöl. Nach der Duftgabe erhielten die Fliegen für 10s eine Luftpräsentation, worauf eine Pause für 20s ohne jegliche Duftgabe und Messung erfolgte. Daraufhin wurde den Fliegen anstatt reiner Luft der Duft Ethylacetat in einer Verdünnung von 1:1000 in Mineralöl angeboten. Im Anschluss wurde den Fliegen Benzaldehyd in einer Verdünnung von 1:1000 in Mineralöl präsentiert. Nach drei Messungen erfolgte für 90s eine Pause, in dem mit Hilfe des Temperaturkontrollers die Temperatur der Ringerlösung von 18°C auf 32°C verändert wurde. Daraufhin wurden den Fliegen erneut die Düfte nacheinander präsentiert. Abschließend wurde die Messung mit der gleichen Fliege erneut bei 18°C durchgeführt (Abb. 16).

4.6.2 Auswertung der in-vivo Calcium Imaging Experimente

Die gesammelten Daten wurden mit dem Programm ImageJ sowie einem Plug-In, auf der Grundlage des Turbo Reg Plug-Ins, (Thévenaz et al., 1998) angeglichen, um mögliche gemessene Artefakte zu reduzieren. Mit dem Programm Metamorph (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) wurde eine Region von Interesse (ROI) definiert. Die ROI wurde in diesem Experiment auf die Antennalloben beschränkt. Es wurden die Glomeruli ausgewählt, die auf den applizierten Duft mit einer Zunahme der GCaMP Fluoreszenz antworteten. Für die Charakterisierung der individuellen Glomeruli wurde das 3D-Modell der Struktur der Antennalloben (Laissue et al., 1999), welches im Fly-Brain-Atlas auf http://www.flybrain.org (Armstrong et al., 1995) verfügbar ist, zu Hilfe genommen. Für den Vergleich und die Überprüfung der Duftevozierten Antworten in den Glomeruli wurden frühere Studien, die in der "Database of Odorant Responses (DoOR)" auf http://neuro.uni-konstanz.de/DoOR (Galizia et al., 2010) online einsehbar sind, als Hilfestellung verwendet.

Zu jedem Zeitpunkt innerhalb der Aufzeichnung wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten als Grauwerte nach Excel (Microsoft Corp, Version 2010) exportiert. Um einen Grund-Fluoreszenzwert, den sog. F₀-Wert, zu erhalten, wurden fünf Bilder direkt vor der Duftgabe gemittelt. Zudem wurde die Fluoreszenzintensität zu jedem Bild (F_i) ermittelt. Um die Intensitätsänderung der Fluoreszenz während eines Stimulus (Δ F) zu erhalten, wurde der F₀-Wert von dem F_i-Wert subtrahiert und anschließend durch den F₀-Wert dividiert:

$$\Delta F/F_0 = \frac{(F_i - F_0)}{F_0}$$

4.6.3 Datenanalyse der in-vivo Calcium Imaging Experimente

Die Analyse der gemessenen Daten wurde mit den Programmen MetaMorph, Excel (Microsoft), Origin 8.5G (OriginLab, USA), einem Plug-In für ImageJ (Abràmoff et al., 2004) und der Open Source Software R (R Core Team, 2012) durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA mit wiederholten abhängigen Messungen und anschließend der Tukey-Test als post-hoc Entscheidung gewählt.

4.6.4 Erzeugung von Falschfarben-kodierten Darstellungen der räumlichen Verteilung von Ca $^{2+}$ -Aktivität im Antennallobus

Für die Generierung von Falschfarben-kodierten Darstellungen der räumlichen Verteilung von Ca²⁺-Aktivität im Antennallobus wurde das Programm ImageJ verwendet. Um entsprechende Darstellungen zu erzeugen, wurden "frames" vor der Duftgabe von "frames" nach der Duftpräsentation voneinander subtrahiert. Daraus ergab sich eine Änderung in der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$), hervorgerufen durch die Duftgabe. Für die Reduzierung des Hintergrundrauschens wurde ein sog. Mean-Filter mit 5 Pixeln Reichweite verwendet. Eine Intensitätsdifferenz des Signals mit weniger als 50% wurde nicht dargestellt, so dass nur die Änderung der Fluoreszenz oberhalb von 50% angezeigt wurde. Zur Visualisierung dieser Falschfarbenbilder wurde als Baseline ein graues Hintergrundbild genommen, das das Falschfarben kodierte Aktivitätsmuster überlagert.

4.7 Methoden zur Quantifizierung des Balzverhaltens

4.7.1 Versuchsaufbau zu den Balzverhaltensexperimenten

Die Experimente zu dem Balzverhalten der Taufliegen wurden in einer Box durchgeführt, um konstante Temperatur und Luftfeuchtigkeitsbedingungen zu garantieren. In dieser Box befand sich ein Heizgerät (Elta), verbunden mit einem Temperaturmessgerät mit angeschlossenem Temperaturfühler (TFA, Thermo Timer). Dadurch wurde die gewünschte Temperatur von $28^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ gehalten (Abb. 17). Um eine konstante Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, befand sich ein Luftbefeuchter mit angeschlossenem Luftfeuchtigkeitsmesser in der Box, so dass die Luftfeuchtigkeit auf 60% ± 5% gehalten wurde. Für die Aufnahmen des Balzverhaltens wurde eine Digitalkamera mit einer 4x Objektivlinse benutzt. Die Kamera wurde an einem Stativ befestigt und auf die Balzarena fokussiert.

Das Balzverhalten wurde mit dieser digitalen Videokamera (Sony DCR-SR57) aufgezeichnet, die mit 4xObjektivlinsen ausgestattet war. Die Balzarena hat eine Größe von 10mm x 80mm x 26mm (Höhe x Länge x Breite) die 12 paarig angeordnete Einfassungen enthielt. Diese Einfassungen hatten einen Durchmesser von 8mm und eine Tiefe von 4mm. Der Boden der Einfassung wurde mit einem dünnen Filterpapier ausgekleidet. Zum Verschließen der Balzarena wurde ein Objektträger verwendet (Abb. 17).



Abbildung 17. Experimenteller Versuchsaufbau für die Balzverhaltensexperimente.

Das Heizgerät mit Temperaturfühler und der Luftbefeuchter mit Luftfeuchtigkeitsmesser gewährleisteten konstante Versuchsbedingungen. Die *Drosophila* wurden zu zweit in die Balzarena überführt. Danach wurde mit der digitalen Videokamera das Balzverhalten der Taufliegen aufgezeichnet.

4.7.2 Die Versuchsdurchführung zu den Balzverhaltensexperimenten

Die Taufliegen wurden in Inkubatoren mit spezifischer Temperatur und konstanter Luftfeuchtigkeit von 60% mit einem 12h/12h Licht/Dunkel-Wechsel gehalten. Um zu gewährleisten, dass der hitzesensitive dTrpA1 Kanal nicht zwischenzeitlich zu einer Depolarisation der SIFamidergen Neuronen führt, wurden diese Fliegen sowie die dazugehörigen Kontrollgruppen in einem 18°C-Inkubator aufgezogen. Die Nachkommen nicht-temperatursensitiven Transgenen wurden in 25°C-Inkubatoren aufgezogen.

Für die Balzverhaltensexperimente war es unerlässlich, dass naive Männchen und jungfräuliche Weibchen direkt nach dem Schlupf gesammelt wurden. Hierfür wurden die Taufliegen mit Kohlendioxid (CO₂) betäubt. Naive Männchen wurden jeweils einzeln in kleinen Plexiglasgefäßen isoliert, wohingegen die Weibchen jeweils zu zweit in Plexiglasgefäßen gehalten wurden. In den entsprechenden Inkubatoren wurden die Fliegen bis zum Test aufbewahrt (3 ± 1 Tage alt). Die Fliegen wurden für 2min auf Eis immobilisiert. Sobald die Fliegen bewegungsunfähig waren, wurde mit einer Pinzette die Flügel der Fliegen gegriffen und die Tiere zügig in die Balzarena überführt. Anschließend wurden mit der digitalen Videokamera auf die Paare fokussiert und für eine Stunde das Verhalten aufgenommen.

4.7.3 Datenanalyse der Balzverhaltensexperimente

Die Filmaufnahmen wurden am PC mit VLC Media Player (VideoLan) abgespielt. Die ersten 10min des Videomaterials pro Aufnahme wurden ausgewertet. Zeigten die männlichen *Drosophila* ein stereotypes, gut erkennbares Verhalten (Abb. 18), so wurde der Zeitpunkt notiert. Für die Auswertung der Experimente wurde ein Courtship Index und die Courtship Latenz ermittelt. Als Courtship Latenz gilt die Zeitspanne zwischen Experimentbeginn und dem ersten Anzeichen eines Balzverhaltens (unabhängig von der Art). Der Courtship Index: Jedes Balzverhalten wurde zeitlich gemessen und die Dauer in (s) zusammengefasst. Der Wert wurde anschließend durch die zehnminütige Beobachtungszeit dividiert. Dadurch ergab sich der prozentuale Anteil:

Courtship Index =
$$\frac{\text{Dauer des Balzverhaltens}}{600}$$
 x 100

Die ermittelten Daten wurden mit dem Programm Statistica (Statsoft, USA) ausgewertet. Als nichtparametrischer Test wurde eine Kruskal-Wallis ANOVA gewählt. Danach der Mann-Whitney U-Test angewendet und als post-hoc Entscheidung eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

4.8 Experimente zur Nahrungsaufnahme von Drosophila melanogaster

4.8.1 Durchführung der Experimente zur Nahrungsaufnahme

Für diese Experimente wurde ein speziell zubereitetes Futtermedium verwendet (Abb. 18).



Abbildung 18. Speziell zubereitetes rotes Fliegenfutter. Für die Experimente zur Nahrungsaufnahme wurde eigens hergestelltes Futtermedium genutzt. Die rote Farbe ermöglichte die photometrische Bestimmung der Absorption, welche Unterschiede in der Nahrungsaufnahme aufzeigte.

Die Futtermedien wurden frisch am Vortag des Experimentes zubereitet und bei 18°C gelagert. Es wurden jeweils 50ml für Futtermedien mit rotem Farbstoff sowie 50ml für Futtermedien ohne Farbstoff (als Kontrolle) nach folgendem Rezept zubereitet:

Futtermedium (rot)	Futtermedium (Kontrolle)
0,5g Agarose	0,5g Agarose
25ml 1M Saccharoselösung	25ml 1M Saccharoselösung
25ml rote Lebensmittelfarbe	25ml H ₂ O (Leitungswasser)

Eine Quantifizierung der Nahrungsmenge kann bei *Drosophila* durch folgende Verfahren erfolgen: Den Taufliegen wird speziell zubereitetes Futter angeboten, das Saccharose und roten Farbstoff enthält. Der Anteil von rotem Farbstoff kann photometrisch bestimmt werden und als Maß für die Nahrungsaufnahme gelten (Abb. 19).



Abbildung 19. Weibliche *Drosophila* vor A) und nach B) einer Stunde Nahrungsaufnahme von angefärbten Futter. Rötliche Verfärbungen im Abdomen deuten auf eine erhöhte Nahrungsaufnahme hin. Abbildung von Prof. Dr. André Fiala.

Ohne jegliche Betäubung wurden 20 *Drosophila* Weibchen in Futtergläser transferiert. Umgehend wurden die Plexiglasgefäße den Experimentbedingungen zugeführt. Die Experimente zur Nahrungsaufnahme wurden bei 18°C, 29°C und 32°C durchgeführt. Die Gesamtdauer des Experimentes betrug eine Stunde. Anschließend wurden die Fliegen mit Kohlendioxid betäubt und jeweils 15 Fliegen mit Hilfe einer Rasierklinge geköpft. Die Körper wurden in 2ml Eppendorfgefäße gesammelt und 500ml H_20 hinzugefügt. Daraufhin wurden die Proben bei 50Hz für 5min mit einem Homogenisator homogenisiert. Als nächstes wurden die Eppendorfgefäße bei 13.300rpm für 1min zentrifugiert, wodurch sämtliche Zellbestandteile, die möglicherweise die photometrischen Messungen beeinflussen, abgesenkt wurden. Anschließend wurde je Probe dreimal 100µl abgenommen und auf einer 96-well ELISA-Platte aufgetragen. Zum Schluss wurde das Spektrum von 300-620nm in 10nm Schritten der Proben bei 500nm wurden verwendet, als Referenzwellenlängen wurde 320nm und 620nm verwendet.

4.8.2 Quantifizierung der Nahrungsaufnahme

Die ermittelten Absorptionswerte der Experimente wurden in Excel Arbeitsblättern ausgegeben und später in den Statistikprogramm Statistica (Statsoft, USA) übertragen. Für die erfassten Absorptionswerte der Kontrolle (ohne Farbstoff) bei 500nm wurde ein Mittelwert errechnet. Dieser Mittelwert wurde nun von den einzelnen Absorptionswerten bei 500nm der anderen Genotypen subtrahiert. Die graphische Darstellung wurde mit Origin 8.5 und die statistische Analyse wurde mit der Statistik Software Statistica durchgeführt. Es wurde als nichtparametrischer Test eine Kruskal-Wallis ANOVA und der Mann-Whitney Test durchgeführt. Danach wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. 4.9 Quantitative Erfassung der olfaktorischen Präferenz

Die Experimente zu der olfaktorischen Präferenz wurden in einem T-förmigen Irrgarten (T-maze) durchgeführt. Um diese Experimente durchzuführen, wurde eine Tully-Quinn Maschine (Tully und Quinn, 1985) benutzt, die ursprünglich für olfaktorisches Lernen konzipiert wurde (Abb. 20).



Abbildung 20. Tully-Quinn Maschine für die Experimente zur olfaktorischen Präferenz.

Die Seitenansicht einer Tully-Quinn Maschine die für die olfaktorischen Experimente als T-maze diente. Auf jeder Seite befanden sich vier Einfassungen, in denen Röhrchen mit Duftgefäßen gesteckt wurden.

In meinen Experimenten wurde eine veränderte Version der ursprünglichen Tully-Quinn Maschine genutzt. Die modifizierte Version erlaubte die simultane Messung von vier Genotypen während eines Durchganges (Schwaerzel et al., 2003). Eine angeschlossene Pumpe (Vakuum-Pumpe, Welch Inc.) ermöglichte in jedem Röhrchen einen konstanten Luftstrom von ~ 167ml/min, dadurch wurde ein konstanter Transport der Duftmoleküle gewährleistet.

4.9.1 Versuchsdurchführung

Die für die olfaktorische Präferenz verwendeten Taufliegen wurden in einem 18°C-Inkubator mit 60% Luftfeuchtigkeit und einer 12h/12h Tag/Nacht-Rhythmus aufgezogen. Die Fliegen wurden nach dem Schlupf in Plexiglasgefäße mit Futtermedien überführt (Ø 64mm) und bis zum olfaktorischen Test (3 ± 1 Tage alte Fliegen) auf 18°C gelagert. Jedes Plexiglasgefäß wurde mit einer gemischten Population von ~ 50 Taufliegen bestückt. Bei den Experimenten für 48h gehungerten *Drosophila* wurden die Fliegen am ersten Tag nach deren Schlupf auf leere Plexiglasgefäße (Ø 64mm) überführt. In den Plexiglasgefäßen befanden sich dünne Stücke (2cm x 1cm) mit 200µl H₂O durchtränkten Filterpapiers. Die Tully-Quinn Maschine wurde in eine von der Institutswerkstatt gebauten Box gestellt

Methoden

(Abb. 21), die konstante Versuchsbedingungen während der Versuche gewährleistete. Bevor das Experiment begann, wurden die Plexiglasgefäße in die Tully-Quinn Box überführt, in der die nötige Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit herrschte.



Abbildung 21. Tully-Quinn Box.

Die Box wurde gebaut, um die Temperatur sowie die Luftfeuchtigkeit während der Versuche konstant zu halten.

Für die Experimente wurde als appetitiver Duft Ethylacetat (Rodrigues, 1980; Siddiqi, 1988; Heimbeck et al., 1999; Khurana und Siddiqi, 2013) und als aversiver Duft Benzaldehyd (Rodrigues, 1980; Siddiqi, 1988; Khurana und Siddiqi, 2013) gewählt. In den olfaktorischen Experimenten wurden Düfte mit unterschiedlicher Konzentration, von einer geringen Verdünnung von 1:2 bis zu einer hohen Verdünnung von 1:1000, angesetzt. Für die Verdünnung der Düfte wurde Mineralöl benutzt. Jeweils 180µl des jeweiligen Duftgemisches wurden in Duftgefäße (\emptyset 1,3cm) appliziert.

Mit einem Schlauch wurden die zu testeten Fliegen in die Tully-Quinn Maschine überführt (Abb. 22). Als nächster Schritt wurden Sammelröhrchen an die beiden Öffnungen des Fahrstuhles angebracht. An den Enden der Sammelgefäße befanden sich die Duftgefäße mit den appetitiven/aversiven Duftverdünnungen. Auf der entgegengesetzten Seite befand sich ein Duftgefäß mit Mineralöl. Die Taufliegen hatten nun die Möglichkeit zwischen zwei Seiten zu wählen (Abb. 22). Nach zwei Minuten wurden die Eingänge zu den Sammelgefäßen verschlossen und die Anzahl der Fliegen auf den jeweiligen Seiten notiert.

Methoden



Abbildung 22. Aufbau des T-maze für die olfaktorische Präferenz.

Die Tully-Quinn Maschine wurde für die Versuche zur olfaktorischen Präferenz, als sog. T-maze, genutzt. Auf einer Seite wurde den Fliegen Mineralöl und auf der anderen Seite ein appetitiver- oder aversiver Duft, verdünnt in Mineralöl, angeboten. Das Experiment hatte eine Dauer von 2min, danach wurden die Fliegen in den jeweiligen Sammelgefäßen gezählt.

4.9.2 Datenanalyse

Nach dem Experiment wurde die olfaktorische Präferenz der Fliegen nach folgender Formel ermittelt:

Ein positiver Präferenz Index zeigt eine Präferenz zum Duft, wohingegen ein negativer Präferenz Index auf eine Aversion anzeigt. Ein Präferenz Index von 0 deutet weder auf eine Präferenz zum Duft noch zum Mineralöl hin. Die Graphen wurden mit Origin8.5 erstellt, die statistische Auswertung mit der statistischen Software Statistica durchgeführt. Als nichtparametrischer Test wurde die Kruskal-Wallis ANOVA gewählt und anschließenden paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test. Anschließend wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

4.10 Quantitative Erfassung der Rüsselreflexreaktionen (Proboscis Extension Reflex)

Nachdem ich die Methode zum Rüsselreflex Paradigma im Labor etabliert habe, wurden die Experimente an Mirjam Vanessa Sommer übergeben und im Zuge ihrer Bachelorarbeit unter meiner Betreuung von ihr durchgeführt. Im Rüsselreflexexperiment wurde erneut der dTrpA1 Ionenkanal in den SIFamidergen Neuronen exprimiert. Der Rüsselreflex ist eine gut erprobte Methode, um Aussagen über die Futterpräferenz und den Hungerzustand der Fliegen zu machen (Shiraiwa und Carlson, 2007). Bei dieser Methode wird der Rüssel (Labellum) der Taufliegen mit einem appetitiven, gustatorischen Reiz stimuliert. Das Ausstrecken des Rüssels wird als Antwort auf den Stimulus gewertet, so dass mit der Methode eine quantitativ messbare Reaktion der Fliege beobachtbar ist (Shiraiwa und Carlson, 2007).

4.10.1 Aufzucht und Vorbereitung der Fliegen

Alle Fliegenlinien wurden für das Rüsselreflexexperiment auf 18°C aufgezogen. Direkt nach dem Schlüpfen wurden die Fliegen mit CO₂ betäubt und jeweils 10 Männchen und 10 Weibchen in ein Plexiglasgefäß (Ø 62mm) überführt. Am zweiten Tag nach dem Schlupf wurden die Weibchen von den Männchen getrennt und in einzelne Plexiglasgefäße (Ø 62mm) überführt. Abhängig davon, ob "gesättigte" oder "ungesättigte" Fliegen bei den zwei Temperaturen getestet wurden, bedurfte es unterschiedlicher Behandlungen. Bei den Experimenten bei 29°C wurden die "gesättigten" Fliegen für 30min auf 29°C inkubiert, bevor das Experiment begann. Bei den Experimenten mit gehungerten Taufliegen änderte sich der Ablauf der Vorbereitung in einem Punkt. Hier wurden die Weibchen bereits am ersten Tag nach dem Schlupf von den Männchen getrennt und in Plexiglasgefäße mit 200µl Wasser durchtränkten Filterpapier (2cm x 1cm) überführt. Weibliche Drosophila im "gesättigten" Zustand, die bei der Kontrolltemperatur von 18°C getestet wurden, wurden auf Eis immobilisiert und in einen kragenförmigen Halter eingeklemmt (Abb. 23). Dieser Kragen besteht aus einem Plastikgestell mit zwei dünnen Metallplatten, die ineinander verschoben werden können. Die Fliegen wurden in einer Reihe aufgereiht und die Metallplatten wurden vorsichtig ineinander geschoben ohne die Fliege zu verletzen. Dadurch befand sich der Kopf auf der Oberseite des Kragens, Thorax und Abdomen auf der Unterseite.

Methoden



Abbildung 23. Aufnahme von Klemmkragen. Die Fliegen wurden in den Klemmkragen eingespannt, wodurch der Kopf auf einer Seite der Kammer befand und der Körper auf der anderen Seite. Die Fliegen wurden danach mit aufsteigender Konzentration mit einer Saccharoselösung am Rüssel stimuliert. Jedes ausstrecken des Rüssels wurde als Antwort gewertet. Weiße Pfeile deuten Positionen der Fliegenköpfe an.

4.10.2 Durchführung der Rüsselreflexexperimente

Die Reaktion der zu testenden *Drosophila*-Weibchen wurde bei direkter Stimulation mit einer appetitiven Substanz überprüft. Die Substanzen, die den Weibchen angeboten wurden, waren in aufsteigender Konzentration Wasser, 100mM Saccharoselösung, 500mM Saccharose-Lösung und 1000mM Saccharoselösung. Das Labellum der Taufliege wurde mit einem durchtränkten Wattestäbchen berührt, und daraufhin zurückgezogen. Sobald die Fliege mit einem Ausstrecken des Rüssels reagierte, wurde dies notiert.

4.10.3 Datenanalyse

Es wurde das Ausstrecken des Saugrüssels als Reaktion auf die Stimulation mit einer Substanz gewertet. Die Daten von dem Proboscis Extension Reflex wurden wie folgt berechnet:

Anzahl einer Rüsselreaktion auf Stimulus Gesamtanzahl Stichprobengröße

Anschließend wurde als nichtparametrischen statistischen Test der Chi-Quadrat Vierfeldertest genutzt. Dieser Test wurde durch das Eingeben der Messwerte in ein Rechenfenster eines statistischen Programms aus dem Internet (http://www.datenconsult.de/forms/cht2x2.html) durchgeführt.

4.11 Verwendete Statistik

Für die statistische Auswertung wurde bei allen Experimenten, sofern nicht anders angegeben, auf nichtparametrische Verfahren zurückgegriffen. Denn die klassische Varianzanalyse basierend auf arithmetischen Mittelwerten besitzt Nachteile: Die Teststatistiken reagieren empfindlich auf Ausreißer und Abweichungen von der Normalverteilungsannahme (Steland, 2004; Statistica, Statsoft Version 9). Daher wurde in den Verhaltensexperimenten als nichtparametrische Alternative zur Varianzanalyse die Kruskal-Wallis-ANOVA gewählt. Die Interpretation des Kruskal-Wallis-Tests ist grundsätzlich mit der parametrischen einfaktorielle ANOVA identisch, bis auf die Tatsache, dass der Kruskal-Wallis-Test nicht mit Mittelwerten, sondern mit Rängen arbeitet. Im Anschluss wurde der Mann-Whitney U-Test zum paarweisen Vergleich zwischen unabhängigen Gruppen genutzt. Der nichtparametrische Mann-Whitney U-Test gilt als Äquivalent zu dem t-Test, mit der Ausnahme, dass der U-Test auch mit Rangsummen arbeitet und nicht mit Mittelwerten. Anschließend wurde mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur der ermittelte p-Wert berechnet, in dem die einzelnen p-Werte mit der Anzahl der Gruppen multipliziert wurden. Bei den Rüsselreflex Experimenten wurde ebenfalls ein nichtparametrisches Verfahren gewählt. Bei diesen Daten handelte es sich um zwei Variablen die als dichotom angesehen werden können, d.h. entweder die Tiere antworten mit dem Austrecken des Saugrüssels oder nicht. Hierfür eignet sich der Chi-Quadrat-Test als nichtparametrisches Verfahren (Quelle: Statistica, Statsoft). Bei dem invivo Calcium Imaging Experimenten wurde auf eine ANOVA mit wiederholten abhängigen Messungen zurückgegriffen. Bei diesem Experiment wurden an einer Fliege mehrere Messungen durchgeführt, daher gelten die erhobenen Daten als abhängig voneinander. Hier wurde als post-hoc Entscheidung der Tukey-Test angewendet. Der Tukey-Test findet dann Anwendung, wenn die zu testenden Gruppen im Stichprobenumfang gleich sind und alle Gruppen getestet werden sollen (Steland, 2004).

5. Ergebnisse

Im ersten Abschnitt werden die anatomischen Untersuchungen behandelt. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Thomas Riemensperger und Ulrike Pech sowie Britta Bahl durchgeführt. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der Verhaltensstudien gezeigt, die Rüsselreflexexperimente wurden von der Bachelor-Studentin Mirjam-Vanessa Sommer unter meiner Anleitung durchgeführt. Der letzte Abschnitt behandelt die physiologischen Studien mittels *in-vivo* Calcium Imaging. Diese wurden in Kooperation mit Dr. Mandy Jauch, Jonas Schweig und Eva Poland durchgeführt.

5.1 Anatomische Studien

5.1.1 Immunhistochemische Färbungen zur Verteilung von SIFamid

Zunächst wurden die SIFamidergen Neurone mittels immunhistochemischer Färbungen charakterisiert. Hierfür wurde eine Antikörperreaktion gegen SIFamid und zur Orientierung in den Neuropilen des ZNS eine Antikörperreaktion gegen das präsynaptische Protein nc82 (Wagh et al., 2006) durchgeführt.



Abbildung 24. Immunreaktivität gegen SIFamid im Zentralnervensystem von Drosophila.

A) Visualisierung SIFamiderger Neuronen im Gehirn, Thorakalganglion (TG) und Abdominalganglion (AG), B) SIFamiderge Neurone innervieren die Antennalloben (AL) und das Unterschlundganglion [suboesophagiales Ganglion (SOG)] sowie (C) und (D) Bereiche des "ellipsoid body" (EB) und des "fanshaped body" (FB) im Zentralkomplex der Fliege. Die Abbildungen (E), (F) und (G) zeigen unterschiedliche Fokalschnitt-Ebenen durch das Thorakalganglion und Abdominalganglion und die Position weiterer SIFamiderger Zellkörper an. F) Immunreaktivität gegen SIFamid im Thorakalganglion und im Abdominalganglion. G) Ventrale Ansicht des TG und des AG: Zu sehen sind paarig auftretende SIFamiderge Zellkörper an der anterioren Seite eines jeden Bauchsegmentes, angezeigt durch weiße Pfeilen. OL = Optical lobe. Skalierungsbalken: 50µm.

In der Literatur wurden vier SIFamiderge Neurone im *Pars intercerebralis* beschrieben (Terhzaz et al., 2007). Diesen Befund können wir bestätigen, aber wir finden auch SIFamiderge Neurone im Thorakalganglion (TK). Anhand der Immunreaktivität (Abb. 24) ist ersichtlich, dass SIFamid in *Drosophila* im gesamten Gehirn, im Thorakalganglion und im Abdominalganglion von *Drosophila* vorkommt (Abb. 24A). Besonders ausgeprägt sind Innervationen SIFamiderger Neurone in die Antennalloben (AL), im suboesophagialen Ganglion (SOG), im "ellipsoid body" (EB) sowie im "fan-shaped body" (FB) des Zentralkomplexes (Abb. 24A-24D). Darüber hinaus ist aus Abbildung 24C-24D erkennbar, dass SIFamiderge Neurone den Ösophagus ringförmig innervieren. SIFamiderge
Zellkörper wurden ebenfalls in unterschiedlichen Regionen des TK und im AG nachgewiesen (Abb. 24E-24F). Die immunhistochemischen Färbungen deuten darauf hin, dass das Neuropeptid SIFamid im gesamten Gehirn vorkommt.

5.1.2 Visualisierung der dendritischen Verzweigungen der SIFamidergen Neurone

Um die neuronalen Netzwerke des SIFamidergen Systems besser zu verstehen wurde in einem nächsten Schritt untersucht, welche Bereiche der SIFamidergen Neurone von dendritischer Natur sind. Für die Visualisierung dieser wurde der dendritische Marker DenMark (Nicolaï et al., 2010) benutzt (Abb. 25), welches ein Hybridprotein aus ICAM5/Telencephalin mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry ist (Nicolaï et al., 2010).



Abbildung 25. Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 25. Immunreaktion gegen die Dendriten der SIFamidergen Neurone.

A) Überblick über die Verzweigungen der SIFamidergen Neurone im Gehirn. Die Immunreaktion gegen DenMark-gekoppeltes mCherry (magenta) und gegen die Neuropile des Gehirnes nc82 (grün). 25B) und 25C) eine hohe Dichte der SIFamidergen Dendriten wurden im *Pars intercerebralis* (PI) visualisiert. Um den Ösophagus (OS) (25D) und in den Antennalloben (25E) wurde ebenfalls eine hohe Dichte SIFamiderger Dendriten gefunden. Abbildung 25F-25K zeigt die Immunreaktion gegen das Protein mCherry (magenta) und die Immunreaktion gegen das Neuropeptid SIFamid (grün). 25F) Fokus auf dendritische Verzweigungen SIFamiderger Zellen im *Pars intercerebralis*. 25G) Dendriten der SIFamidergen Neurone innervieren den Pilzkörper. 25H) Auf dem Level des fächerförmigen Körper ist klar erkennbar, dass die Dendriten der SIFamidergen Neurone räumlich von der Immunreaktivität gegen SIFamid getrennt sind. Während im Bereich des Ösophagus und der Antennalloben beide Polaritäten der SIFamidergen Neurone zu finden sind (25I und 25J). 25K) Schematische Darstellung des SIFamidergen Systems unterteilt in SIFamidergen Dendriten (rot) und in nicht dendritische Projektionen (grün). OL = Optical lobe. Skalierungsbalken: 50μm.

In Abbildung 25 wurden die Dendriten der SIFamidergen Neurone visualisiert. Ein Großteil der Dendriten SIFamiderger Neuronen sind im *Pars intercerebralis* (PI) lokalisiert, in dem sich auch die vier SIFamidergen Zellkörper befinden (Abb. 25B-25C). Zudem umspannen die Dendriten den Ösophagus (OS) (Abb. 25D) und innervieren die Antennalloben (25E-25F). Dies lässt vermuten, dass die SIFamidergen Neuronen Eingang aus dem *Pars intercerebralis*, dem Ösophagus und den Antennalloben erhalten. Anhand der vorliegenden immunhistochemischen Färbungen zeigt sich, dass eine räumliche Trennung von SIFamid-freisetzenden Boutons und den Dendriten der SIFamidergen Neurone in der Höhe des fächerförmigen Körpers vorliegt, während es auf Höhe des Ösophagus (Abb. 25I) und der Antennalloben (Abb. 25J) keine räumliche Trennung gibt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die SIFamidergen Neurone dort sowohl Input als auch Output besitzen.

5.1.3 Kolokalisation von SIFamid mit anderen Neuropeptiden und Auffindung möglicher Zell-Zell-Kontakte mittels der split-GFP Technik

Die nächste Fragestellung war, welche peptidergen Neurone und Neurotransmitter mit den SIFamidergen Zellen interagieren. Hierfür wurden weitere immunhistochemische Färbungen mit diversen Antikörpern durchgeführt und die split-GFP Technik (Feinberg et al., 2008) angewandt, um mögliche Interaktionspartner der SIFamidergen und anderen peptidergen Neuronen zu visualisieren. In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen und die Lokalisation von möglichen Zell-Zell Kontakten mit Hilfe der split-GFP Technik dargestellt. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Frau Ulrike Pech und der Bachelorstudentin Britta Bahl durchgeführt (Bahl, 2013).



Abbildung 26. Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 26. Immunhistochemische Färbungen gegen dILP und Lokalisation von Zell-Zell-Kontakten der SIFamidergen Neurone und der IPCs mittels der split-GFP Technik.

26A) Überblick der Immunreaktion gegen dILP (grün) und die Immunreaktion gegen die Dendriten der SIFamidergen Neuronen (magenta). 26B) Detailansicht auf Axone der Insulin-produzierende Zellen (IPCs), die vom *Pars intercerebralis* zu dem Ösophagus ziehen. 26C) Kolokalisation SIFamiderger Dendriten und der IPCs (weiß) im *Pars intercerebralis*. Es wurde keine Kolokalisation zwischen SIFamidergen Dendriten und den Axonen der IPCs weder um den Ösophagus (26D) herum noch in den Antennalloben gefunden (26E). 26F) Schematische Darstellung der Immunreaktion gegen dILP und den Dendriten der SIFamidergen Neurone. Die Abbildungen 26G-26M zeigen die Lokalisation von Kontakten zwischen SIFamidergen Neuronen und Insulin-produzierenden Zellen mit Hilfe der split-GFP Technik. 26G) und 26J) zeigen einen Überblick, des ganzen Gehirns, wobei in gestricheltem Quadrat gekennzeichnet ist, in welchen Bereichen die Axone der IPCs sich in unmittelbarer Nähe zu den Dendriten SIFamiderger Neurone befinden und welche in 26H-L vergrößert dargestellt sind. Klar zu sehen ist eine enge räumliche Nachbarschaft zwischen Dendriten SIFamiderger Neurone und den Axonen dILP produzierender Zellen im *Pars intercerebralis* (26H, 26K) sowie zwischen Dendriten SIFamiderger Neurone und Axone der dILP produzierenden Zellen in der Region des Ösophagus (26I, 26L). 26M) Detailansicht der IPCs und Dendriten SIFamiderger Neurone. OL = Optical lobe. Skalierungsbalken 50µm für 26A-26E, 100µm für 26G und 26K.

Als erstes Neuropeptid wurde eine Interaktion mit dem *Drosophila* Insulin-like-Peptid (dILP) charakterisiert, welches eine exponierte Rolle im Metabolismus der Taufliege spielt (Rulifson et al., 2002). Daher wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt und mit Hilfe der split-GFP Technik mögliche Zell-Zell-Kontakte zwischen den SIFamidergen Neuronen und den Insulin-produzierenden Zellen untersucht (Abb. 26). Wie in der Literatur beschrieben, sind die IPCs, die dILP2 exprimieren, im *Pars intercerebralis* lokalisiert (Rulifson et al., 2002). Deutlich zu erkennen ist, dass es zu einer Kolokalisation zwischen Dendriten SIFamiderger Neurone und den Insulin-produzierender und den Insulin-produzierender Zellen auf Höhe des *Pars intercerebralis* kommt (Abb. 26C). Andererseits konnte keine Kolokalisation in den Antennalloben und um den Ösophagus detektiert werden (Abb. 26D-26E). Mit Hilfe der split-GFP Technik wurden Zell-Zell-Kontakte zwischen den SIFamidergen Neurone und der IPCs im *Pars intercerebralis* (Abb. 26G und 26J) und um den Ösophagus entdeckt (Abb. 26L-26L).

Als nächstes war das sNPF in dieser Studie von großem Interesse, da es als orexigen-wirkendes Neuropeptid beschrieben wurde (Lee et al., 2004) (Abb. 27). Die sNPF-produzierende Zellen besitzen eine hohe Anzahl und sind vornehmlich in den Kenyon Zellen des Pilzkörpers vorhanden (Lee et al., 2004; Johard et al., 2008).



Abbildung 27. Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 27. Immunhistochemische Färbungen gegen sNPF und Lokalisation von Zell-Zell-Kontakten zwischen SIFamidergen Neuronen und sNPF produzierenden Zellen mit Hilfe der split-GFP Technik.

27A) Immunreaktion gegen sNPF (grün) und gegen Dendriten SIFamiderger Neurone (magenta). 27B) Zeigt einen Ausschnitt im Bereich des Pars intercerebralis, wo eine Kolokalisation zwischen sNPF und den SIFamidergen Dendriten sichtbar ist. 27C) Im Bereich des fächerförmigen Körpers und der Antennalloben (27E) wurden keine überlappenden Immunreaktionen detektiert, während eine starke Kolokalisation zwischen SIFamiderger Dendriten und sNPF-produzierender Zellen um den Ösophagus vorhanden ist (27D). 27F) Schematisch zusammengefasst die Position der sNPF-produzierenden Zellen und Dendriten der SIFamidergen Zellen, 27G) und (27K) Bereiche des Gehirns, in welchen Axone sNPF-produzierender Zellen und Dendriten SIFamiderger Neurone lokalisiert sind. In den Bereichen des Pars intercerebralis, der Antennalloben und um den Ösophagus herum können Kontaktpunkte zwischen SIFamidergen- und sNPFproduzierende Zellen detektiert werden. 27H) und (27L) Vergrößerter Bereich des Pars intercerebralis + Ösophagus. Axone sNPF-produzierender Zellen und Dendriten SIFamiderger Neurone befinden sich in enger räumlicher Nachbarschaft zueinander. 27I-27J) Visualisierung von Zell-Zell-Kontakte zwischen sNPF- und SIFamiderge Neurone auf Höhe der Calyx im Pilzkörper. 27M-27N) Detailansicht der split-GFP Signale in Axonen sNPF-produzierender Zellen und Dendriten SIFamiderger Neurone, die eine enge räumliche Nachbarschaft in den Antennalloben aufweisen. 27O) Schematische Darstellung der Zell-Zell-Kontakte zwischen den SIFamidergen- und sNPF-produzierenden Zellen. OL = Optical lobe. Skalierungsbalken 50µm für 27A-27E, 100µm für 27G und 27K, 5µm für 27I-27J und 27M-27N.

In Abbildung 27 wird eine Kolokalisationen zwischen den sNPF-produzierenden Zellen und Dendriten SIFamiderger Neurone im *Pars intercerebralis* (Abb. 27C) und ringförmig um den Ösophagus (Abb. 27D) gezeigt. Demnach könnten die SIFamidergen Neurone in die oben genannten Bereichen "Input" von den sNPF-produzierenden Zellen erhalten. Darüber hinaus wurde gefunden, dass eine räumlichen Trennung zwischen Dendriten SIFamiderger Neurone und sNPF-produzierender Zellen in Höhe des fächerförmigen Körpers (Abb. 27C) und der Antennalloben (Abb. 27E) besteht. Des Weiteren konnte mit Hilfe der split-GFP Technik Zell-Zell-Kontakte zwischen den beiden peptidergen Zellen im Bereich des *Pars intercerebralis* und Ösophagus (Abb. 27G und 27K), Calyx (Abb. 27I-27J) und im Antennallobus (Abb. 27M-27N) detektiert werden.

Als nächster zu untersuchender Kandidat wurden die Corazoninerge Neurone gewählt. Das Neuropeptid Corazonin beeinflusst die Ausschüttung von AKH und gilt als anorexigen-wirkendes Peptid (Zhao et al., 2010) (Abb. 28). In der Literatur wurden die Corazonin-produzierenden Zellen im Protocerebrum gefunden (Zhao et al., 2010).



Abbildung 28. Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 28. Immunhistochemische Färbungen gegen Corazonin und Lokalisation von Zell-Zell-Kontakten zwischen den SIFamidergen Neurone und Corazoninergen Zellen mit Hilfe der split-GFP Technik.

28A) Histologische Färbungen gegen Corazonin (grün) und dendritisch lokalisiertes mCherry (magenta). 28B) Detailansicht des Pars intercerebralis zur Visualisierung SIFamiderger Dendriten in Korrelation zum Corazoninergen Systems, die durch Kolokalisationen zwischen Corazoninerger Zellen und Dendriten SIFamiderger Neuronen zu erkennen ist (28C). 28D) Kolokalisation SIFamiderger Dendriten und Corazoninerger Zellen im Bereich des Ösophagus, jedoch keine Kolokalisation in den Antennalloben (28E). 28F) Schematische Übersicht über die Corazoninergen Neuronen (grün), die sich im Protocerebrum befinden und Axone in den Pars intercerebralis senden. 28G-28K) Visualisierung von Kontaktstellen zwischen den SIFamidergen Neuronen und Corazoninergen Zellen mit Hilfe der split-GFP Technik: Bereiche, in denen Dendriten der SIFamiderger Neurone und Axone Corazonin-produzierender Zellen in enger räumlicher Nähe stehen sind eingerahmt. 28H) und (28L) Detailansicht auf den Pars intercerebralis. Dendriten SIFamiderger Neurone und Axone Corazoninerger Neuronen im Bereich des Pilzkörpers (mushroom body, MB) (Abb. 28I und 28J). 28M) und 28N) Im Bereich der Antennalloben befinden sich Dendriten SIFamiderger Neurone und Axone Corazonin-produzierenden Zellen in unmittelbarer Nähe zueinander. 280) Schematischer Überblick über die Position der Zell-Zell-Kontakte der SIFamidergen- und Corazoninergen Neuronen. Dendriten und Axone befinden sich im Bereich des Pilzkörpers in enger Nachbarschaft zueinander. OL = Optical lobe. Skalierungsbalken 50µm für 28A-28E, 100µm für 28G und 28K, 5µm für 28I-28J und 28M und 28N.

In Abbildung 28 wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen Kolokalisationen zwischen Dendriten SIFamiderger Neurone und Corazoninerger Zellen im Bereich des *Pars intercerebralis* gefunden. Es wurde keine Kolokalisation zwischen Dendriten SIFamiderger Neurone und Corazoninerger Zellen im Pilzkörper detektiert (Abb. 28B). Des Weiteren konnte keine Kolokalisation im fächerförmigen Körper gezeigt werden (Abb. 28C). Es konnte eine Kolokalisation Dendriten SIFamiderger Zellen und Corazoninerger Zellen um den Ösophagus detektiert werden (Abb. 28D). Zwischen den Corazonin-produzierenden Zellen und Dendriten SIFamiderger Neurone gab es auf Höhe der Antennalloben keine Überlappung. Mittels der split-GFP Technik finden wir Zell-Zell-Kontakte zwischen SIFamiderger- und Corazoninerger Zellen im *Pars intercerebralis* (Abb. 28H und 28L). Interessanterweise finden wir Zell-Zell-Kontakte im Calyx des Pilzkörpers (Abb. 28I-28J). Deutlich zu erkennen sind Zell-Zell-Kontakte zwischen SIFamiderger- Zellen im Antennallobus (Abb. 28M-28N).

Als letztes wurden oktopaminerge Zellen in Hinblick auf eine mögliche Kolokalisation mit SIFamiderger Zellen untersucht. Wie in den anderen Experimenten wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt und Kontakte zwischen oktopaminerger- und SIFamiderger Zellen mit Hilfe der split-GFP Technik visualisiert (Abb. 29). Es wurden Antikörper gegen *Drosophila* Tyrosin Decarboxylase 2 verwendet, welches das Oktopamin/Tyramin synthetisierende Enzym erkennt (Pech et al., 2013).



Abbildung 29. Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 29. Anatomische Korrelation zwischen oktopaminergen- und SIFamidergen Zellen mit Hilfe der split-GFP Technik und immunhistochemischen Methoden.

29A) Immunreaktivität gegen dendritisch lokalisiertes mCherry (magenta) und Tyrosin-Decarboxylase 2 (TDC2) (grün). 29B) Im Bereich des *Pars intercerebralis*, AL (29E) und des FBs (29C) kann keine Kolokalisation zwischen SIFamiderger Dendriten und oktopaminerger Zellen detektiert werden, während im Bereich des Ösophagus oktopaminerge Neurone und SIFamiderge Dendriten kolokalisiert sind (29D). 29F) Schematische Darstellung SIFamiderger Dendriten und oktopaminerger Neuronen. 29G-29J) Zell-Zell-Kontakte zwischen den oktopaminergen Zellen und den SIFamidergen Neuronen im Bereich des Ösophagus. 29H-29J) Detailansicht der Zell-Zell-Kontakte zwischen SIFamiderger Neuronen und oktopaminerger Zellen. 29K) Schematische Übersicht über der anatomische Interaktion zwischen SIFamidergen Neuronen und den oktopaminergen Zellen mit Hilfe der split-GFP Technik. OL = Optical lobe. Skalierungsbalken 50µm für 28A-28E, 100µm für 29G und 29I, 5µm für 29H-29J.

Biogene Amine spielen auch eine Rolle in der Nahrungsaufnahme (Vömel und Wegener, 2008). Darunter besitzt Oktopamin in der Nahrungsaufnahme eine wichtige Rolle (Schwaerzel et al., 2003). Immunhistochemische Färbungen zeigen, dass Dendriten SIFamiderger Neurone und oktopaminerge Zellen im Bereich des Ösophagus kolokalisieren (Abb. 29D), wohingegen keine Kolokalisation zwischen Oktopaminerge Zellen und Dendriten SIFamiderger Neurone in *Pars intercerebralis* (Abb. 29A-29B), fächerförmigen Körper (Abb. 29C) und in Höhe der Antennalloben (Abb. 29E) gefunden werden. Deutlich sind Zell-Zell Kontaktsignale zwischen oktopaminergen- und SIFamidergen Neurone um den Ösophagus herum sichtbar (Abb. 29H und 29J).

Für die detaillierten anatomischen Untersuchungen wurden Neuropeptide und Transmitter ausgewählt, die im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme und des Metabolismus der Taufliege stehen. Corazonin (Zhao et al., 2010) und besonders das Drosophila Insulin-likepeptide (Rulifson et al., 2002) gelten als anorexigen-wirkende Neuropeptide. Das sNPF (Lee et al., 2004) und Oktopamin (Schwaerzel et al., 2003) wurden als orexigen-wirkende Substanzen beschrieben. Kolokalisationen und Zell-Zell-Kontakte zwischen den peptidergen Zellen geben Hinweise über mögliche Interaktionen. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass Dendriten SIFamiderger Neurone mit den IPCs im Bereich des Pars intercerebralis und um den Ösophagus kolokalisieren (Abb. 26A-26F). Darüber hinaus wurden mit Hilfe der split-GFP Technik Zell-Zell-Kontakte zwischen den Insulin-produzierenden Zellen und den SIFamidergen Neuronen Kontakte zwischen den beiden peptidergen Zellen im Pars intercerebralis und um den Ösophagus gefunden (Abb. 26G-26M). Bei einer Überprüfung von Kolokalisationen zwischen Dendriten SIFamiderger Neurone und den sNPF-produzierenden Zellen wurden überlappende Färbungen im Bereich des Pars intercerebralis und des Ösophagus detektiert (Abb. 27A-27F). Interessanterweise wurden Zell-Zell-Kontakte zwischen den SIFamidergen Zellen und den sNPF-produzierende Neurone im Bereich der Antennalloben gefunden (Abb. 27K). Hier wurde keine Kolokalisation zwischen den SIFamidergen Dendriten und der sNPF-produzierende Zellen visualisiert. Des Weiteren konnten mit Hilfe der split-GFP Technik weitere Kontakte zwischen den beiden peptidergen Zellen sichtbar gemacht werden. Eine dichte räumliche Nähe wurde im Bereich des Pars intercerebralis und erneut um den Ösophagus sowie in der Calyx des Pilzkörpers detektiert (Abb. 27G-27O). Die immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass die Dendriten der SIFamidergen Neurone und die Corazonin-produzierenden Zellen im Bereich des Pars intercerebralis und des Ösophagus kolokalisieren (Abb. 28A-28F). Zudem wurden Zell-Zell-Kontakte zwischen den SIFamidergen- und Corazoninergen Neuronen im Pars intercerebralis, dem Ösophagus und in der Calyx des Pilzkörpers gefunden (Abb. 28G-28O). Es wurde auch eine überlappende Kolokalisation zwischen SIFamiderger Dendriten und Oktopaminerger Zellen sichtbar gemacht. Hier wurde allerdings nur im Bereich des Ösophagus eine Kolokalisation entdeckt (Abb. 29A-29G). Ebenso wurden mit Hilfe der split-GFP Technik Zell-Zell-Kontakte zwischen den SIFamidergen Neuronen und oktopaminergen Zellen um den Ösophagus gefunden (Abb. 29G-29K). Zusammengefasst bedeutet das, dass die SIFamidergen Neurone eine enge räumliche Nachbarschaft zu anderen peptidergen und aminergen Zellen aufweisen, die orexigene oder anorexigene Wirkungen auf das Tier vermitteln.

5.2 Einfluss des Neuropeptides SIFamid auf das Verhalten

Es wurde eine Vielzahl von Verhaltensexperimenten durchgeführt, um die Wirkung des Neuropeptides SIFamid auf das Verhalten genauer zu untersuchen. Die Verhaltensstudien umfassen Messungen des Balzverhaltens, Experimente zur Nahrungsaufnahme und zur olfaktorischen Präferenz. Darüber hinaus wurden Experimente mit appetitiven gustatorischen Reizen durchgeführt. Um SIFamiderge Neurone zu aktivieren, wurde der wärmesensitive Kationenkanal (dTrpA1) in den SIFamidergen Neuronen exprimiert. Mit einem Wärmestimulus wurden die SIFamidergen Neurone depolarisiert. Des Weiteren wurde versucht die SIFamidergen Neurone durch induzierte Apoptose während der Entwicklung abzutöten. Um eine Manipulation erst nach der abgeschlossenen Entwicklung auszulösen, wurde das hitzesensitive Gal80^{ts} verwendet, welches als Gal4-Inhibitor agiert.

5.2.1 SIFamid inhibiert nicht das Balzverhalten der Taufliegen

Das Balzverhalten bei *Drosophila melanogaster* (Abb. 30) wird gewöhnlich vom Männchen eingeleitet (Spieth, 1974). Es handelt sich um ein stereotypes Verhalten, das oft mit dem Orientierungsverhalten (Abb. 30A) beginnt (Spieth, 1974). Die darauffolgende Verhaltenssequenz wird "Following" genannt (Abb. 30B). Bei diesen Verhalten folgt das Männchen dem Weibchen für eine gewisse Zeit (Ruedi und Hughes, 2008). Abb. 30C zeigt das nächste Balzverhalten, den Balzgesang (Wing Extension). Das Männchen spreizt hier einen Flügel ab und erzeugt durch Vibrationen Töne, die attraktiv auf das Weibchen wirken (Ruedi und Hughes, 2008). Als weitere Steigerung im Balzverhalten kann das "Licking" Verhalten auftreten (Abb. 30D). Das Männchen beleckt das Abdomen des Weibchens. Daraufhin kann es zu einer sogenannten versuchten Kopulation kommen (Abb. 30E). Dieses Verhalten führt häufig zu einer erfolgreichen Kopulation (Abb. 30F) (Ruedi et al., 2008).



Abbildung 30. Das Balzverhalten von männlichen Drosophila melanogaster.

A) Orientation: das Männchen orientiert sich zu dem Weibchen. B) Following: das Männchen folgt dem Weibchen. C) Wing Extension oder Balzgesang: das Männchen spreizt einen Flügel ab und erzeugt durch Vibration den Balzgesang. D) Licking: das Männchen beleckt das Abdomen der Weibchen. E) Versuchte Kopulation. F) Kopulation: gezeigt wird eine erfolgreiche Kopulation.

Um den Einfluss des Neuropeptides SIFamid auf das Balzverhalten zu überprüfen, wurde der hitzesensitive Ionenkanal in den SIFamidergen Neuronen exprimiert. Hierfür wurde die Effektorlinie UAS:dTrpA1 (Hamada et al., 2008) und die SIFa2-Gal4 Gal4-Promotorlinie

(Terhzaz et al., 2007) miteinander gekreuzt, so dass die SIFamidergen Neurone mit einem Wärmestimulus depolarisiert werden konnten. Des Weiteren wurden Balzverhaltensexperimente mit *Drosophila* mit ablatierten SIFamidergen Neuronen durchgeführt. Um die SIFamidergen Neurone abzutöten, wurde die UAS:Effektorlinie UAS:rpr (Zhou et al., 1997) mit der Gal4-Promotorlinie SIFa2-Gal4 gekreuzt.





31A) Y-Achse zeigt die Courtship Latenz in Sekunden (s) Mittelwert (MW) ± Standardfehler. Nachdem die Fliegen zusammengesetzt wurden, gibt die Courtship Latenz an, ab welchen Zeitpunkt die Männchen das

erste Balzverhalten zeigten. 31B) Der Courtship Index gibt an, wie viel Zeit die Männchen während einer zehnminütiger Beobachtungsphase für die Balz aufwendeten (MW \pm Standardfehler). 31C) Die Abbildung zeigt die Courtship Latenz bei 22°C an. Bei dieser Temperatur sollte der hitzesensitive Ionenkanal nicht öffnen. 31D) Angegeben wird der Courtship Index bei 22°C. Statistischer Test: Kruskal-Wallis ANOVA mit Mann-Whitney U-Test und Bonferroni Korrektur als post-hoc Entscheidung. Statistische Signifikanz: * = p < 0,05, *** = p < 0,001. n.s. = nicht signifikant. Stichprobengröße: n=10.

Bei einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neurone erhalten wir eine verstärkte Balz der Männchen zu den Weibchen mit gleichem genetischem Hintergrund. In der Courtship-Latenz wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden (Abb. 31A). Der Courtship Index unterscheidet sich signifikant zu der Gal4-Promotorlinie, jedoch wurde kein signifikanter Unterschied zu der UAS:Effektorlinie und zu den wildtypischen Fliegen gefunden (Abb. 31B). Das bedeutet, dass bei einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neurone, die Männchen mehr balzten und/oder die Weibchen rezeptiver für die Balz waren und somit einen höheren Courtship Index aufweisen. Nachdem das Balzverhalten nach einer thermogenetisch induzierten Depolarisation der SIFamidergen Neuronen untersucht wurde, galt es, das dazugehörige Kontrollexperiment bei 22°C durchzuführen. Bei dieser Temperatur sollten sich die wärmesensitiven Kationenkanäle nicht öffnen. Bei den durchgeführten Kontrollexperimenten bei 22°C wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden (Abb. 31C und 31D).

In einer Studie von Terhzaz et al. (2007) wurde berichtet, dass SIFamid das Balzverhalten der schwarzbäuchigen Taufliege beeinflusst. In dieser Studie ablatierten die Autoren die SIFamidergen Neuronen mit Hilfe von induzierter Apoptose und nutzten die RNAinterferenz, um die Translation des Neuropeptides SIFamid zu reduzieren. Männliche Taufliegen mit ablatierten SIFamidergen Neurone zeigten in dieser Studie ein wahlloses Balzverhalten zu beiderlei Geschlecht. Für Weibchen wurde gefunden, dass diese empfänglicher für das Balzverhalten der Männchen waren. Die Autoren folgerten daraus, dass SIFamid das Balzverhalten inhibiert (Terhzaz et al., 2007). Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die SIFamidergen Neuronen während der Entwicklung durch induzierte Apoptose ablatiert wurden. Zuvor wurde kontrolliert, dass die SIFamidergen Neurone mit Hilfe der "Reaper"-Technik während der Entwicklung ablatiert werden konnten (Abb. 32).

Ergebnisse



Abbildung 32. Nachweis, dass die SIFamidergen Neurone ablatiert werden können.

Die SIFamidergen Neurone können mit Hilfe der "Reaper"-Technik während der Entwicklung ablatiert werden. Magenta: Immunreaktion gegen die Neuropile des Gehirns. Skalierungsbalken: 100µm.

Es konnte durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen werden, dass die SIFamidergen Neurone während der Entwicklung ablatiert werden konnten. Das Neuropeptid SIFamid ist nicht mehr vorhanden (Abb. 32).



Abbildung 33. Abbildungslegende auf der nächsten Seite.

Abbildung 33. Balzverhalten von transgenen Männchen und Weibchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen bei 22°C.

33A) Die Y-Achse zeigt die Courtship Latenz in Sekunden (s) Mittelwert (MW) \pm Standardfehler. Nachdem die Fliegen zusammengesetzt wurden, gibt die Courtship Latenz an, ab welchen Zeitpunkt die Männchen das erste Balzverhalten zeigten. 33B) Der Courtship Index gibt an, wie viel Zeit die Männchen während einer zehnminütigen Beobachtungsphase für die Balz aufwendeten (MW \pm Standardfehler). Stichprobengröße: n=10.33C) und 33D) zeigen das Balzverhalten mit wildtypischen Männchen und Weibchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen. Die Stichprobengröße betrug bei UAS:rpr;SIFa2-Gal4 und bei CS n = 11, bei den anderen Gruppen n = 12. 33E) und 33F) Männchen-Männchen Balzverhalten bei Fliegen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen und gleichem genetischen Hintergrund. Die Stichprobengröße betrug bei allen Gruppen n = 10, außer bei SIFa2-Gal4 n = 8. Statistischer Test: Kruskal-Wallis ANOVA mit Mann Whitney U-Test mit Bonferroni Korrektur, *** = p < 0,001, n.s. = nicht signifikant.

Bei Männchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen wurde kein signifikanter Unterschied in der Balz-Latenz zu den anderen Gruppen festgestellt (Abb. 33A). Bei Männchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen wurde keine signifikant erhöhte Balzaktivität gegenüber Weibchen mit gleichen genetischem Hintergrund und der Gal4-Promotorlinie beobachtet (Abb. 33B). Es wurde jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der Kreuzung und der UAS:Effektorlinie ermittelt. Darüber hinaus wurde unter den Parentallinien bereits ein signifikanter Unterschied im Balzverhalten registriert. Diese Tatsache erschwert eine mögliche Interpretation der vorliegenden Ergebnisse, denn die Balzaktivität wird möglicherweise bereits durch den genetischen Hintergrund beeinflusst. Wildtypische Fliegen zeigten in dem Courtship Index einen signifikanten Unterschied zu der UAS:Effektorlinie, Gal4-Promotorlinie sowie zu dem Fliegenstamm mit ablatierten SIFamidergen Neuronen (Abb. 33B). Weibliche Taufliegen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen zeigten keinen signifikanten Unterschied im Courtship Index zu den zur Kontrolle herangezogenen Parentallinien. Dieser Umstand gilt ebenfalls für die Courtship-Latenz. Demnach waren die Weibchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen nicht rezeptiver für die Balz durch wildtypische Männchen (Abb. 33C und 33D). Als letztes Experiment wurde das Männchen-Männchen Balzverhalten beobachtet. In diesem Experiment wurden die SIFamidergen Neurone während der Entwicklung ablatiert. Hier wurde eine sehr reduzierte Bereitschaft zur Balz gefunden. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Männchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen und Männchen der Parental- und Wildtyplinien gefunden (Abb. 33E und 33F).

Die gefundenen Daten zeigen, dass durch eine thermogenetisch induzierte Depolarisation der SIFamidergen Neurone die Fliegen mehr Zeit für die Balz aufwendeten, als die Kontrolltiere (Abb. 31). Es wurde jedoch kein Unterschied in der Courtship-Latenz gefunden (Abb. 31). Terhzaz et al. (2007) fanden, dass die Männchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen ein wahlloses Balzverhalten aufwiesen. Um einen möglichen Einfluss des Neuropeptides SIFamid auf das Balzverhalten zu untersuchen, wurden Balzverhaltensexperimente mit Männchen unternommen, dessen SIFamiderge Neurone während der Entwicklung ablatiert wurden. Für weibliche *Drosophila* mit ablatierten SIFamidergen Neuronen konnte nicht gezeigt werden, dass diese empfänglicher für die Balz von wildtypischen Männchen waren. Darüber hinaus zeigten Männchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen keine Änderung in der Präferenz ihres Sexualverhaltens (Abb. 33).

5.2.2 Die Aktivierung der SIFamidergen Neurone führt zu einer Zunahme der Nahrungsaufnahme

Es wurden Experimente zur Nahrungsaufnahme bei *Drosophila* durchgeführt. Diese Verhaltensstudien wurden mit "satten" sowie mit "ausgehungerten" Taufliegen durchgeführt. Für die Experimente zur Nahrungsaufnahme wurden verschiedene Temperaturen gewählt. Bei 29°C wurden die SIFamidergen Neurone durch Expression von dTrpA1 aktiviert. Es sollte dabei geklärt werden, ob es durch die artifiziell hervorgerufene Depolarisation der SIFamidergen Neurone zu einer messbaren veränderten Nahrungsaufnahme kommt.



Abb. 34. Experimente zur Nahrungsaufnahme von weiblichen *Drosophila* durch eine artifiziell hervorgerufene Depolarisation der SIFamidergen Neurone.

Nahrungsaufnahme mit "gesättigten" *Drosophila* sowie mit "ungesättigten" Fliegen bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Y-Achse zeigt die relative Absorption der homogenisierten Fliegen bei 500nm MW \pm Standardfehler an, die X-Achse die verschiedenen Genotypen. 34A) Experiment zur Nahrungsaufnahme mit "gesättigten" *Drosophila* bei 29°C. Stichprobengröße für alle Gruppen n = 7. 34B) Experiment zur Nahrungsaufnahme mit nicht gehungerten Fliegen bei 18°C. Stichprobengröße für alle Gruppen n = 7. 34C) Die Taufliegen wurden für 48h gehungert und daraufhin auf deren Nahrungsaufnahme getestet bei 29°C. Stichprobengröße für alle Gruppen n = 6. 34D) Experiment zur Nahrungsaufnahme mit gehungerten *Drosophila* bei 18°C. Stichprobengröße für alle Gruppen n = 6. Statistischer Test: Kruskal-Wallis ANOVA mit Mann-Whitney U-Test und anschließender Bonferroni Korrektur. Signifikanz * = p < 0,05, ** = p < 0,001, n.s. = nicht signifikant.

Aus Abbildung 34A ist ersichtlich, dass durch die thermogenetisch induzierte Aktivierung der SIFamidergen Neuronen bei der Linie SIFa2-Gal4/UAS:dTrpA1 zu einer Änderung in der Nahrungsaufnahme führt. *Drosophila* dieses Genotyps konsumierten signifikant mehr roten Farbstoff, als die zur Kontrolle herangezogenen Parentallinien p < 0,001. Anschließend wurde das Experiment bei 18°C durchgeführt (Abb. 34B). Bei dieser Temperatur sollte es nicht zu einer künstlichen Aktivierung der SIFamidergen Neurone kommen. Es zeigte sich, dass alle getesteten Fliegenstämme weniger roten Farbstoff in ihren Körpern hatten. Im Gegensatz zu den Experimenten bei 29°C zeigten "gesättigte"

Drosophila keine vermehrte Nahrungsaufnahme (Abb. 34B). Die darauffolgenden Experimente wurden mit "ungesättigten" Taufliegen durchgeführt. Hierfür wurden die Drosophila für 48h auf feuchtes Filterpapier gesetzt und jeglicher Zugang zu einer kalorischen Nahrung entzogen. Im anschließenden Experiment bei einer Temperatur von 29°C zeigten alle Gruppen eine verstärkte Nahrungsaufnahme, welche sich im hohen Absorptionswerte wiederspiegelte (Abb. 34C). Auffällig ist, dass die UAS:Effektor Fliegenlinie deutlich weniger Nahrung konsumiert, als die parallel getesteten anderen Fliegenstämme. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Wildtyplinie und der UAS:Effektorlinie festgestellt werden. Das bedeutet, dass bereits eine Parentallinie, wahrscheinlich aufgrund des genetischen Hintergrundes, weniger Nahrung konsumiert. Dieser Umstand erschwert die Interpretation der vorliegenden Daten (Abb. 34C). Interessanterweise ist bei der Fliegenlinie, die den dTrpA1-Kanal in den SIFamidergen Neuronen exprimieren der ermittelte Absorptionswert höher, als bei den parallel getesteten Kontrolllinien (Abb. 34C). Das dazugehörige Kontrollexperiment wurde bei einer Temperatur von 18°C durchgeführt (Abb. 34D). Auffällig war, dass die gemessenen Absorptionswerte bei einer Temperatur von 18°C niedriger sind, als bei einer Temperatur von 29°C. Es wurde bei 18°C kein signifikanter Unterschied in der gemessenen Absorption zwischen den unterschiedlichen Fliegenstämmen gefunden (Abb. 34D).

Die gefundenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Zellen die "gesättigten" Fliegen in einer Art reagieren, als wären sie "gehungert". Darüber hinaus zeigten "gehungerte" Fliegen mit gleichzeitiger artifiziell hervorgerufener Depolarisation der SIFamidergen Neuronen ebenso mehr roten Farbstoff in ihren Körpern, als die als Kontrolle geltenden Parental- und Wildtyplinien. Das lässt den Schluss zu, dass die Aktivierung der SIFamidergen Neurone eine orexigene Wirkung auf die Taufliegen hat.

Anschließend wurde auf einer Vielzahl von Möglichkeiten zurückgegriffen, um die SIFamidergen Neuronen "stillzulegen" oder die Translation des Neuropeptides SIFamid zu reduzieren. Es wurde der "outward rectifying" K⁺-Kanal (dORK) (Nitabach et al., 2002) in SIFamidergen Neuronen exprimiert, um die Zellmembran zu hyperpolarisieren. In einem anderen Ansatz wurde das temperaturempfindliche Dynamin shibire^{ts} (Kitamoto, 2001) in SIFamidergen Neuronen exprimiert, um durch Temperaturänderungen synaptische Transmission zu blockieren. Zu Letzt sollten die Neurone mittels induzierter Apoptose, durch Überexpression des Proteins "Reaper" (White et al., 1996) komplett ablatiert werden. Mit Hilfe der RNAi-Methode (Fire et al., 1998) sollte ebenso die Translation des Neuropeptides SIFamid reduziert werden. Um zu vergleichen, ob die Inaktivierung der SIFamidergen Neurone zu einem gegenteiligen Effekt zu den bisher gefundenen Ergebnissen haben könnte, wurde abermals die Nahrungsaufnahme mit "gehungerten" oder "satten" Fliegen quantifiziert.



Abbildung 35. Abbildungslegende auf der nächsten Seite.

Abb. 35. Expression des Neuropeptids SIFamid nach induzierter RNA Interferenz und Experimente zur Nahrungsaufnahme.

Die Y-Achse zeigt die normalisierte Expression des Neuropeptides SIFamid im Vergleich zu den Wildtypen (CS) MW ± Standardfehler. Die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Genotypen. 35A) Durch induzierte RNA Interferenz bei 29°C lag die Expression des Neuropeptides SIFamid signifikant unter dem Niveau von CS. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den weiteren Kontrollgruppen gefunden. Die Stichprobengröße betrug bei der Kreuzung UAS:RNA_{i(SIFamide)};SIFa2-Gal4;TM3sb und CS jeweils n = 10. Für die Parentallinie SIFa2-Gal4;tubGal80^{ts} eine Stichprobengröße von n = 8 und für UAS:RNA_{i(SIFamid)} n =11. Der Stichprobenumfang von der Kreuzung UAS:RNA_{i(SIFamide});SIFa2-Gal4;tubGal80^{ts} betrug n = 9.35B) Ergebnis der Expression des Neuropeptides SIFamid bei 18°C. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden. Stichprobengröße je Genotyp n = 3. Statistischer Test: ANOVA mit Bonferroni-Korrektur als post-hoc. Signifikanz: * p < 0.05, ** p < 0.001, n.s. = nicht signifikant. 35C) Hungrige Fliegen mit einer reduzierten Expression des Neuropeptides SIFamid wurden bei 29°C auf deren Nahrungskonsum überprüft. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. Der Stichprobenumfang betrug bei der Kreuzung UAS:RNA_{i(SIFamide)};SIFa2-Gal4;tubGal80^{ts} n = 16 und bei der zweiten Kreuzung UAS:RNA_{i(SIFanide)};SIFa2-Gal4;TM3sb n = 14. Die Stichprobengröße betrug bei der Parentallinie SIFa2-Gal4;tubGal80^{ts}/TM3sb n = 11 und für UAS:RNA_{i(SIFamid)} n = 16. Bei CS betrug die Stichprobengröße n = 14. 35D) Die Nahrungsaufnahme mit "gesättigten" Drosophila mit gestörter Translation des Neuropeptides SIFamid bei 29°C. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Nahrungsaufnahme zwischen den Genotypen festgestellt. Die Stichprobengröße betrug bei allen Gruppen n =6. 35E) Es wurden für 24 Stunden "gehungerte" weibliche Drosophila, welche dORK in SIFamidergen Neuronen exprimieren bei 29°C auf ihre Nahrungskonsum untersucht. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. Der Stichprobenumfang betrug bei allen Gruppen n = 8.35F) Die Nahrungsaufnahme mit "ungesättigten" Drosophila mit inhibierter Vesikelausschüttung durch shibire^{ts} bei 32°C. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Nahrungsaufnahme zwischen der Kreuzung und der Parentallinie SIFa2-Gal4 zu UAS:shibire^{ts} festgestellt. Stichprobenumfang betrug bei allen Gruppen n = 8. Statistischer Test: Kruskal-Wallis ANOVA mit Mann-Whitney U und anschließender Bonferroni Korrektur. Signifikanz: * *p* < 0,05, ** *p* < 0,001, *** *p* < 0,0001, n.s. = nicht signifikant.

Durch induzierte RNA-Interferenz sollte die Translation des Neuropeptides SIFamid reduziert werden (Abb. 35A). Mittels quantitativer PCR wurde eine Reduzierung der Expression des Neuropeptides SIFamid um 10-20% im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt (Abb. 35A). Dennoch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Fliegen, bei denen die RNAi-Expression induziert wurde und den Parentallinien festgestellt. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen CS und den beiden Fliegenstämmen, in denen die Translation des Neuropeptides SIFamid gestört ist festgestellt werden (Abb. 35A). Das Ergebnis deutet daraufhin, dass bei 29°C die Wildtyplinie einen höheren Anteil an SIFamid enthält, als die Parentallinien und den Testgruppen (Abb. 35A). Dieser Umstand erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Als vorgesehene Kontrolle wurde die Translation von SIFamid nicht unterbunden. Dafür wurden die Fliegen bei 18°C gehalten, so dass es zu keiner Induktion der RNA Interferenz kommen sollte (Abb. 35B). Es zeigte sich, dass die Expression des Neuropeptides nicht gestört war und es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gab (Abb. 35B). Daraufhin wurden Verhaltensexperimente mit "gesättigten" und "hungrigen" *Drosophila* durchgeführt. Aus Abbildung 35C ist ersichtlich, dass die Fliegen mit gestörter Translation des Neuropeptides SIFamid eine ganz leicht geringere Nahrungsaufnahme aufwiesen, als die Kontrollgruppen. Dennoch wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abb. 35C). Die gleichen Experimente wurden mit "gesättigten" Taufliegen bei gleicher Temperatur durchgeführt (Abb. 35D). Hier wurde kein Unterschied zwischen den Testgruppen und den dazugehörigen Parentallinien bei der Nahrungsaufnahme festgestellt.

In dem folgenden Experiment wurden die SIFamidergen Neuronen mit dem Drosophila "Open Rectifier" Kalium Kanal (dORK) elektrisch stillgelegt. Die Taufliegen wurden bei 25°C für 24 Stunden gehungert und danach in das Experiment überführt. Nach einer Stunde Nahrungsaufnahme lag die gemessene Absorption bei allen Gruppen ca. auf dem gleichen Wert. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Abb. 35E). Mit der dORK Methode zur Hyperpolarisierung von Neuronen konnte eine geringere Nahrungsaufnahme nicht nachgewiesen werden, so dass als Folgeexperiment mit shibire^{ts} gearbeitet wurde, um die Endozytose der Vesikel zu verhindern. Ebenso wie im vorherigen Experiment wurden die Fliegen für 24 Stunden bei 25°C jeglicher Zugang zur Nahrung verwehrt. Eine halbe Stunde bevor das eigentliche Experiment begann wurden die Fliegen in einem Inkubator, eingestellt auf 32°C, gestellt und danach auf das Futtermedium überführt. Die Endozytose der Vesikel ist bei der Linie UAS:shi^{ts};SIFa2-Gal4 inhibiert, so dass die Vesikel nach Entladung nicht erneut beladen werden können. Anhand der statistischen Auswertung kann angegeben werden, dass die Kreuzung und die Parentallinie sich signifikant unterschiedlich in der Nahrungsaufnahme zu der zweiten Parentallinie UAS:shi^{ts};+;UAS:shi^{ts} verhalten (Abb. 35F). Das bedeutet erneut, dass die UAS:Effektorlinie aufgrund des genetischen Hintergrundes sich in der Nahrungsaufnahme unterschiedlich verhält, als die Test- und Kontrollgruppen (Abb. 35F). Diese Tatsache erschwert erneut die Interpretation der Ergebnisse.

Es wurde anschließend versucht die SIFamidergen Neurone in adulten Fliegen durch die Rpr-Technik abzutöten (Abb. 36). Es konnte durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen werden, dass die SIFamidergen Neurone nicht ablatiert werden konnten (Abb. 36).

Ergebnisse



Abb. 36. Versuch in adulten Fliegen die SIFamidergen Neurone mit Rpr-Technik zu ablatieren.

Immunreaktion gegen die Neuropile des Gehirnes (magenta) und gegen SIFamid (grün). Weißer Pfeil deutet auf die Somata der SIFamidergen Neuronen hin.

Obwohl in den vorangegangenen Experimenten zur Nahrungsaufnahme bei einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neuronen die Fliegen erhöhten Anteil an roten Farbstoff aufwiesen, konnte in den Experimenten, bei denen die Neurone "stillgelegt" wurden oder die Translation des Neuropeptides gestört war, kein Unterschied in der Nahrungsaufnahme zwischen den Genotypen nachgewiesen werden.

In den folgenden Experimenten wurde erneut mit einer artifiziellen hervorgerufenen Depolarisation der SIFamidergen Neuronen gearbeitet und den Effekt auf einen appetitiven gustatorischen Stimulus untersucht.

5.2.3 Die thermogenetisch induzierte Ausschüttung von SIFamid führt zu einer erhöhten Reaktion auf einen appetitiven gustatorischen Stimulus

In Rahmen ihrer Bachelorarbeit hat Frau Mirjam Vanessa Sommer unter meiner Anleitung getestet, ob SIFamid das gustatorisch evozierte, appetitive Verhalten beeinflusst (Sommer, 2012). Ein gut beschriebenes Verhaltensparadigma beruht auf der Messung des Rüsselreflexes (proboscis extension reflex, Abk. PER), der durch Zuckerstimulation ausgelöst werden kann (Gordon und Scott, 2009; Shiraiwa und Carlson, 2007). Der Temperatur-kontrollierte Versuchsaufbau, die Methode der Datenerfassung und die Datenauswertung wurden von mir etabliert. Nachdem die Quantifizierung der gustatorischen Sensitivität der Tiere über das Messen des Proboscis-Extension-Reflexes reproduzierbar und robust möglich war, wurden die Versuche Frau Sommer übergeben, die die unten gezeigten Daten erfasst und ausgewertet hat. Der Versuch beruht darauf, dass der Rüsselreflex abhängig von der Reizintensität, d.h. der Konzentration der Zuckerlösung, als auch von dem internen Hungerzustand ist (Abb. 37). Uhrzeit und Sättigungsgrad der Tiere wurden während der Versuche peinlich genau kontrolliert und konstant gehalten. Es konnte gezeigt werden, dass "gesättigte" Taufliegen des Genotyps SIFa2-Gal4/UAS:dTrpA1 signifikant öfter auf einen Zuckerreiz und schon bei niedrigerer Reizintensität mit

Herausstrecken des Saugrüssels reagieren als die als Kontrollen herangezogenen Parentalund Wildtyplinien (Abb. 37).



Abbildung 37. Rüsselreflex Antwortverhalten auf Stimulation mit unterschiedliche Saccharosekonzentrationen.

Die Y-Achse zeigt die Antwortstärke der Taufliegen auf zunehmenden Saccharosekonzentrationen. Die X-Achse zeigt aufsteigende Saccharosekonzentration in mM. Die Experimente wurden mit "gesättigten" *Drosophila* bei 29°C (37A) und 18°C (37B) durchgeführt. 37C) beschreibt das Antwortverhalten mit "ungesättigten" *Drosophila* bei 29°C und (37D) bei 18°C. 37A) reagiert die Linie, bei denen der hitzesensitive Kationenkanal in den SIFamidergen Neuronen exprimiert wurde, 20% häufiger auf den appetitiven Stimulus als die Parentallinien. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Fliegenlinie SIFa2-Gal4/UAS:dTrpA1 und allen anderen Gruppen wurde mit * gekennzeichnet, sollte das nicht zutreffen, so wurde nichts vermerkt, n.s. = nicht signifikant. Statistischer Test chi-Quadrat Vierfelder-Test. Signifikanz: * p < 0,05, Stichprobengröße n = 25.

Die Kreuzung SIFa2-Gal4/UAS:dTrpA1 reagiert in etwa doppelt so häufig auf einen 500-1000mM Saccharosestimulus als die Parentallinien (Abb. 37A). Die Kreuzung reagiert bei einer Saccharosekonzentration von 500mM signifikant stärker zu der SIFa2-Gal4, p =0,048 und zu UAS:dTrpA1 p = 0,002 und zu den Wildtyp p = 0,024. Dennoch ist aus Abbildung 37A ersichtlich, dass mit Zunahme der Saccharosekonzentration alle getesteten

Ergebnisse

Genotypen stärker auf die Stimulation reagierten. Die getesteten Parentalgruppen unterscheiden sich im Antwortverhalten auf einen Saccharosestimulus allerdings nicht. Das dazugehörige Kontrollexperiment, bei dem der dTrpA1-Kanal verschlossen blieb, wurde mit den gleichen Genotypen bei 18°C durchgeführt (Abb. 37B). Hier zeigt sich, dass sämtliche Genotypen insgesamt mit weniger als 20% auf die angebotenen Futterreize reagierten, was auf die niedrige Temperatur und entsprechend niedrigere Aktivität der Tiere zurückzuführen ist, die natürlich auch eine entsprechend niedrigere Metabolismus-Rate aufweisen. Wichtig ist, dass die ektopisch in SIFamidergen Neuronen dTrpA1-exprimierenden Tiere keinen Unterschied zu den Kontrolllinien aufweisen (Abb. 37).

Der artifiziell induzierte Effekt der Aktivierung SIFamiderger Neurone lässt vermuten, dass die Tiere so reagieren, als hätten sie eine höhere Motivation, auf futterinduzierte Reize appetitiv zu reagieren ("Hunger"). Um zu testen, ob die Tiere in "ausgehungertem" Zustand tatsächlich stärker auf Zuckerreize reagieren und ob die Aktivierung SIFamiderger Neurone einen additiven Effekt hat, wurden die Experimente ebenfalls mit "ausgehungerten" Drosophila durchgeführt, denen für 48Stunden kalorische Nahrung vorenthalten wurde. Wie in Abbildung 37C ersichtlich zeigten alle getesteten Drosophila nach 48Stunden eine erhöhte Antwortstärke auf alle angebotenen Saccharose-Konzentrationen. Die "ungesättigten" Drosophila melanogaster reagierten bereits auf eine geringe Saccharose Konzentration von 100mM. Bei höheren Saccharose-Konzentrationen reagierte nur die Kreuzung SIFa2-Gal4/UAS:dTrpA1 auf die Zuckerstimulation zunehmend, wohingegen bei den weiteren Parentallinien die Reaktion auf Zuckerwasser stagniert (Abb. 37C). Bei einer Saccharosekonzentration verhält sich die Kreuzung SIFa2-Gal4/UAS:dTrpA1 signifikant unterschiedlich zu CS und zu SIFa2-Gal4, aber nicht zu der Parentallinie UAS:dTrpA1. Bei der Rüsselreflex Methode bei einer Temperatur von 18°C reagierten alle Genotypen ähnlich auf den angebotenen Zuckerreiz (Abb. 37D). Wohingegen bei 29°C eine bis zu dreifach erhöhte Reaktion auf den gustatorischen Reiz zu beobachten war. Es muss festgehalten werden, dass sogar bei "hungrigen" Taufliegen die Kreuzung in etwa 10% häufiger auf den appetitiven, gustatorischen Reiz reagierte als die Kontrolllinien. Dies lässt die Vermutung zu, dass der gefundene Effekt additiv ist.

Diese Experimente zeigen, dass gustatorisch evoziertes Verhalten durch SIFamid moduliert wird. Das appetitive Verhalten der Tiere ist bei Freisetzung von SIFamid verstärkt, gleichsam als wären die Tiere in einem Hungerzustand, der nicht nur das

~ 95 ~

konsumatorische, sondern auch die appetitive Verhaltensweisen bestimmt. Da SIFamiderge Zellen weite Bereiche des *Drosophila*-Gehirns innervieren und auch die olfaktorischen Neuropile, z.B. die Antennalloben, nicht aussparen, sollte in der Folge getestet werden, ob auch olfaktorisch ausgelöstes, appetitives Verhalten durch SIFamid beeinflusst wird.

5.2.4 SIFamid verstärkt die olfaktorische Präferenz gegenüber einem appetitiven Duft, aber beeinflusst nicht die Reaktion auf einem aversiven Duft

Die anatomischen Daten der SIFamidergen Zellen im Gehirn von *Drosophila melanogaster* zeigen, dass die SIFamiderge Neurone in die Antennalloben verzweigen. In den folgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob eine thermogenetisch induzierte Aktivierung der SIFamidergen Neurone zu einer Änderung der olfaktorischen Präferenz führt. Die Versuche wurden in Klimakammern durchgeführt, die eine konstante Temperatur und eine kontrollierte Luftfeuchtigkeit von 60% boten. Getestet wurden die Taufliegen mit einem appetitiven oder einen aversiven Duft in variierender Konzentration in einem T-Maze-Paradigma. Als appetitiven Duft wurde Ethylacetat gewählt. Dieser Duft wurde als attraktiv beschrieben (Rodrigues, 1980; Siddiqi, 1988; Khurana und Siddiqi 2013). Als, für die Taufliegen, unattraktiver Duft wurde Benzaldehyd gewählt (Rodrigues, 1980; Siddiqi, 1988; Khurana und Siddiqi, 2013).



Abb. 38. Olfaktorische Präferenzen von "gesättigten" und "ungesättigten" *Drosophila* mit unterschiedlichen Düften bei 29°C und 18°C.

Die Y-Achse zeigt die Präferenz Indices MW ± Standardfehler der verschiedenen Genotypen. Die X-Achse gibt, logarithmisch aufgetragen, die Konzentration des Duftes verdünnt in Mineralöl an. Präferenz Indices um 0 deuten auf keine Präferenz zu dem Duft hin. 38A) Test bei 29°C mit Ethylacetat mit unterschiedlicher Konzentration. *Drosophila* die den wärmesensitiven dTrpA1 Kanal in den SIFamidergen Neuronen exprimieren zeigten eine deutlich stärkere Bevorzugung der Duftverdünnungen auf als die Kontrolltiere. 38B) Das Duftexperiment mit "gesättigten" *Drosophila* bei 18°C. Alle Tiere weisen ähnliche Präferenz Indices auf. 38C) Diese Abbildung zeigt die olfaktorische Präferenz von hungrigen Fliegen bei 29°C. Alle Tiere zeigten eine deutliche Hinwendung zum appetitiven Duft auf. 38D) Das Duftexperiment mit "ungesättigten" *Drosophila* bei 18°C. 38E) Benzaldehyd wurde den Taufliegen bei 29°C angeboten. Alle Gruppen weisen negative Präferenz Indices auf. 38F) Benzaldehyd wurde den Taufliegen bei 18°C angeboten. Es zeigte sich wiederholt Vermeidungsverhalten. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Fliegenlinie SIFa2-Gal4/UAS:dTrpA1 und allen anderen Gruppen wurde mit * gekennzeichnet, sollte das nicht zutreffen, so wurde nichts vermerkt, n.s. = nicht signifikant. Statistischer Test: Kruskal-Wallis ANOVA

und Mann-Whitney U-Test mit Bonferroni Korrektur als post-hoc Entscheidung. Die Stichprobengröße betrug bei allen Genotypen jeweils n = 15.

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer artifiziell hervorgerufenen Depolarisation der SIFamidergen Neurone "gesättigte" Drosophila signifikant stärker mit einer Hinwendung auf den angebotenen Duft reagierten als die Parentallinien (Abb. 38A). Darüber hinaus zeigte dieser Genotyp bereits bei einer schwachen Ethylacetat Konzentration eine deutlich stärkere Präferenz zum Duft auf. Erkennbar ist, dass auch der Standardfehler des Mittelwertes zunimmt, was auf eine Änderung in der olfaktorischen Präferenz der Taufliegen hindeutet. Die parallel getesteten Kontrollfliegen zeigten keinen Anstieg in der Duftpräferenz auf. Drosophila, bei denen mit einem Temperaturstimulus die SIFamidergen Neurone aktiviert wurden, zeigten einen signifikanten Unterschied zu den Parentallinien bei einer Duftverdünnung von 1:100 und 1:10. Zu der Gal4-Promotorlinie lag der signifikante Unterschied bei p = 0.03 und zu der UAS:Effektorlinie bei p = 0.012 und zu den getesteten Wildtypen lag der Unterschied bei p = 0,0019. Bei einer geringeren Verdünnung von Ethylacetat 1:10 unterscheidet sich die Kreuzung erneut signifikant zu der Gal4-Linie p = 0,022, UAS-Linie p = 0,017 und Wildtypen p = 0,009. Ab einer Konzentration mit Ethylacetat von 1:2 ändert sich das Verhalten der Insekten. Die Fliegen zeigten keine Hinwendung zum Duft. Darüber hinaus wurde bei der Letzt gewählten Konzentration mit Ethylacetat kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Abb. 38A).

Als Kontrollexperiment wurden die gleichen Experimente in einer Klimakammer bei 18°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur sind die wärmesensitiven Kationenkanäle geschlossen (Hamada et al., 2007). Folglich sollte es zu keiner Depolarisation der SIFamidergen Neurone kommen (Abb. 38B). Bei diesen Kontrollexperimenten wurde kein signifikanter Unterschied mit den jeweiligen Ethylacetatkonzentrationen zwischen den Gruppen gefunden. Alle getesteten Genotypen weisen ähnliche Präferenz Indices auf. Bei den Fliegen, die den hitzesensitiven Kationenkanal in den SIFamidergen Neuronen exprimieren und den Kontrolllinien, wurde eine leichte Bevorzugung zum appetitiven Duft beobachtet. Bei einer hohen Konzentration von Ethylacetat vermeiden alle Genotypen den angebotenen Duft.

Um die Frage zu überprüfen, ob der gefundene Phänotyp mit "satten" Drosophila mit einer Änderung des Hungerzustandes zusammenhängt, wurden die Experimente mit

dem appetitiven Duft Ethylacetat mit "hungrigen" *Drosophila* durchgeführt. Den Fliegen wurde für 48h jeglicher Zugang zu einer kalorischen Mahlzeit vorenthalten (Abb. 38C und 38D). Nach 48 stündigem Nahrungsentzug zeigten alle Fliegenstämme eine deutlich stärkere Hinwendung zum Duft. Erst bei einer Konzentration von 1:2 wirkt Ethylacetat auf die ausgehungerten Tiere weniger attraktiv. Aus Abb. 38C ist erkennbar, dass bei Tieren mit einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neuronen die Hinwendung zum appetitiven Duft stärker ausgeprägt ist, als bei den als Kontrolle herangezogenen Parentallinien. Das gleiche Experiment wurde mit "ausgehungerten" Tieren bei 18°C wiederholt. Auch bei diesem Experiment zeigte sich, dass alle Fliegenstämme eine deutlich stärkere olfaktorische Präferenz zum appetitiven Duft aufweisen (Abb. 38D). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei der olfaktorischen mit "ungesättigten" *Drosophila* gefunden.

In weiteren olfaktorischen Tests wurde der Frage nachgegangen, wie Drosophila auf einen aversiven Duft reagieren. Diese Experimente wurden ebenfalls bei 18°C und 29°C durchgeführt (Abb. 38E und 38F). Bei einer Temperatur von 29°C sollte es zu einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neurone kommen. Bei allen Gruppen wurde bei einer Verdünnung von 1:1000 keine Präferenz zum Duft festgestellt. Bei der nächst höherer Verdünnung von Benzaldehyd 1:100 zeigten alle Genotypen ein Ausweichverhalten. Die gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass alle Gruppen den angebotenen Duft als unattraktiv beurteilen. Ab einer Verdünnung von 1:10 und 1:2 zeigten die unterschiedlichen Genotypen massives Ausweichverhalten. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Abb. 38E). Bei 18°C und einer Verdünnung des Duftes Benzaldehyd mit 1:1000 vermieden alle Genotypen den angebotenen Duft oder zeigten keinerlei Präferenz. Bei einer geringeren Verdünnung mit Benzaldehyd 1:100 zeigte sich, dass alle Genotypen den Duft stärker vermieden, ausgenommen davon war die Gal4-Promotorlinie, die einen positiven Präferenz Index zeigte. Sobald eine höhere Konzentration von Benzaldehyd mit 1:10 und 1:2 benutzt wurde, zeigten alle getesteten Gruppen ein massives Ausweichverhalten. Bei der statistischen Auswertung ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei den jeweiligen Verdünnungsstufen.

Die gefundenen Ergebnisse zeigen, dass durch einer künstlich induzierten Depolarisation der SIFamidergen Neurone die *Drosophila* eine Steigerung in ihrer olfaktorischen Präferenz aufweisen. Die Tiere scheinen motivierter zu sein sich zu einem appetitiven präsentierten Duft hinzuwenden (Abb. 38A). Bei einer Temperatur von 18°C werden die SIFamidergen Neurone nicht durch einen Temperaturstimulus aktiviert und die Fliegen verhielten sich in ihrer olfaktorischen Präferenz in ähnlicher Weise wie die Parentallinien und die Wildtypen (Abb. 38B). Die Schlussfolgerung ist, dass der gefundene Phänotyp auf die artifiziell hervorgerufene Depolarisation der SIFamidergen Neurone zurückzuführen ist.

Diese Experimente zeigen, dass olfaktorisch evoziertes Verhalten durch SIFamid moduliert wird. Das appetitive Verhalten der Tiere ist bei Freisetzung von SIFamid verstärkt, gleichsam als wären die Tiere in einem Hungerzustand. Es konnte bereits durch vorangegangene Experimente gezeigt werden, dass die thermogenetisch induzierte Aktivierung der SIFamidergen Neurone verstärkend auf appetitives gustatorisches und konsumatorisches Verhalten wirkt.

5.3 In-vivo Calcium Imaging

5.3.1 Überprüfung der SIFa-LexA und der LexAOP:dTrpA1-mCherry Linien

Die neu generierten Fliegenstämme, LexA unter der Kontrolle des SIFa-Promotors und ein dTrpA1-mCherry Konstrukt unter der Kontrolle von LexAOP, wurden auf deren Funktionalität überprüft. Für das SIFa-LexA Konstrukt wurden neun verschiedene Linien bereitgestellt, bei denen die Insertion auf unterschiedlichen Chromosomen vorzufinden war. Individuen der einzelnen Linien wurden mit Fliegen verpaart, die das LexAOP:GCaMP Konstrukt (Jonas Barth. unveröffentlicht) besaßen. Die Expressionsstärke der Fluoreszenz wurde in Hirnen der ersten Tochtergeneration mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Abb. 39). Es wurde gefunden, dass alle neu generierten SIFa-LexA Linien funktionieren, mit der Ausnahme der Linie 1M und 6M. In diesen Linien wurden auch Fliegen ohne Expression nachgewiesen (Abb. 39B). Für zukünftige Experimente wurde mit der 5M SIFa-LexA Fliegenlinie gearbeitet, da diese Gruppe die stärkste Fluoreszenz aufwies (Abb. 39B).



Abbildung 39. Expressionsstärke der Fluoreszenz zwischen den unterschiedlichen SIFa-LexA Linien. 39A) Exemplarisches Beispiel für die Überprüfung der SIFa-Lex Linien. Zu sehen sind die Somata der SIFamidergen Neuronen. Skalierungsbalken: 50 μ m. 39B) Die Y-Achse gibt die relative gemessene Fluoreszenzstärke von SIFa-LexA getriebenem GCaMP an. Dargestellt wurde der Unterschied zwischen der Pixelintensität der Zellregion und der Hintergrundregion Mittelwert ± Standardabweichung. Die X-Achse zeigt die neu generierten SIFa-LexA Linien. Der Stichprobenumfang betrug bei allen Gruppen n = 5, außer bei 9M n = 4 sowie bei den SIFa-LexA Linien 1M, 2M und 7M n = 3. * bedeutet, dass auch Tiere ohne Expression gefunden wurden. Der Nachweis über die Funktionalität der SIFa-LexA Linien wurde in Kooperation mit Ulrike Pech und Dr. Thomas Riemensperger durchgeführt.

Außerdem wurden die neu generierten der LexAOp:dTrpA1-mCherry auf deren Funktionalität hin getestet. Als erstes wurden Individuen verschiedener generierter Linien des Genotyps Or83B-LexA gekreuzt. Bei diesen Fliegen müsste das Protein mCherry in den Antennen und den Maxillarpalpen der ersten Tochtergeneration detektiert werden. Mit Hilfe des Fluoreszenzbinokulars konnte die Expression des LexAOp:dTrpA1-mCherry nachgewiesen werden (Abb. 40A). Daraufhin wurden die Fliegen mit einer tub:LexA Linie verpaart. Dadurch wird dTrpA1-mCherry ubiquitär im Tier exprimiert. Die Nachkommen wurden in einem temperierten Wasserbad einer Temperatur von 32°C ausgesetzt, um die Funktionalität des hitzesensitiven dTrpA1 Kanals in einem Paralyse Experiment zu überprüfen. Die Latenz zur eintretenden Paralyse wurde exakt notiert (Abb. 40B). Wie aus Abbildung 40 zu erkennen ist, treten alle Tiere, die das dTrpA1-mCherry Konstrukt ubiquitär exprimieren, nach kurzer Zeit in eine Starre. Das Ergebnis zeigt, dass alle generierten LexAOP:dTrpA1-mCherry Fliegen für weitere Experimente genutzt werden können. Für die nachfolgenden *in-vivo* Calcium Imaging Experimente wurde mit der Fliegenlinie 3M LexAOP:dTrpA1-mCherry gearbeitet.



Abbildung 40. Überprüfung der neu generierten LexAOp:dTrpA1-mCherry Fliegen.

40A-40C) Die Abbildungen zeigt die Expression des dTrpA1-mCherry Konstrukt in den Antennen (AN) und den Maxillarpalpen (MP) in Or83bLexA/dTrpA1-mCherry Fliegen. 40D) Als Kontrolle wurde CS gewählt, die das Protein mCherry nicht exprimieren. Skalierungsbalken beträgt 500µm. 40E) Diese Abbildung zeigt die Paralyse Latenz der neu generierten Fliegen und als Kontrolle herangezogenen Parentallinien. Die Y-Achse zeigt die Paralyse Latenz (s) \pm Standardfehler an. Die X-Achse zeigt die Parentallinien sowie die Fliegen, die das dTrpA1-mCherry Konstrukt unter tub-LexA Kontrolle exprimieren. Bei einer Temperatur von 32°C paralysierten die Kreuzungen nach ca. 25s. Die Parentallinien fielen in keine Starre. K.P. bedeutet, dass keine Paralyse beobachtet wurde. Stichprobengröße betrug bei allen Parental- und Wildtyplinie n = 5. Für die Kreuzung 1M betrug die Stichprobengröße n = 3, für die Kreuzung 2M n = 17. Für die Kreuzung 3M n = 11.

5.3.2 SIFamid wirkt modulierend auf die olfaktorischen Rezeptorneurone in den Antennalloben

Durch immunhistochemische Färbungen des *Drosophila* Gehirnes wurde eine hohe Dichte Bouton-ähnlicher Strukturen in den Antennalloben entdeckt. Die Vermutung liegt nahe, dass SIFamid dort Wirkung erzielt. In Bezugnahme zu den olfaktorischen Präferenztests konnte gezeigt werden, dass durch eine thermogenetisch induzierte Aktivierung der SIFamidergen Neurone die Tiere mit einer stärkeren Duftantwort reagieren. Daher wurden im folgendem *in-vivo* Calcium Experimente durchgeführt. In den Neurowissenschaften ist es von großem Interesse die neuronale Aktivität bei Tieren aufzuzeichnen, während ein spezifisches Verhalten gezeigt wird (Grienberger und Konnerth, 2012). Das neuartige an diesem Experiment war, dass wir mit einem Hitzestimulus die SIFamidergen Neuronen aktivieren und gleichzeitig mit Hilfe der Calcium-Sensor Line UAS:GCaMP3.0 (Tian et al., 2009) die neuronale Aktivität in den olfaktorischen Rezeptorneurone messen konnten. Das gelang uns mit der Kombination von dem UAS/Gal4 Systems (Brand und Perrimon, 1993) und dem LexA/LexAOp Systems (Lai und Lee, 2004). Um die dTrpA1-induzierte Aktivierung von Neuronen unter dem Mikroskop durchzuführen, wurde ein System benötigt, dass die Ringerlösung unter dem Mikroskop je nach Bedarf erwärmt. Dafür wurde die sogenannte Durchflusskammer von Frau Angelika Schulz in Laufe ihrer Abschlussarbeit etabliert (siehe Abschnitt 4.6). Die nachfolgenden Experimente wurden in Kooperation mit den bereits namentlich genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe "Molekulare Neurobiologie des Verhaltens" durchgeführt.

Als erstes sollte überprüft werden, ob wir generell Aktivität in Somata messen können. Dazu wurde UAS:GCaMP mit GH146-Gal4 gekreuzt, was zur Expression von GCaMP in olfaktorischen Projektionsneurone (OPNs) führt. Hier konnte in den Somata der OPNs eine duftinduzierte Fluoreszenzänderung gemessen werden (Abb. 41A-41C). Das Kontrollexperiment zeigt, dass in-vivo Calcium Imaging prinzipiell in Somata aktiver Neuronen möglich ist (Abb. 41A-41C). Danach wurde überprüft, ob die SIFamidergen Neurone auf eine applizierte Duftgabe mit einer Zunahme in der neuronalen Aktivität antworten. Hierfür wurde die neu generierte Fliegenlinie SIFa-LexA mit der Calcium-Sensor Fliegenlinie LexAOP: GCaMP (Jonas Barth, nicht veröffentlicht) verpaart. In den darauffolgenden Experimenten wurde den Nachkommen der appetitive Duft Ethylacetat präsentiert und zeitgleich in den SIFamidergen Neuronen die neuronale Aktivität aufgezeichnet (Abb. 41D-41F). Den Fliegen wurde Mineralöl angeboten, hier konnte keine Zunahme der Fluoreszenzstärke aufgezeichnet werden (Abb. 41E). Darüber hinaus wurde bei der Präsentation von Ethylacetat als Duft keine verstärkte neuronale Aktivität gemessen (Abb. 41F). Es kann daraus gefolgert werden, dass die SIFamidergen Neurone nicht auf diese appetitive Duftverdünnung reagieren.


Abbildung 41. *In-vivo* Calcium Imaging in olfaktorischen Projektionsneurone und SIFamidergen Neuronen. 41A) Für diese Abbildung wurden die GH146 OPNs mit dem genetisch kodierten Calcium-Sensor UAS:GCaMP visualisiert. 41B) In dieser Abbildung ist die gemessene Intensitätsänderung der Fluoreszenz während der Duftpräsentation von Mineralöl aufgetragen 41C) Es wurde eine Duftverdünnung von Ethylacetat (1:1000) den Fliegen präsentiert und die neuronale Aktivität gemessen, als grau unterlegt: Dauer der Duftgabe. 41D) Für diese Abbildung wurden die SIFamidergen Neurone mit dem genetisch kodierten Calcium-Sensor LexAOp:GCaMP visualisiert. 41E) Es wurde eine Duftverdünnung von Ethylacetat (1:1000) den Fliegen präsentiert und die neuronale Aktivität gemessen, als grau unterlegt: Dauer der Duftgabe. 41F) In dieser Abbildung ist die gemessene Intensitätsänderung der Fluoreszenz während der Duftpräsentation von Mineralöl aufgetragen. Stichprobengröße betrug jeweils n = 5. ROI = Region Of Interest. Die Länge des Skalierungsbalken beträgt 5µm. Diese Experimente wurden in Kooperation von Shubham Dipt durchgeführt.

Im nächsten Experiment wurde der genetisch kodierte Calcium-Sensor GCaMP3.0 (Tian et al., 2009) mittels Or83bGal4 in den olfaktorischen Rezeptor Neuronen exprimiert. Zudem wurde der hitzesensitive Ionenkanal dTrpA1 mittels LexA/LexA Systems in den SIFamidergen Neuronen exprimiert. Dadurch war es möglich, die SIFamidergen Neurone thermogenetisch zu depolarisieren und gleichzeitig eine Änderung in der Calcium Aktivität in einzelnen Glomeruli während einer Duftgabe zu erfassen (Abb. 42).



Abbildung 42. Calcium-Aktivitätsmuster in den Glomeruli während einer Duftgabe und thermogenetisch induzierter Aktivierung der SIFamidergen Neurone.

42A) Vergrößerte Aufnahme eines Antennallobus aus der Linie, bei denen die SIFamidergen Neurone artifiziell mit einem Wärmestimulus depolarisiert und mit Hilfe eines genetisch kodierten Calcium Indikator die neuronale Aktivität während einer Duftgabe gemessen wurde. Das Bild darunter zeigt den gleichen Antennallobus, dargestellt als Falschfarbenbild während der Präsentation einer Ethylacetat-Verdünnung. Zu sehen ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität im DM1 Glomerulus während einer Duftgabe. 42B) Die Abbildung zeigt einen Antennallobus aus einer Kontrollfliege mit hervorgehobenen DM1 Glomerulus. Darunter das dazugehörige Falschfarbenbild. Angezeigt wurde erneut die Änderung der Fluoreszenzintensität während der Duftgabe mit Ethylacetat. 42C) Vergrößerte Aufnahme eines Antennallobus aus der Linie, bei denen die SIFamidergen Neurone artifiziell mit einem Wärmestimulus depolarisiert und mit Hilfe eines genetisch kodierten Calcium Indikator die neuronale Aktivität während einer Duftgabe gemessen wurde. Das Bild darunter zeigt den gleichen Antennallobus, dargestellt als Falschfarbenbild während der Präsentation einer Benzaldehyd-Verdünnung. Zu sehen ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität im DL5 Glomerulus während einer Duftgabe. 42D) Die Abbildung zeigt einen Antennallobus aus einer Kontrollfliege mit hervorgehobenen DL5 Glomerulus. Darunter das dazugehörige Falschfarbenbild. Angezeigt wurde erneut die Änderung der Fluoreszenzintensität während der Duftgabe mit Benzaldehyd. 42E) Die Abbildung zeigt exemplarisch die durchschnittliche gemessene Intensitätsänderung \pm Standardfehler bei der Kreuzungslinie in dem DM1 Glomerulus sowie bei unterschiedlichen Ringertemperaturen. 42F) Diese Abbildung zeigt die durchschnittliche Anderung in der Fluoreszenz ± Standardfehler bei der Kontrollgruppe. Es wurde ebenfalls in dem DM1 Glomerulus während einer Duftpräsentation die neuronale Aktivität aufgezeichnet. 42G) Es ist

erkennbar, dass bei der Duftgabe von Benzaldehyd die Fluoreszenzintensität im DL5 Glomerulus und einer Temperatur von 32°C zunimmt. 42H) Bei der dazugehörigen Kontrolle wurde keine deutliche Zunahme mit Benzaldehyd im DL5 Glomerulus aufgezeichnet. 421) Diese Abbildung zeigt die maximale aufgezeichnete Intensität aufgetragen als Kurvenschar Diagramm während der Duftgabe mit Ethylacetat, bei den beiden Temperaturen der Ringerlösung. Bei der thermogenetisch induzierten Depolarisation der SIFamidergen Neurone liegt die gemessene Intensität höher als bei 18°C, bei der die SIFamidergen Neurone nicht depolarisiert wurden. 42J) Es wird die maximale Intensitätsänderung in dem DM1 Glomerulus während der Duftpräsentation bei 18°C und 32°C warme Ringerlösung bei der Kontrollgruppe angezeigt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ersten Duftgabe bei 18°C und 32°C, jedoch wurde ein signifikanter Unterschied von 32°C und 18°C gefunden. 42K) In dieser Abbildung wird bei der Kreuzung die maximale Änderung in der gemessenen Intensität, erneut als Kurvenschar aufgetragen, während der Duftgabe Benzaldehyd gezeigt. Bei 32°C werden die SIFamidergen Neurone thermogenetisch aktiviert und die gemessene Änderung in der Fluoreszenz liegt höher als bei einer Ringertemperatur von 18°C. 42L) Es wird die maximale Intensitätsänderung in dem DL5 Glomerulus während der Duftpräsentation bei 18°C und 32°C warme Ringerlösung bei der Kontrollgruppe angezeigt. Es ergab sich keine Änderung in der gemessenen Intensität bei den Temperaturen. Statistischer Test: ANOVA mit wiederholten abhängigen Messungen mit dem Tukey-Test als post-hoc Entscheidung. Statistische Signifikanz * = p < 0.05, n.s. = nicht signifikant. Die Stichprobengröße war bei allen Gruppen n = 8. Die Größe des Skalierungsbalken beträgt: 10µm.

Die gefundenen Ergebnisse zeigen, dass bei einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neurone und simultaner Aufzeichnung der neuronalen Aktivität der olfaktorischen Rezeptorneurone die Fluoreszenz signifikant erhöht ist. Das gilt für den appetitiven Duft Ethylacetat und für den aversiven Duft Benzaldehyd (Abb. 42A-42L). Dagegen fällt bei einer Ringertemperatur von 18°C der Calcium-Influx in den DM1- und DL5 Glomerulus niedriger aus, was auf eine geringere neuronale Aktivität während der Duftpräsentation hindeuten könnte (Abb. 42I und 42K). Darüber hinaus muss notiert werden, dass bei dem Duft Ethylacetat ein signifikanter Unterschied zwischen 32°C und der zweiten Messung von 18°C gefunden wurde. Bei der Kontrollgruppe, die nicht den wärmesensitiven Ionenkanal dTrpA1 in den SIFamidergen Neuronen exprimieren, wurden bei den Duft Ethylacetat ein signifikanter Unterschied zwischen 32°C und der zweiten 18°C Messung gefunden. Zwischen der ersten Messung bei 18°C und 32°C wurden keine temperaturabhängigen, signifikanten, Unterschiede in der gemessenen Intensität der Fluoreszenz detektiert. Bei dem Duft Benzaldehyd wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Temperaturen festgestellt (Abb. 42L). In Bezugnahme auf die gefundenen Ergebnisse lässt sich folgern, dass aufgrund einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neurone die neuronale Aktivität in den Antennalloben gesteigert wird.

6. Diskussion

Auf alle Tiere ruht ein enormer selektiver Druck, zu überleben und sich zu reproduzieren (Itskov und Ribeiro, 2013). Für das Überleben des Individuums spielt das konsumatorische Verhalten eine zentrale Rolle, jedoch sind die Mechanismen für die Nahrungsaufnahme bei Drosophila noch nicht vollständig geklärt (Nässel und Winther, 2010). In dieser Studie wurde das Neuropeptid SIFamid (Jannsen et al., 1996) in Hinblick auf die Funktion in Balzverhalten, konsumatorisches Verhalten, olfaktorische Präferenz und auf den physiologischen Effekt auf andere Zellpopulationen untersucht. Des Weiteren wurde eine anatomische Studie über die Verteilung und Vorkommen der Neurone, die das Neuropeptid SIFamid ausschütten, durchgeführt und mit Hilfe der split-GFP Technik mögliche Interaktionspartner untersucht. Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass bei einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neurone die Balzaktivität erhöht ist. Bei einer induzierten Apoptose wurde kein Effekt auf die Balzaktivität festgestellt. In Bezug zur Nahrungsaufnahme wurde gefunden, dass bei einer thermogenetisch induzierten Ausschüttung der SIFamidergen Neurone die Fliegen einen gesteigerten Rüsselreflex auf süße Lösungen aufweisen. Ferner wiesen die Taufliegen in einem T-maze Paradigma eine erhöhte Präferenz zu einem appetitiven Duft auf. Darüber hinaus zeigten die Taufliegen mit einer künstlichen thermogenetischen Aktivierung der SIFamidergen Neurone stärkeres konsumatorisches Verhalten. Anhand der anatomischen Daten wurde nachgewiesen, dass SIFamid im gesamten Gehirn, verstärkt in den Antennalloben und dem Unterschlundganglion vorkommt. Zudem konnten neben den bisher bekannten vier Zellkörpern (Terhzaz et al., 2007) im Pars intercerebralis auch im Thorakal- und im Abdominalganglion SIFamiderge Zellkörper nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Dendriten der SIFamidergen Neurone in die Antennalloben, dem Unterschlundganglion und um den Ösophagus verzweigen. Mit Hilfe der split-GFP Technik wurde mögliche Interaktionspartner mit dem SIFamidergen Neuronen nachgewiesen. Unter anderem das kurze Neuropeptid F, Corazonin, TDC und dILP. Darüber hinaus wurde mit der Calcium Imaging Methode nachgewiesen, dass bei einer stärkeren Ausschüttung der SIFamidergen Neurone die neuronale Aktivität in den olfaktorischen Rezeptor Neurone erhöht ist. Durch die gesammelten Daten ergibt sich ein Bild, dass das Neuropeptid SIFamid ein bislang unbekannter Mitspieler im komplexen konsumatorischen Verhalten ist.

6.1 Signalübertragung im Gehirn durch Peptide oder "klassische" Neurotransmitter: Unterschiede und Gemeinsamkeiten

Das Nervensystem enthält eine enorme Anzahl von Signalmolekülen wie Aminosäuren, Neurotransmitter und Neuropeptiden (Swensen und Marder, 2000). Vor allem Neuropeptide und Neurotransmitter haben eine profunde Auswirkung auf das Verhalten der Tiere (Sieburth et al., 2006). Bei der schnellen Signalübertragung von Neurotransmittern spielen die biogenen Amine Dopamin, Serotonin, Acetylcholin, Tyramin und Histamin (Blenau und Bauman, 2001; Blenau, 2005; Roeder, 2005) und Glutamat (Hauser et al., 2006), eine wichtige Rolle (Sieburth et al., 2006). Die Neurotransmitter und die meisten Neuropeptide binden an die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und die Rezeptoren können in vier Klassen eingeteilt werden (Venkatakrishnan et al., 2013). Bei Insekten binden die biogenen Amine häufig an ionotrope Rezeptoren (Nässel, 2009). In Drosophila binden die meisten Neuropeptide, wie auch SIFamid, an die Klasse A G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Hauser et al., 2006). Wie viele Neuropeptide besitzt SIFamid eine α -Amidierung (Sellami et al., 2012). Ein Unterschied besteht zwischen den Neurotransmittern und Neuropeptiden darin, dass es sich bei Neuropeptiden um eine Koevolution zwischen Rezeptor und Ligand handelt (Hauser et al., 2006). Des Weiteren können Neuropeptide und Neurotransmitter in der gleichen Präsynapse kolokalisiert sein und gemeinsam ausgeschüttet werden (Nusbaum et al., 2001). Kolokalisation von Neurotransmittern und Neuropeptiden findet sich nicht nur im zentralen Nervensystem von Säugetieren (Hökfelt, 1991), sondern auch bei Invertebraten (Nässel und Homberg, 2006). In unseren Fall bleibt es im Unklaren, ob der gefundene Phänotyp aufgrund der Ausschüttung von SIFamid oder eines noch nicht identifizierten Neurotransmitters hervorgerufen wird. Zum Beispiel wurde für die sNPF produzierenden Zellen gefunden, dass diese eine Vielzahl an klassischen Neurotransmittern neben sNPF ausschütten (Nässel et al., 2008). Unter anderen wurde Acetylcholin, GABA und Glutamat nachgewiesen, die je nach Neurotransmitter sowohl exzitatorisch oder inhibitorisch wirken können (Nässel et al., 2008). Die Autoren vermuteten, dass das kurze Neuropeptid F in den verschiedenen Gehirnbereichen als Neurohormon, lokaler Neuromodulator oder als Kotransmitter wirken (Nässel et al., 2008). Dennoch, auch wenn ein klassischer Neurotransmitter nachgewiesen wird, so wäre es nicht richtig davon auszugehen, dass Neuropeptide und Neurotransmitter miteinander interagieren (Salio et al., 2006). Schnell wirkende Transmitter, wie Neurotransmitter, und langsam wirkende Transmitter,

üblicherweise Neuropeptide, können an komplett unabhängigen Orten wirken, ohne jemals zu interagieren (Yang et al., 1996). Zur Überprüfung welche klassischen Transmitter möglicherweise in den SIFamidergen Zellen vorkommen, könnte eine doppelimmunhistochemische Färbung durchgeführt werden. Mit einer Immunreaktion gegen bestimmte Transmitter könnte dadurch eine Kolokalisation von Neuropeptid und Neurotransmitter visualisiert werden.

Oft finden sich Hinweise, dass die Ausschüttung von Neuropeptiden und Neurotransmittern ganze Netzwerke modulieren können (Nusbaum et al., 2001). Als Beispiel kann das stomatogastrische Ganglion (STG) bei Dekapoden gelten. Das stomatogastrische Ganglion enthält die Neurone, die für die pylorische und gastrische Rhythmik verantwortlich sind (Swensen und Marder, 2000). Das STG wird durch Neuropeptide (u.a. Proktolin, Crustacean Cardioactive Peptide (CCAP), TMRNFLRFamide (Marder und Bucher, 2007), Choleocystokinin (Turrigiana und Selverston, 1990) und Neurotransmitter wie Dopamin (Harris-Warrick et al., 1998) und Serotonin (Kiehn, 1992) moduliert, die in den spezifischen Neuronen kolokalisiert sind (Blitz et al., 1999; Nusbaum et al., 2001; Marder und Bucher, 2007). Da viele Neurone im STG zusammenlaufen, ist es möglich, dass die unterschiedlichen Substanzen in einer Art "Konzert" miteinander interagieren, um die neuronale Aktivität in diesem Netzwerk zu modulieren (Marder und Bucher, 2007). In der Tat stehen die Neurone im stomatogastrischen Ganglion ständig in Interaktion, um die rhythmische Bewegungen des Oesophagus, Herzbeutels, des Kaumagens und des Pylorus zu generieren sowie zu koordinieren (Nusbaum et al., 2001). Bei der Taufliege finden wir ebenfalls eine dichte räumliche Nachbarschaft zwischen den SIFamidergen Zellen und anderen peptidergen Zellen, die in Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme stehen. Möglicherweise interagieren die Peptidergen Zellen miteinander und bilden dadurch ein Netzwerk, um die Nahrungsaufnahme zu steuern bzw. zu koordinieren. Solche enge, räumliche Nachbarschaften finden wir z.B. um den Ösophagus, im Pars intercerebralis und in den Antennalloben (vgl. Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28 und Abb. 29). Anhand der split-GFP Technik konnten wir mögliche anatomische Konnektivität zwischen den SIFamidergen Zellen und anderen Peptidergen Zellen detektieren. Allerdings gibt das "GRASP-Signal" nur eine räumliche Nähe, nicht aber einen funktionellen Kontakt an. Theoretisch kann es sich lediglich um Zell-Zell-Kontakte handeln, ohne eine funktionelle Verbindung.

Natürlich können manche Neuropeptide einzeln und lokal wirken, aber es gibt auch Neuropeptide die im gesamten Gehirn vorkommen, d.h. global wirken (Nässel, 2009). Das kurze Neuropeptid F kann als Beispiel für ein Lokal wirkendes Neuropeptid gelten (Nässel, 2008). Im Gegensatz dazu wird SIFamid von vier Interneuronen im *Pars intercerebralis* gebildet und scheinbar global im Gehirn ausgeschüttet. Die SIFamidergen Interneurone innervieren varikös viele Neuropile im Gehirn (Abb. 24). Zudem wird SIFamid amidiert (Sellami et al., 2012), um einen Abbau von Peptidasen zu verzögern (Isaac et al., 2000). Darüber hinaus konnte mit Hilfe des dendritischen Markers ein möglicher funktioneller Eingang für die SIFamidergen Neurone um den Ösophagus, den Antennalloben und im Unterschlundganglion visualisiert werden. Damit zeigen die SIFamidergen Neurone, dass es aus verschiedenen Bereichen Input erhält (Abb. 25).

6.2 Aktivierung von Neuronen und Inaktivierung von Neuronen: methodische Zugänge

In dieser Studie wurden zahlreiche Techniken angewandt, um die neuronale Aktivität zu manipulieren. Besonders häufig wurde mit der dTrpA1 Technik gearbeitet, um die SIFamidergen Neurone gezielt zu depolarisieren. Der Vorteil besteht darin, dass die Neurone nicht depolarisiert, sollte die spezifische Temperatur nicht erreicht werden. Daraus folgt, dass die Tiere im Verhalten als wildtypisch angesehen werden können (Pulver et al., 2009). Um sicherzustellen, dass der dTrpA1 Kationenkanal öffnet, wurden die Fliegen für 30min auf 29°C gehalten. In der von Frau Mirjam Vanessa Sommer durchgeführten Bachelorarbeit konnte gezeigt werden, dass Fliegen, bei denen die SIFamidergen Neurone mit einem Temperaturstimulus aktiviert werden, signifikant häufiger mit dem Ausstrecken des Rüssels auf einen Saccharose Stimulus reagieren. Eine ähnliche Situation finden wir in den Experimenten zu der Nahrungsaufnahme und bei der quantitativen Erfassung der olfaktorischen Präferenz. Das lässt vermuten, dass die Aktivierung der SIFamidergen Neurone hinreichend für das Auslösen des gefundenen Phänotyps ist. Dennoch, das UAS/Gal4-System hat Limitationen, denn z.B. die Expression des Transkriptionsfaktors Gal4 in "Gal4 Enhancer Trap" Linien oder "Gal4 Promotor" Linien können auch Zellen beinhalten, die nicht von Interesse sind (Potter et al., 2010). Aufgrund dessen werden Aussagen über die Funktion von Neuronen erschwert (Potter et al., 2010). In unserem Fall allerdings konnten wir zeigen, dass SIFa2-Gal4 Linie und die SIFa-LexA Linie spezifisch ist (Abb. 24 und Abb. 39). Umgekehrt hatte die Inhibierung

der synaptischen Ausschüttung (Kitamoto, 2001) oder die elektrische Stilllegung der SIFamidergen Neuronen (Nitabach et al., 2002) keine Verhaltensänderung hervorgerufen (Abb. 35). Daraus kann geschlossen werden, dass die SIFamidergen Neurone zwar hinreichend für den gefundenen Phänotyp sind, jedoch nicht notwendig. Vor allem bei der Ablation der SIFamidergen Neurone könnte die Funktion von anderen Teilen des peptidergen Systems kompensiert werden.

Darüber hinaus ist es nicht geklärt, ob die Menge von SIFamid mit dem Hungerzustand korreliert. Diese Frage ist schwierig zu beantworten, da zum einen die Menge an Peptiden nicht notwendigerweise mit dem Hungerzustand des Tieres korreliert und zum anderen ist es für SIFamid nicht geklärt, ob eine Änderung im Peptid Level mit einer quantitativen PCR bestimmt werden kann. In einer von Root et al. (2011) durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass die Fliegen im "gehungerten" Zustand zwar nicht mehr sNPF ausschütten, dafür aber die Expression des sNPF Rezeptors erhöht ist. Hier also korreliert der Hungerzustand direkt mit der Expression des sNPF Rezeptors (Root et al., 2011). Solche Korrelationsmessungen zwischen Peptid Level und Hungerzustand könnten auch hier zum Einsatz kommen, aber bisherige Daten lassen darauf schließen, dass es durch die RNA Interferenz Methode nur zu einer leichten Reduktion des Neuropeptides gekommen ist (Abb. 35). Deswegen sollte für zukünftige Versuche die körpereigene virale Abwehr (Kemp et al., 2013) verstärkt werden, indem die SIFamidergen Neurone vermehrt das Enzym DICER exprimieren. Nach der Unterstützung mit DICER sollte erneut eine quantitative PCR durchgeführt werden, um eine mögliche signifikante Reduktion des Neuropeptides zu erreichen. Daraufhin könnten weitere konsumatorische Experimente durchgeführt werden, um die Frage zu klären, ob eine Reduktion des Neuropeptides SIFamid direkt mit der Nahrungsaufnahme korreliert.

6.3 Simultanes Messen und Aktivieren von Neuronen: eine neuartige Herangehensweise

In dieser Studie wurde zum ersten Mal mit einem Temperaturstimulus peptiderge Neurone künstlich aktiviert und simultan mit einem genetisch kodierten Calcium Indikator, GCaMP3.0 (Tian et al., 2009) die duftinduzierte neuronale Antwort in den Glomeruli der Antennalloben aufgezeichnet. Es wurde eine Kombination von zwei binären Expressionssystemen (Brand und Perrimon, 1993; Lai und Lee, 2004) genutzt. Dadurch war es möglich, die SIFamidergen Neurone artifiziell zu aktivieren und duftinduzierte

Diskussion

Änderungen in der Calcium Konzentration in Axonen zu messen, die abgrenzbare Glomeruli in den Antennalloben formen. Duftevozierte Änderungen in der Calcium Konzentration wurde bereits hinreichend im olfaktorischen System bei Invertebraten und bei Vertebraten durchgeführt (Wang et al., 2003; Fletcher et al., 2009; Wachowiak et al., 2013), aber bisherige Experimente haben keine Kombination aus einer Aktivierung von peptidergen Zellen und duftinduzierte in-vivo Calcium Imaging Experimente genutzt. In dieser Studie wurde GCaMP3 (Tian et al., 2009) verwendet. Mit diesem neuen Calcium-Sensor kann die Calcium-Aktivität genauer beschrieben werden, da die Affinität des Calcium (Ohkura et al., 2012) verbessert wurde und die Expression des Sensors keine nachteiligen phänotypischen Auswirkungen auf das Tier hat (Tian et al., 2009). GCaMP3 ist eine verbesserte Variante von GCaMP2 (Okhura et al., 2012). Für GCaMP2 wurde gezeigt, dass es bei einer Temperatur zwischen 34,5°C-35,5°C nur eine Detektionsrate von 80% aufweist (Mao et al., 2008). In unserem in-vivo Calcium Imaging Experimenten finden wir auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität. Dieser Effekt kann damit begründet werden, dass es durch wiederholtes Messen zu dem Effekt, genannt "Photobleaching", (Mao et al., 2008) kommt. Ebenso verursacht möglicherweise die höhere Temperatur eine Konformationsänderung des Sensors sowie aufgrund der höheren Temperatur eine stärkere Molekülbewegung von Calcium Ionen, die die Messung beeinflussen. Diese Effekte resultieren eventuell in einer Reduzierung der gemessenen Fluoreszenz.

In einer von Root und Kollegen 2011 durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass der DM1 Glomerulus und der DM4 Glomerulus mit einer erhöhten neuronalen Aktivität auf den Duft Ethylacetat antworten, sobald die Taufliegen gehungert sind. Auch unsere Ergebnisse legen nahe, dass durch eine artifiziell induzierte Aktivierung der SIFamidergen Neuronen die neuronale Antwort auf verschiedene Düfte erhöht ist. Möglicherweise exprimieren die unterschiedliche Glomeruli Rezeptoren für SIFamid und eine Bindung des Neuropeptides könnte die Glomeruli für Düfte sensitiver machen (Abb. 42). Es zeichnet sich ein Bild ab, dass die thermogenetische Aktivierung der SIFamidergen Neurone auf einer physiologischer Ebene den hungrigen Zustand der Fliege signalisiert.

Neben Neuropeptiden können auch klassische Neurotransmitter modulierend auf sensorische Prozesse einwirken (Wang, 2011) und Neuromodulationen können profunde Auswirkungen sowohl in der Reizwahrnehmung als auch im Verhalten haben (Wang, 2011). Die thermogenetische Aktivierung der SIFamidergen Neurone wirkt modulierend auf die synaptische Aktivität auf dem Level der olfaktorischen Rezeptorneurone. Die kommerziellen Düfte Ethylacetat und Benzaldehyd aktivieren die Glomeruli DM1 (Wang, 2011) und DL5 (Knaden et al., 2012). In einer von Dacks et al. (2009) durchgeführten Studie wurde den Taufliegen Serotonin als pharmakologischer Wirkstoff verabreicht. Es wurde gefunden, dass Serotonin die neuronale Antwort in den Projektionsneuronen und in den lokalen Interneuronen verstärkt (Dacks et al., 2009). Bei anderen Insekten, wie dem Tabakschwärmer Manduca sexta wurde gefunden, dass bei einer Verabreichung von Serotonin (10⁻⁴ mol/L⁻¹) die neuronale Calcium Konzentration in den Projektionsneuronen und den lokalen Interneuronen erhöht ist (Kloppenburg und Hildebrandt, 1995). In Caenorhabditis elegans wurde gefunden, dass die Tiere bei Verfügbarkeit einer externer Nahrungsquelle mit einer verstärkten Fluchtreaktion gegenüber abstoßenden Lösungen reagieren, und diese modulierende Wirkung Dopamin erfordert (Ezcurra et al., 2011). Darüber hinaus wurde bei Mäusen gefunden, dass eine erhöhte Ausschüttung von Serotonin den duftevozierten synaptischen Input in den Glomeruli abschwächt (Petzold et al., 2009). Nicht nur klassische Neurotransmitter verändern die präsynaptischen Erregbarkeit, sondern auch das short Neuropeptid F (Root, et al., 2011). In jener Studie wurde gefunden, dass durch einen vierstündigem Nahrungsentzug der Rezeptor für das sNPF verstärkt exprimiert wird und die synaptische Erregbarkeit in den olfaktorischen Rezeptor Neuronen zunimmt (Root et al., 2011). Für das Neuropeptid Y wurde gefunden, dass es durch Wirkung an den Y2 Rezeptor, die auf den Gonotropin-Releasing Hormone-1 Neurone exprimiert werden, die neuronale Aktivität inhibiert (Klenke et al., 2010).

Durch immunhistochemische Färbungen des Fliegengehirns zeigte sich, dass SIFamid verstärkt in den Antennalloben vorzufinden ist. Daraufhin wurde mit der Calcium Imaging Methode, bei thermogenetisch induzierter Aktivierung der SIFamidergen Neurone, eine erhöhte Calcium Aktivität in den olfaktorischen Rezeptor Neuronen gemessen. Es zeigte sich aber auch, dass SIFamid im suboesophagialen Ganglion vermehrt auftritt. In der von Frau Mirjam Vanessa Sommer durchgeführten Bachelorarbeit konnte gezeigt werden, dass Fliegen, bei denen die SIFamidergen Neurone mit einem Temperaturstimulus aktiviert werden, signifikant häufiger mit dem Ausstrecken des Rüssels auf einen Saccharose Stimulus reagieren. Mit der Kombination von den zwei binären Expressionssyteme könnten die SIFamidergen Neurone mit einem neuronale Aktivität in den gustatorischen Rezeptor Neuronen gemessen werden. Zum Beispiel könnte während der Stimulation des Labellum mit flüssiger Saccharose in den gustatorischen Rezeptor Neuron (Gr5a), welcher auf Saccharose Stimuli reagiert (Chyb et al., 2003) *in-vivo* Calcium Imaging durchgeführt werden. Ebenso könnten die neu entwickelten GCaMP6 und GCaMP8 auf Calmodulin basierende Sensoren angewendet werden, die eine noch feinere Aufnahme der neuronalen Aktivität möglich machen (Ohkura et al., 2012). Damit wären wir in der Lage, Unterschiede in der neuronalen Aktivität genauer zu untersuchen.

6.4 Eine mögliche orexigene Rolle von SIFamid

Die Tatsache, dass das Neuropeptid ein hoch konserviertes Neuropeptid ist, deutet auf eine wichtige Funktion des Peptides hin (Verleyen et al., 2009). In der Taufliege Drosophila melanogaster wurde der Einfluss des Neuropeptides SIFamid in Hinblick auf das Balzverhalten untersucht (Terhzaz et al., 2007). In dieser Studie wurde mit Hilfe der induzierten Apoptose (White et al., 1994) und der RNA Interferenz (Fire et al., 1998) die SIFamidergen Neurone während der Entwicklung abgetötet bzw. die Translation des Neuropeptides reduziert. Daraufhin wurde gefunden, dass die Männchen eine wahllose Balzaktivität zeigten und Weibchen rezeptiver für die Balz der Männchen waren (Terhzaz et al., 2007). Die Autoren folgerten daraus, dass SIFamid das Balzverhalten inhibiert (Terhzaz et al., 2007). In dieser Arbeit konnte dieses Verhalten nicht reproduziert werden. Männliche Taufliegen mit ablatierten SIFamidergen Neurone zeigten kein stärkeres Balzverhalten zu anderen Männchen desselben genetischen Hintergrunds. Ferner konnte nicht gezeigt werden, dass Weibchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen rezeptiver für die Balz waren. In dieser Arbeit wurde weiterhin mit dem hitzesensitiven Ionenkanal dTrpA1 gearbeitet, um die SIFamiderge Neurone zu depolarisieren. Männliche Taufliegen mit thermogenetisch induzierter Aktivierung der SIFamidergen Neurone zeigten eine signifikant erhöhte Balzaktivität gegenüber Weibchen. Im Gegensatz dazu wurde bei der Garnele Macrobrachium rosenbergii gefunden, dass SIFamid die Aggression steigert (Vázques-Acevedo et al., 2009). Die Autoren injizierten SIFamid (1×10^{-3} mol/ l^{-1}) direkt in die Hämolymphe der Krebse. Die Folge war, dass selbst subdominante, nicht territoriale Tiere den Kampf gegen dominante, territoriale Krebse begonnen (Vázques-Acevedo et al., 2009). Die Autoren schlossen daraus, dass die Gabe von SIFamid aggressives Verhalten hervorruft. Die Autoren konnten jedoch nicht klären, ob SIFamid das Paarungsverhalten beeinflusst (Vázques-Acevedo et al., 2009). Es wäre eine Überlegung: subdominante Männchen suchen aufgrund der künstlichen Gabe von SIFamid den Konflikt zu einem dominanten Konterpart, welcher ein Territorium besetzt hält. Sollte das subdominante Männchen erfolgreich sein, so würde es das Gebiet übernehmen, dadurch könnten die Chancen zur erfolgreichen Paarung steigen. Diese Hypothese würde gegen die von Terhzaz et al. (2007) gefundene Beobachtungen sprechen. Dennoch, wenngleich methodische Differenzen in der Durchführung der Versuche zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können, scheint der Einfluss des Neuropeptides SIFamid auf das Sexualverhalten zumindest kein inhibierender zu sein.

Bei einer thermogenetisch induzierten Depolarisation der SIFamidergen Zellen zeigte sich, dass die olfaktorische Präferenz zu einem appetitiven Duft verändert ist. Bei dem Flusskrebs Procambarus clarkii wurde gefunden, dass das Neuropeptide SIFamid in den Projektionsneuronen des olfaktorischen System vorkommt (Yasuda et al., 2004; Yasuda-Kamatani und Yasuda, 2006). Die Autoren gehen davon aus, dass SIFamid demnach für das olfaktorische System eine wichtige Rolle übernimmt und als Neuromodulator wirkt. Dennoch wurden bisher keine Verhaltensexperimente unternommen, die die Funktion des Neuropeptides bei Procambarus clarkii klären könnten (Yasuda et al., 2004; Yasuda-Kamatani und Yasuda, 2006). Auch in Insecta wie in der Amerikanischen Großschabe Periplaneta americana konnte SIFamid in den Antennalloben nachgewiesen werden, aber auch hier fehlt jedes Indiz einer möglichen Funktion (Neupert et al., 2011). Dahingegen konnten wir in Drosophila nachweisen, dass SIFamid u.a. in den Antennalloben vorhanden und eine thermogenetisch induzierte Depolarisation der SIFamidergen Neurone eine stärkere Hinwendung zu einem appetitiven Duft bewirkt. Zudem zeigt sich, dass bei einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neuronen die neuronale Aktivität während einer Duftgabe in den Glomeruli erhöht ist.

SIFamiderge Zellen wurden auch in Mittel- und Enddarm bei verschiedenen Spezies der Crustacea gefunden (Christie et al., 2007) und es gilt als allgemein akzeptiert, dass Hormone des Darmtraktes die Nahrungsaufnahme regulierend beeinflussen können (Williams et al., 2001). Eine mögliche Funktion von SIFamid als Neuropeptid aus dem Mitteldarm wurde in den Hummer *Homarus americanus* gefunden (Christie et al., 2006). Hier zeigt sich nach einer Injektion von 10⁻⁶M SIFamid die Aktivität der pylorischen Klappe gesteigert wird. Die pylorische Klappe ist notwendig, um Nahrungspartikel vom Vorderdarm in den Mitteldarm zu befördern (Christie et al., 2006). Danach wäre eine erhöhte Kontraktion der pylorischen Klappe notwendig, sobald das Tier Nahrung aufnimmt. In dieser Studie wurden auch SIFamiderge Neurone in den Thorakal- und Abdominalganglion gefunden. Doch wurde Funktion des Neuropeptides im Thorakal- und Abdominalganglion nicht geklärt. Möglich wäre es, dass SIFamid auch im Darm eine Muskel-aktivierende Funktion besitzt oder sogar als eine Art Sensor fungiert, die der Fliege einen Mangel an Nahrung anzeigen könnte. Das würde bedeuten, dass SIFamiderge Neurone in den Thorakal- und Abdominalganglion bei Nahrungsmangel zur Ausschüttung des Neuropeptides angeregt würden und dieses Neuropeptid über die Hämolymphe bis zum Pars intercerebralis und die dortigen SIFamidergen Neurone aktiviert. Die Aktivierung der SIFamidergen Neurone im Pars intercerebralis wiederum würden vielleicht weitere orexigene Zellen, wie die sNPF-produzierende Neurone aktivieren, wodurch die Fliege mehr Nahrung konsumiert. Bei der Hirschzecke (Ixodes scapularis) wurde gefunden, dass SIFamid und das Muskel-inhibitorische Peptid (MIP) [Allatostatin B] in den Speicheldrüsen kolokalisiert sind (Šimo et al., 2009). Die Sekretion von Speichel aus den Speicheldrüsen ist bei Zecken während der Nahrungsaufnahme unverzichtbar. Die Autoren vermuten, dass SIFamid und MIP in den Speicheldrüsen eine antagonistische Funktion ausüben. Demnach würde MIP inhibitorisch auf die Speichelsekretion wirken, SIFamid dagegen würde den Speichelfluss begünstigen (Šimo et al., 2009). Der Speichelfluss wird normalerweise durch die Nahrungsaufnahme, bzw. durch Hunger angeregt. Zusammengefasst würde das bedeuteten, dass das Neuropeptid vermutlich eine orexigene Wirkung bzw. modulatorische Rolle in Crustacea und Insecta spielt.

6.5 Orexigene und Anorexigene Neuropeptide bei Vertebraten und Invertebraten

Es gibt sowohl bei Vertebraten (Schwartz, 2000) als auch bei Invertebraten (Nässel und Winther, 2010) orexigen- und anorexigen-wirkende Neuropeptide. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass aufgrund einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neurone die Fliegen stärker auf appetitive Reize reagieren. Ebenso deuten die vorliegenden Daten daraufhin, dass eine artifiziell hervorgerufene Depolarisation der SIFamidergen Neurone einen Effekt auf die Tiere verursachen, gleichsam, wie es

orexigen-wirkende Neuropeptide verursachen würden. Bei Verhaltens- und Imaging Studien bei Vertebraten wurde gezeigt, dass der Seh- und der Geschmackssinn (Farhadian et al., 2012; Uher et al., 2006) in "ungesättigten" Zustand sensitiver ist. Zum Beispiel empfinden menschliche Probanden im "gehungerten" Zustand die visuelle Darbietung von Nahrung stärker attraktiver, als im "gesättigten" Zustand (Uher et al., 2006). Ähnlich wie Säugetiere regulieren die Taufliegen ihre Nahrungsaufnahme in Abhängigkeit von ihrem internen Zustand (Carvalho et al., 2005). Wie bereits in der Einleitung beschrieben werden Informationen über den internen Zustand in Säugetieren und Drosophila durch konservierte Neuropeptiden (vgl. 2.3) übernommen (Farhadian et al., 2012). Prominentes Beispiel und Schlüsselkomponente in der physiologischen Antwort auf einen "gesättigten" oder "ungesättigten" Zustand bei Säugetieren und Fliegen ist das Insulin (Teleman, 2009). Neuropeptide, die für die Regulation der Nahrungsaufnahme bei Säugetieren verantwortlich sind, gelten im Tierreich als konserviert (Farhadian et al., 2012). In der Tat, das menschliche Neuropeptid Neuromedin U gilt als homolog zu dem Neuropeptid Hugin (Melcher et al., 2006; Melcher und Pankratz, 2005), das Neuropeptid Y wiederum als homolog zum short Neuropeptid F (Lee et al., 2004). Leucokinin ist das homolog zu Tachykinin (Terhzaz et al., 1999), und dessen Signale bewirken bei einem gefüllten Vorderdarm eine Beendigung der Nahrungsaufnahme (Al-Anzi et al., 2010). Bei einem Vergleich der Nahrungsaufnahme zwischen Säugetieren und Drosophila fällt auf, dass die Nahrungsaufnahme von verschiedenen Neuronen beeinflusst wird (Schwartz, 2000; Morton et al., 2006; Nässel und Winther, 2010). Sogenannte "Hungersignale" und "Sattheitssignale" werden bei Säugetieren im Hypothalamus verarbeitet (Schwartz, 2000). Eine Überlegung wäre es, dass der Pars intercerebralis und/oder die Region um den Ösophagus funktionell der des Hypothalamus gleicht. Die Region um den Ösophagus könnte als eine Art Hunger- bzw. Sattheitszentrum gelten. Der Pars intercerebralis wäre prominent, weil in dieser Hirnregion viele peptiderge Neurone in enger räumlicher Nähe zu finden sind. Bei einem hypothetischen Vergleich zwischen Menschen und Drosophila könnte angenommen werden, dass das Neuropeptid SIFamid eine ähnliche Funktion wie das Agouti-ähnliche Peptid innehat. Denn aufgrund einer thermogenetisch induzierten Aktivierung der SIFamidergen Neuronen finden wir, dass die Fliegen dadurch vermehrt Nahrung konsumieren und appetitive Düfte attraktiver wahrnehmen. Das Agouti-ähnliche Peptid der Vertebraten reguliert ebenso die Nahrungsaufnahme positiv (Sam et al., 2012; Aponte et al., 2010; Hahn et al., 1999; Broberger et al., 1999). Für AgRP wird angenommen, dass es als Neuromodulator agiert und die POMC Neurone negativ reguliert

(Cowley et al., 2001). In einer von Aponte et al. (2010) durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass durch eine Stimulation der AgRP Neurone mit der Channelrhodopsin2 Technik die Mäuse vermehrt Nahrung aufnehmen, obwohl die Tiere "gesättigt" waren. Ähnliches können wir in unseren Experimenten beobachten. Auch hier waren die Fliegen "gesättigt", verhielten sich aber in einer Art, als wären sie "ungesättigt". Zudem wurde gefunden, dass die Ablation der AgRP exprimierende Neurone in adulten Mäusen zu Untergewicht führte (Luquet et al., 2005). Für die Ablation wurde der menschliche Diphterie Toxin Rezeptor auf den Agouti-ähnliche Peptid produzierende Neurone exprimiert und durch die Gabe von Diphterie-Toxin konnten die Neurone ablatiert werden (Luquet et al., 2005). Dennoch können die Ergebnisse aufgrund von "loss-of-function" Experimenten nicht zeigen, dass das Agouti-ähnliche Peptid die Melanokortin Signale inhibiert (Wu et al., 2008). Experimente bei denen mit der Stilllegung der SIFamidergen Neuronen gearbeitet wurde, deuten darauf hin, dass es keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat. Möglicherweise greift SIFamid, ähnlich wie das Agouti-ähnliche Peptid, in den neuronalen Schaltkreis zur Nahrungsaufnahme positiv ein. In Abbildung 43 wird versucht einen Vergleich zwischen Mensch und Drosophila aufzutragen. Das Neuropeptid SIFamid erhält in diesem spekulativen Szenario die Rolle eines orexigenwirkendes, modulatorisches Neuropeptids.



Abbildung 43. Hypothetischer Vergleich zwischen Menschen und Drosophila melanogaster in Bezug der Nahrungsaufnahme.

Die Aktivierung der NPY/AgRP Neurone führt beim Menschen zur Nahrungsaufnahme. Eine erhöhte Nahrungsaufnahme führt zu einem erhöhten Insulin und Leptin Level. Eine Zunahme des Leptin und Insulin Konzentration wiederum inhibiert die Aktivität der NPY/AgRP exprimierende Neurone im Hypothalamus. Im Gegensatz dazu führt die Ausschüttung des α-Melanozyten stimulierendes Hormon zum Sättigungsgefühl, dadurch wird keine Nahrung aufgenommen. Keine Nahrungsaufnahme führt unweigerlich zu einem hohen Glukagon-Spiegel. Die Ausschüttung von Insulin ist herabgesetzt. Das hat die Auswirkung, dass die Ausschüttung des a-Melanozyten stimulierendes Hormon inhibiert wird und die Exprimierung von NPY/AgRP gefördert wird. Folgendes Szenario wäre bei der Fruchtfliege denkbar. Die Ausschüttung von sNPF und SIFamid führt bei der Taufliege zu einem Hungerzustand, aufgrund dessen konsumiert die Fliege Nahrung. Auch hier bewirkt keine Nahrungsaufnahme die Ausschüttung von AKH. Durch die erhöhte Ausschüttung von AKH, könnte DSK und dILP negativ beeinflusst werden und möglicherweise auch Huginproduzierende Zellen. Das wiederum könnten die sNPF und SIFamidergen Neurone aktivieren. Auf der anderen Seite führt erhöhte Nahrungsaufnahme zu einer Expression von dILP, Hugin und DSK. Die Sättigungssignale führen zu einer erhöhten Inhibierung der sNPF Neurone und möglicherweise der SIFamidergen Neuronen. Ein + deutet auf eine Zunahme der Nahrungsaufnahme an, - bedeutet keine bzw. geringere Nahrungsaufnahme. Ein grüner Pfeil hinter den Neuropeptiden bedeutet ein erhöhter Neuropeptid Spiegel. Ein roter Pfeil bedeutet einen niedrigen Neuropeptid Gehalt. Grüne gestrichelte Pfeile deuten eine Aktivierung an, wohingegen rote gestrichelte Pfeile auf eine Inhibierung hindeuten (Le Sauter et al., 1991, Schwartz, 2000; Rulifson et al., 2002; Sahu, 2003; Lee et al., 2004; Isabel et al., 2005; Melcher und Pankratz, 2005; Schwartz und Porte, 2005; Nässel, 2010; Zhao et al., 2010; Söderberg et al., 2012).

Bei dem spekulativen Vergleich zwischen Menschen und *Drosophila* gilt bei dem Menschen, dass Leptin proportional zu der Menge der Fettzellen gebildet wird (Considine

et al., 1996). Ebenso wird auch Insulin in Abhängigkeit der Menge der Fettzellen gebildet (Bagdade et al., 1967). NPY/AgRP und POMC Neurone im Hypothalamus exprimieren Rezeptoren für beide Neurohormone (Baskin et al., 1988; Baskin et al., 1999; Cheung et al., 1997; Schwartz, 2000). Ein erhöhter Insulin- und Leptin-Level inhibiert die Aktivität der AgRP/NPY exprimierende Neurone. Ein niedriger Level an Insulin und Leptin wiederum fördert die Nahrungsaufnahme, bzw. bewirkt die Inhibierung der POMC Zellen (reviewed von Schwartz, 2000; siehe Abbildung 43).

Für *Drosophila melanogaster* wären ähnliche Szenarien denkbar. Zum einem könnte Hugin (Melcher und Pankratz, 2005), als Sättigungssignal, die SIFamid Ausschüttung bzw. die Aktivität der SIFamidergen Neuronen hemmen. Daraufhin wäre es möglich, dass die Fliege die Nahrungssuche und die Nahrungsaufnahme einstellt. Auch wäre es denkbar, dass Drosulfakinin (DSK) und dILP hemmend auf die SIFamidergen Neurone wirken und somit ebenso die Nahrungsaufnahme gestoppt würde. Möglicherweise beeinflussen die SIFamidergen Neurone die sNPF-produzierende Neurone. Anders ausgedrückt, die Aktivierung der SIFamidergen Neurone könnte dazu führen, dass SIFamid ausgeschüttet wird und die short Neuropeptide F produzierende Neurone aktiviert. Die sNPF Neurone steigern wiederum die Nahrungsaufnahme (siehe Abbildung 43).

Die SIFamidergen Neurone erhalten von anderen peptidergen Neuronen Eingang und geben zu anderen peptidergen Neuronen Output. Besonders die sNPF produzierende Neurone und die Corazoninergen Neurone erhalten vermutlich Input von den SIFamidergen Neuronen. Um das Netzwerk zwischen den peptidergen Zellen genauer zu verstehen, muss herausgefunden werden, welche peptidergen Neurone von SIFamid beeinflusst werden. Die gesammelten Ergebnisse mit der split-GFP Technik deuten darauf hin, dass die SIFamidergen Neurone die sNPF-Neurone beeinflussen. Das würde möglicherweise bedeuten, dass SIFamid ausgeschüttet würde und auf die sNPF Neurone wirkt, die wiederum dadurch aktiviert werden und letztendlich die Nahrungsaufnahme steigern (Lee et al., 2004). Mit der Kombination von zwei unabhängigen Expressionssyteme wäre es auch hier möglich, z.B. die SIFamidergen Neurone, die den wärmesensitiven dTrpA1-Kanal exprimieren, thermogenetisch zu aktivieren. Gleichzeitig könnte mit Hilfe von Calciumsensoren die neuronale Aktivität in den sNPF Neuronen funktionellen Input für sNPF Neurone darstellt. Diese Idee könnte ebenfalls auf andere peptiderge Neurone angewendet werden, zum Beispiel, um den funktionellen Output zu klären. Hierbei würden die Insulin produzierende Zellen, die den dTrpA1 Kationenkanal exprimieren, mit artifiziell mit einem Temperaturstimulus zu depolarisieren, wohingegen mit der *in-vivo* Calcium Imaging Methode und Calcium Sensoren die neuronale Aktivität in den SIFamidergen Neuronen erfasst werden können.

Literatur:

Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J., Ram, S.J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international, Vol. 11, No. 7, 36-42.*

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2001). Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Wiley-Vch, 2. Auflage, Weinheim.

Al-Anzi, B., Armand, E., Nagamei, P., Olszewski, M., Sapin, V., Waters, C., Zinn, K., Wyman, R.J., Benzer, S. (2010). The leucokinin pathway and its neurons regulate mealsize in *Drosophila*. *Current Biology*, *Vol. 20, No. 11, 969-978*.

Altstein, M., Nässel, D.R. (2010). Neuropeptide signaling in insects. Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 692, 155-165.

Antunes-Rodrigues, J., De Castro, M., Elias, L.L., Vanlenca, M.M., McCann, S.M. (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological Reviews, Vol. 84, No. 1, 169-208.*

Anini, Y., Fu-Cheng. X., Cuber, J.C., Kervran, A., Chariot, J., Roz, C. (1999). Comparison of the postprandial release of peptide YY and proglucagon-derived peptides in the rat. *Pflügers Archiv: European journal of physiology, Vol. 438, No. 3, 299-306.*

Aponte, Y., Atasoy, D. Sternson, S.M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience, Vol. 14, No. 3, 351-355.*

Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., Shirakami, G., Usui, T., Shimatsu, A., Doi, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 86, No. 10, 4753-4758.*

Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R.H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Reviews of Molecular Diagnostics*, *Vol. 5, No. 2, 209-219.*

Armstrong, J.D., Kaiser, K., Müller, A., Fischbach, K.F., Merchant, N., Strausfeld, N.J. (1995). Flybrain, an on-line atlas and database of the *Drosophila* nervous system. *Neuron*, *Vol. 15, No. 1, 17-20.*

Bagdade, J.D., Bierman, E.L., Porte, D.Jr. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *The Journal of Clinical Investigations, Vol. 46, No. 10, 1549-1557.*

Bahl, B. (2013). Die Interaktion peptiderger Neurone im *Drosophila* Gehirn: eine neuroanatomische Studie. *Bachelorarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.*

Baines, R.A., Uhler, J.P., Thompson, A., Sweeney, S.T., Bate, M. (2001). Altered electrical properties in *Drosophila* neurons developing without synaptic transmission. *The Journal of Neuroscience, Vol. 21, No. 5, 1523-1531.*

Baker, K.D., Thummel, C.S. (2007). Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, *Vol. 6, No. 4, 257-266*.

Baldo, B.A., Pratt, W.E., Will, M.J., Hanlon, E.C., Bakshi, V.P., Cador, M. (2013). Principles of motivation revealed by diverse functions of neuropharmacological and neuroanatomical substrates underlying feeding behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, article in press, corrected proof.*

Bar, T., Kubista, M., Tichopad, A., (2012). Validation of kinetic similarity in qPCR. *Nucleic Acids Research, Vol. 40, No 4, 1395-1406.*

Barkus, R., Klyachko, O., Horiuchi, D., Dickson, B.J., Saxton, W.M.(2008). Identification of an axonal kinesin-3 motor for fast anterograde vesicle transport that facilitates

retrograde transport of neuropeptides. *Molecular Biology of the Cell, Vol. 19, No. 1, 274-283.*

Baskin, D.G., Breininger, J.F., Schwartz, M.W. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes, Vol.48, No. 4, 828-833.*

Baskin, D.G., Wilcox, B.J., Figlewicz, D.P., Dorsa, D.M. (1988). Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends in Neuroscience*, *Vol. 11*, *No.3*, 107-111.

Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., Cone, R.D., Bloom, S.R. (2002). Gut hormone PYY (3–36) physiologically inhibits food intake. *Nature, Vol. 418, No. 6898, 650-654*.

Baumgardt, M., Miguel-Aliaga, I., Karlsson, D., Ekman, H., Thor, S. (2007). Specification of neuronal identities by feedforward combinatorial coding. *PloS Biology, Vol. 5, No. 2, e37.*

Bean, A.J., Zhang, X., Hökfelt, T. (1994). Peptide secretion: what do we know? *FASEB Journal, Vol. 8, No. 9,630-638.*

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (2009). Neurowissenschaften-Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie. *Springer Spektrum, 3. Auflage, Berlin-Heidelberg.*

Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chrétien, M., Seidah, N.G. (1991). PCI and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proceedings of the National Academy of Science USA, Vol. 88, No. 9, 3564-3568.*

Bernard, C. (1865). Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. Paris.

Bewick, G.A., Kent, A., Campbell, D., Patterson, M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Gardiner, J.V. (2009). Mice with hyperghrelinemia are hyperphagic and glucose intolerant and have reduced leptin sensitivity. *Diabetes, Vol. 58, No. 4, 840-846*.

Berridge, K.C. (2004). Motivation concepts in behavioural neuroscience. *Physiology & Behavior, Vol. 81, 179-209.*

Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signaling. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology, Vol. 1, No.1, 1-21*.

Blenau, W. (2005). Cellular actions of biogenic amines. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, Vol. 59, No. 3, 99-102.

Blenau, W., Bauman, A. (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology, Vol. 48, No. 1, 13-38.*

Bindra, D. (1974). A motivational view of learning, performance, and behavior modification. *Psychological Review, Vol. 81, No. 3, 199-213.*

Bøler, J., Enzmann, F., Folkers, K. (1969). The identity of chemical and hormonal properties of the Thyrotropin releasing hormone and Pyroglutamyl-Histidyl-Proline amide. *Biochemical and Biophysical research communications, Vol. 37, No. 4, 705-710.*

Boulant, J.A., Dean, J.B. (1986). Temperature receptors in the central nervous system. *Annual Review of Physiology, Vol. 48, 639-654.*

Brand A.H., Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes .*Development, Vol. 118, No. 2, 401-415*.

Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., Hökfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Science USA, Vol. 95, No. 25, 15043-15048.*

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology, Vol. 11, No. 4,213-221.*

Broughton, S., Alic, N., Slack, C., Bass, T., Ikeya, T., Vinti, G., Tommasi, A.M., Driege, Y., Hafen, E., Partridge, L. (2008). Reduction of DILP2 in *Drosophila* triages a metabolic phenotype from lifespan revealing redundancy and compensation among DILPs. *PLoS One, Vol. 3, No. 11, e3721, 1-9.*

Bruns, D., Jahn, R. (1995). Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature, Vol. 377, No. 6544, 62-65.*

Burgoyne, R.D. (2007). Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca2+ signaling. *Nature Reviews, Neuroscience, Vol. 8, No. 3, 182-193.*

Campbell, T.N., Choy, F.Y.M. (2005). RNA interference: past, present and future. *Current Issues in Molecular Biology, Vol. 7, No. 1,1-6.*

Cardulla, R.A., Agrarwal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., Wolf, D.E. (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Science USA, Vol. 85, No. 23, 8790-8794.*

Carvalho, G.B., Kapahai, P., Anderson, D.J., Benzer, S. (2006). Allocrine modulation of feeding behavior by the sex peptide of *Drosophila*. *Current Biology, Vol. 16, No. 7, 692-696*.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, *Vol.263*, *No. 5148*, 802-805.

Chaudhri, O.B., Salem, V., Murphy, K.G., Bloom, S.R., (2008). Gastrointestinal satiety signals. *Annual Review of Physiology, Vol. 70, 239-255*.

Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C., Vallee, R.B. (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by *shibire*, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature, Vol. 351, No. 6327, 583-586.*

Cheung, C.C., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology, Vol. 138, No. 10, 4489-4492.*

Choi, Y.J., Lee, G., Hall, J.C., Park, J.H. (2005). Comparative analysis of Corazoninencoding genes (Crz's) in *Drosophila* species and functional insights into Crz-expressing neurons. *The Journal of Comparative Neurology, Vol. 482, No. 4,372-385.*

Christie, A.E., Kutz-Naber, K.K., Stemmler, E.A., Klein, A., Messinger, D.I., Goiney, C.C., Conterato, A.J., Bruns, E.A., Hsu, Y.W., Li, L., Dickinson, P.S. (2007). Midgut epithelial endocrine cells are rich a source of the neuropeptides APSGFGMRamide (*Cancer borealis* Tachykinin-related peptide Ia) and GYRKPPFNGSIFamide (Gly¹-SIFamide) in the crabs *Cancer borealis*, *Cancer magister* and *Cancer productus*. *The Journal of Experimental Biology, Vol. 210, No. 4, 699-714*.

Christie, A.E., Nolan, D.H., Ohno, P., Hartline, N., Lenz, P.H. (2010). Identification of chelicerate neuropeptides using bioinformatics of publicly accessible expressed sequence tags. *General and Comparative Endocrinology, Vol. 170, No. 1, 144-155.*

Christie, A.E., Stemmler, E.A., Peguero, B., Messinger, D.I., Provencher, H.L., Scheerlinck, P., Hsu, Y.W., Guiney, M.E., de la Iglesia, H.O., Dickinson, P.S. (2006). Identification, physiological actions, and distribution of VYRKPPFNGSIFamide (Val1SIFamide) in the stomatogastric nervous system of the American lobster *Homarus americanus*. *The Journal of Comparative Neurology, Vol. 496, No. 3, 406-421*.

Chyb, S., Dahanukar, A., Wickens, A., Carlson, J.R. (2003). *Drosophila* Gr5a encodes a taste receptor tuned to trehalose. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, *Vol. 100, Suppl. 2, 14526-14530*.

Cohen, M.A., Ellis, S.M., Le Roux, C.W., Batterham, R.L., Park, A., Patterson, M., Frost, G.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., (2003). Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces

food intake in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol.* 88, No. 10, 4696-4701.

Cone, R.D., Cowley, M.A., Butler, A.A., Fan, W., Marks, D.L., Low, M.J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders, Suppl., 5, S63-S67.*

Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L. Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., Caro, J.F. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England Journal of Medicine, Vol. 334, No. 5, 292-295.*

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature, Vol. 411, No. 6836, 480-484*.

Dacks, A.M., Green, D.S., Root, C.M., Nighorn, A.J., Wang, J.W. (2009). Serotonin modulates olfactory processing in the antennal lobe of *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics, Vol. 23, No. 4,366-377.*

Degen, L., Drewe, J., Piccoli, F., Gräni, K., Oesch, S., Bunea, R., D'Amato, M., Beglinger, C. (2006). Effect of CCK-1 receptor blockade on ghrelin and PYY secretion in men. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, Vol. 292, No. 4, R1391-R1399.*

Diegelmann, S., Bate, M., Landgraf, M. (2008). Gateway cloning vectors for the LexAbased binary expression system in *Drosophila*. *Fly*, *Vol. 2*, *No. 4*,236-239.

Dudel, J., Menzel, R., Schmidt, R.F. (2001). Neurowissenschaften. Vom Molekül zur Kognition. *Springer-Verlag, 2. Auflage, Berlin-Heidelberg*.

Eberlein, G.A., Eysselein, V.E., Schaeffer, M., Layer, P., Grandt, D., Goebell, H., Niebel, W., Davis, M., Lee, T.D., Shively, J.E., Reeve, J.R.Jr. (1989). A new molecular form of

PYY: structural characterization of human PYY (3-36) and PYY (1-36). *Peptides, Vol. 10, No. 4, 797-803.*

Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron, Vol. 21, No. 6, 1375-1385*.

Ellacott, K.L., Halatchev, I.G., Cone, R.D. (2006). Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. *Endocrinology*, *147*, *No. 7*, *3190-3195*.

Elmquist, J.K., Elias, C.F., Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron, Vol. 22, No. 2, 221-232*.

Ezcurra, M., Tanizawa, Y., Swoboda, P., Schafer, W.R. (2011). Food sensitizes *C. elegans* avoidance behaviour through acute dopamine signaling. *The EMBO Journal, Vol. 30, No. 6, 1110-1122.*

Farhadian, S.F., Suárez-Fariñas, M., Cho, C.E., Pellegrino, M., Vosshall, L.B. (2012).
Post-fasting olfactory, transcriptional, and feeding responses in *Drosophila*. *Physiology & Behavior, Vol. 105, No. 2, 544-53.*

Feinberg, E.H., VanHoven, M.K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R.D., Shen, K., Bargmann, C.I. (2008). GFP Reconstitution across synaptic partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron, Vol. 57, No. 3, 353-363*.

Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J.M., Buchner, E., Galizia, C.G. (2002). Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Current Biology, Vol. 12, No. 21, 1877-1884*.

Fiala, A., Suska, A., Schlüter, O.M. (2010). Optogenetic approaches in neuroscience. *Current Biology, Vol. 20, No. 20, R897-R903.* Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature, Vol. 391, No. 6669, 806-811.*

Fitzsimons, J.T. (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiological reviews, Vol.* 78, *No.3*, 583-686.

Fletcher, M.L., Masurka, A.V., Xing, J., Imanura, F., Xiong, W., Nagayama, S., Mutoh, H., Greer, C.A., Knöpfel, T., Chen, W.R. (2009). Optical imaging of postsynaptic odor representation in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology, Vol. 102, No. 2, 817-30.*

Galizia, C.G., Munch, D., Strauch, M., Nissler, A., Ma, S. (2010). Integrating Heterogeneous Odor response data into a common response model: a DoOR to the complete olfactome. *Chemical Senses, Vol. 35, No. 7, 551-563*.

Garczynski, S.F., Brown, M.R., Shen, P., Murray, T.F., Crim, J.W. (2002). Characterization of a functional neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Peptides, Vol. 23, No. 4, 773-780.*

Gerich, J.E. (2000). Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes, Obesity and Metabolism, Vol. 2, No. 6, 245-350.*

Gerich, J.E. (2010). Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabetic Medicine, Vol. 27, No. 2, 136-142.*

Gloyer, I.S., Wilson, S., Buckingham, R., Arch, J.R., Trayhurn, P., Williams, G. (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes, Vol. 46, No. 3, 335-341*.

Gordon, M.D., Scott, K. (2009). Motor Control in a *Drosophila* Taste Circuit. *Neuron, Vol.* 61, No. 3, 373-384.

Grandt, D., Teyssen, S., Schimiczek, M., Reeve, J.R.Jr3d., Feth, F., Rascher, W., Hirche, H., Singer, M.V., Layer, P., Goebell, H., Ho, F.J., Eysselein, V.E. (1992). *Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 186, No.3, 1299-1306.*

Greenspan, R.J. (2004). Fly pushing- Theory and practice in *Drosophila* genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Auflage, New York.*

Gross, C.G. (1998). Claude Bernard and the Constancy of the internal Environment. *The Neuroscientist, Vol. 4, No. 5, 380-385.*

Gross, C.G. (2009). Three before their time: neuroscientists whose ideas were ignored by their contemporaries. *Experimental Brain Research, Vol. 192, No. 3, 321-334*.

Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience, Vol. 1, No. 4, 271-272.*

Hamada, F.N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S.R., Ghezzi, A., Jegla, T.J., Garrity, P.N. (2007). An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature, Vol. 454, No. 7201, 217-222.*

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature, Vol. 404, No.* 6775, 293-296.

Hanada, R., Teranishi, H., Pearson, J.T., Kurokawa, M., Hosoda, H., Fuskushima, N.,
Fukue, Y., Serino, R., Fujihara, H., Ueta, Y., Ikawa, M., Okabe, M., Murakami, N., Shirai,
M., Yoshimatsu, H., Kangawa, K., Kojima, M. (2004). Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nature Neuroscience, Vol.* 10, No. 10, 1067-1073.

Hannon, G.J. (2002). RNA interference. Nature, Vol. 418, No. 6894, 244-251.

Hauser, F. Cazzamali, G., Williamson, M., Blenau, W., Grimmelikhuijzen, C.J.P. (2006). A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Progress in Neurobiology*, *Vol.* 80, *No.* 1, 1-19.

Hartley, J.L., Temple, G.F. Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site specific recombination. *Genome Research, Vol. 10, No. 11, 1788-1795.*

Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Häberlein, C., Stocker, R.F. (1999). Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: Toxin expression studies in chemosensory neurons. *The Journal of Neuroscience, Vol. 19, No. 15, 6599-6609.*

Henley, J.R., Cao, H., McNiven, M.A. (2009). Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. *FASEB Journal*, Vol. 13, Suppl. 2, S243-S247.

Hergarden, A.C., Tayler, T.D., Anderson, D.J. (2012). Allatostatin-A neurons inhibit feeding behavior in adult *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 109, No. 10, 3967-3972.

Heuer, C.M., Binzer, M., Schachtner, J. (2012). SIFamide in the brain of the sphinx moth, *Manduca sexta. Acta Biologica Hungarica, Vol. 63, Suppl. 2, 48-57.*

Hill, J.W., Elias, C.F., Fukuda, M., Williams, K.W., Berglund, E.D., Holland, W.L., Cho, Y-R., Chuang, J-C., Xu, Y., Choi, M., Lauzon, D., Lee, C.E., Coppari, R., Richardson, J.A., Zigman, J.M., Chua, S., Scherer, P.E., Lowell, B.B., Brüning, J.C., Elmquist, J.K. (2010). Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metabolism, Vol. 11, No. 4, 286-97.*

Hires, A.S., Tian, L., Looger, L.L. (2008). Reporting neural activity with genetically encoded calcium indicators. *Brain Cell Biology, Vol. 36, No. 1-4, 69-86*.

Hodge, J.J.L. (2009). Ion channels to inactivate neurons in Drosophila. Frontiers in Molecular Neuroscience, Vol. 2, No. 13, 1-10.

Hoffman, B.B., Lefkowitz, R.J. (1982). Adrenergic receptors in the heart. *Annual Review* of Physiology, Vol. 44, 475-84.

Hökfelt, T. (1991). Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron, Vol. 7, No. 6,* 867-879.

Hökfelt, T., Broberger, C., Xu, Z.Q., Sergeyer, V., Ubink, R., Diez, M. (2000). Neuropeptides-an overview. *Neuropharmacology, Vol. 39, No. 8, 1337-1356*.

Ida, T., Takahashi, T., Tominaga, H., Sato, T., Sana, H., Kume, K., Ozki, M., Hiraguchi, H., Shitani, H., Terajima, S., Nakamura, Y., Mori, K., Yoshida, M., Kato, J., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., Kojima, M. (2012). Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from *Drosophila* and their putative role in appetite regulation as ligands for G protein-coupled receptors. *Frontiers in Endocrinology, Vol. 3, No. 177, 1-8.*

Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of Insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth Regulation in *Drosophila*. *Current Biology*, *Vol. 12, No. 15, 1293-1300*.

Isaac, R.E., Siviter, R.J., Stancombe, P., Coates, D., Shirras, A.D. (2000). Conserved roles for peptidases in the processing of invertebrate neuropeptides. *Biochemical Society Transactions, Vol. 28, No. 4, 460-64*.

Itskov, P.M., Ribeiro, C. (2013). The dilemmas of the gourmet fly: the molecular and neuronal mechanisms of feeding and nutrient decision making in *Drosophila*. *Frontiers in Neuroscience*, *Vol.* 7, *No.* 12, 1-13.

Janssen, I., Schoofs, L., Spittaels, K., Neven, H., Vanden Broeck, J., Devreese, B., van Beeumen, J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., de Loof, A. (1996). Isolation of NEB-LFamide, a novel myotopic neuropeptide from the grey fleshfly. *Molecular and Cellular Endocrinology, Vol. 117, No. 2,157-165.*

Jéquier, E., Tappy, L. (1989). Regulation of body weight in humans. *Physiological Reviews*, Vol. 79, No. 2, 451-480.

Johard, H.A., Enell, L.E., Gustafsson, E., Trifilieff, P., Veenstra, J.A., Nässel, D.R. (2008). Intrinsic neurons of *Drosophila* mushroom bodies express short neuropeptide F: relations to extrinsic neurons expressing different neurotransmitters. *The Journal of Comparative Neurology, Vol. 597, No. 4, 1479-96.*

Johnson, A.K. (2007). The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. *Medicine and Science in Sports and Exercise, Vol. 39, No. 6, 1388-1400.*

Jørgensen, L.M., Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Grimmelikhuijzen, C.J.P. (2006). Molecular identification of the first SIFamide receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 340, No. 2, 696-701.*

Jones, B.J., Tan, T., Bloom, S.R. (2012). Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology, Vol. 153, No. 3, 1049-1054*.

Kaiyala, K.J., Woods, S.C., Schwartz, M.W. (1995). New model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *The American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 62, Suppl. 5,1123S-1134S.*

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (1995). Neurowissenschaften. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin-Heidelberg.

Kasuya, J., Ishimoto, H., Kitamoto, T., (2009). Neuronal mechanisms of learning and memory revealed by spatial and temporal suppression of neurotransmission using *shibire^{ts1}*, a temperature-sensitive dynamin mutant gene in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Molecular Neuroscience, Vol. 2, No. 11, 1-6.*

Kemp, C., Mueller, S., Goto, A., Barbier, V., Paro, S., Bonnay, F., Dostert, C., Troxler, L., Hetru, C., Meignin, C., Pfeffer, S., Hoffman, J.A., Imler, J-L. (2013). Broad RNA

interference-mediated antiviral immunity and virus specific inducible responses in *Drosophila*. *The Journal of Immunology, Vol. 190, No. 2, 650-659*.

Kerr, J.N., Denk, W. (2008). Imaging *in vivo*: watching the brain in action. *Nature Reviews. Neuroscience, Vol. 9, No. 3, 195-205.*

Khurana, S., Siddiqi, O. (2013). Olfactory responses of *Drosophila* larvae. *Chemical* Senses, Vol. 38, No. 4, 315-323.

King, M.S. (2007). Anatomy of the Rostral Nucleus of the Solitary Tract. In: Bradley RM, editor. The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 2, Frontiers in Neuroscience, Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2541/.

Kitamoto, T. (2001). Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature sensitive *shibire* allele in defined neurons. *The Journal of Neurobiology, Vol.47, No. 2, 81-92.*

Kitamoto, T. (2002). Targeted expression of temperature-sensitive dynamin to study neural mechanisms of complex behavior in *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics, Vol. 16, No. 4,* 205-228.

Kleine, B., Rossmanith, W. (2010). Hormone und Hormonsystem. Lehrbuch der Endokrinologie. Springer Verlag, 2. Auflage, Berlin-Heidelberg.

Klenke, U., Constantin, S., Wray, S. (2010). Neuropeptide Y directly inhibits neuronal activity in a subpopulation of Gonadotropin-releasing hormone 1 neurons via Y1 receptors. *Endocrinology, Vol. 151, No. 6, 2736-2746.*

Kloppenburg, P., Hildebrand, J.G. (1995). Neuromodulation by 5-Hydroxytryptamine in the antennal lobe of the shinx moth *Manduca sexta*. *The Journal of Experimental Biology, Vol. 198, No. 3, 603-611*.

Knaden, M., Strutz, A., Ahsan, J., Sachse, S., Hansson, B.S. (2012). Spatial representation of odorant valence in an insect brain. *Cell Reports, Vol. 1, No. 4, 392-399.*

Koldenkova, V.P., Nagai, T. (2013). Genetically encoded Ca²⁺ indicators: Properties and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1833, No. 7, 1787-1797.*

Konturek, S.J., Konturek, J.W., Pawlik, T., Brzozowki, T. (2004). Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *Journal of Physiology and Pharmacology, Vol. 55, No. 1,* 137-154.

Kosaka, T., Ikeda, K. (1983). Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology, Vol. 14, No. 3, 207-225.*

Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., Hastrup, S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature, Vol. 393, No.* 6680, 72-76.

Lai, S-L., Lee, T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, *Vol. 9*, *No. 5*, 703-709.

Laissue, P.P., Reiter, C., Hiesinger, P.R., Halter, S., Fischbach, K.F., Stocker, R.F. (1999). Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology, Vol. 405, No. 4, 543-552.*

Landau, B.R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schumann, W.C., Ekberg, K., Kalhan, S.C. (1996). Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *The Journal of Clinical Investigation, Vol. 98, No. 2, 378-385.*

Lattao, R., Bonaccorsi, S., Guan, X., Wasserman, S.A., Gatti, M. (2011). Tubby-tagged balancer for the *Drosophila* X and second chromosomes. *Fly, Vol. 5, No.4, 369-370*.

Lee, K.S., You, K.H., Choo, J.K., Han, Y.M., Yu, K. (2004). *Drosophila* short Neuropeptide F regulates food intake and body size. *The Journal of Biological Chemistry*, *Vol. 279, No. 49, 50781-50789*.

Lee, T., Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron, Vol. 22, No. 3, 451-461.*

Le Quellec, A., Kervran, A., Blache, P., Ciurana, A.J., Bataille, D. (1992). Oxyntomodulin-like immunoreactivity: diurnal profile of a new potential enterogastrone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 74, No. 6, 1405-1409.*

Le Sauter, J., Noh, U., Geory, N. (1991). Hepatic portal infusion of glucagon antibodies increases spontaneous meal size in rats. *The American Journal of Physiology, Vol. 261, No. 1, R162-R165*.

Li, B., Predel, R., Neupert, S., Hauser, F., Tanaka, Y., Cazzamali, G., Williamson, M., Arakane, Y., Verleyen, P., Schoofs, L., Schachtner, J., Grimmelikhuijzen, C.J., Park, Y. (2008). Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Research, Vol. 18, No. 1, 113-122*.

Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S., Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science, Vol. 310, No. 5748, 683-685.*

Mao, T., O'Connor, D.H., Scheuss, V., Nakai, J., Svoboda, K. (2008). Characterization and subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators. *PLoS One, Vol.3, No. 3, e1796.*

Marder, E., Bucher, D. (2007). Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of lobsters and crabs. *Annual Review of Physiology, Vol. 69, 291-316*.

Mayer, J., Thomas, D.W. (1967). Regulation of food intake and obesity. *Science, Vol. 156, No. 3773, 328-337.*

~ 137 ~

McKinley, M.J., Denton, D.A., Oldfield, B.J., De Oliveira, L.B., Mathai, M.L. (2006). Water intake and the neural correlates of the consciousness of thirst. *Seminars in Nephrology, Vol. 26, No. 3, 249-257.*

McRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., Doudna, J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science, Vol. 311, No. 5758, 195-198.*

Meier, U., Gressner, A.M. (2004). Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clinical Chemistry, Vol. 50, No. 9, 1511-1525.*

Melcher, C., Bader, R., Walther, S., Simakov, O., Pankratz, M.J. (2006). Neuromedin U and its putative *Drosophila* homolog *hugin*. *PLoS Biology*, *Vol. 4, No. 3, e68*.

Melcher, C., Pankratz, M.J. (2005). Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain. *PLoS Biology, Vol. 3, No. 9, e305.*

Melcher, K., Xu, H.E. (2001). Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete Gal4 gene repression. *The EMBO Journal, Vol. 20, No. 4, 841-851*.

Millard-Stafford, M., Wendland, D.M., O'Dea, N.K., Norman, T.L. (2012). Thirst and hydration status in everyday life. *Nutrition Reviews, Vol. 70, Suppl. 2, S147-S151*.

Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Science's STKE*, Vol. 2005, No. 272, re3, 1-24.

Moran, T.H., Robinson, P.H., Goldrich, M.S., McHugh, P.R. (1986). Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Research, Vol. 362, No. 1, 175-179.*

Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S, Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature, Vol. 443, No. 7109, 289-295.*

Morris J.F., Pow, D.V., (1991). Widespread release of peptides in the central nervous system: quantitation of tannic acid-captured exocytoses. *The Anatomical Record, Vol. 231, No. 4, 437-445.*

Morrison, S.F., Nakamura, K. (2011). Central neural pathways for thermoregulation. *Frontiers in Bioscience, Vol. 16, 74-104.*

Murphy, K.G., Bloom, S.R. (2004). Gut hormones in the control of appetite. *Experimental Physiology, Vol. 89, No. 5, 507-516.*

Murphy, K.G., Bloom, S.R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature, Vol. 444, No. 7121, 854-859.*

Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation selective membrane channel. *Proceedings of the National Sciences of the United States of America, Vol. 100, No. 24, 13940-13945.*

Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology, Vol. 19, No. 2, 137-41*.

Nässel, D.R., Enell, L.E., Santos, J.G., Wegener, C., Johard, H.AD. (2008). A large population of diverse neurons in the *Drosophila* central nervous system expresses short neuropeptide F, suggesting multiple distributed peptide functions. *BMC Neuroscience, Vol. 9, No. 90, 1-35.*

Nässel, D.R., Homberg, U. (2006). Neuropeptides in interneurons of the insect brain. *Cell Tissue Research, Vol. 326, 1-24.*

Nässel, D.R., Winther, Å.M.E. (2010). *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in Neurobiology, Vol. 92, 42-104*.
Neupert, A., Fusca, D., Schachtner, J., Kloppenburg, P., Predel, R. (2012). Toward a single-cell-based analysis of neuropeptide expression in *Periplaneta Americana* antennal lobe neurons. *The Journal of Comparative Neurology Research in Systems Neuroscience, Vol. 520, 694-716.*

Nicolaï, L.J.J., Ramaekers, A., Raemaekers T., Drozdzecki, A., Mauss, A.S., Yan, J., Landgraf, M., Annaert, W., Hassan, B.A. (2010). Genetically encoded dendritic marker sheds light on neuronal connectivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 107, No. 47, 20553-20558.*

Nitabach, M.N., Blau, J., Holmes, T.C. (2002). Electrical silencing of *Drosophila* pacemaker neurons stops the free-running circadian clock. *Cell, Vol. 109, No. 4, 485-95.*

Noble, D. (2008). Claude Bernard, the first systems biologist, and the future of physiology. *Experimental Physiology, Vol. 93. No. 1, 16-26.*

Nusbaum, M.P., Blitz, D.M., Swensen, A.M., Wood, D., Marder, E. (2001). The roles of co-transmission in neural network modulation. *Trends in Neuroscience, Vol. 24, No. 3,* 146-154.

Ohkura, M., Sasaki, T., Sadakari, J., Gengyo-Ando, K., Kagawa-Nagamura, Y., Kobayashi, C., Ikegaya, Y., Nakai, J. (2012). Genetically encoded green fluorescent Ca^{2+} indicators with improved detectability for neuronal Ca^{2+} signals. *PLoS One, Vol. 7, No. 12, e51286*.

Ørskov, C., Rabenhøj, L., Wettergren, A., Kofod, H., Holst, J.J. (1994). Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended Glucagon-like peptide in humans. *Diabetes, Vol. 43, No. 4, 535-539.*

Park, D., Veenstra, J.A., Park, J.H., Taghert, P.H. (2008). Mapping peptidergic cells in *Drosophila*: where DIMM fits in. *PLoS One, Vol.3, No. 3, e1896*.

Pech, U., Pooryasin, A., Birman, S., Fiala, A. (2013). Localisation of the contacts between Kenyon cells and aminergic neurons in the *Drosophila melanogaster* brain using splitGFP reconstitution. *The Journal of Comparative Neurology, in press.*

Petzold, G.C., Hagiwara, A., Murthy, V.N. (2009). Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nature Neuroscience, Vol. No. 6, 784-793*.

Potter, C.J., Tasic, B., Russler, E.V., Liang, L., Luo, L. (2010). The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell, Vol. 141, No. 3, 536-546.*

Pulver, S.R., Pashkovski, S.L., Harnstein, N.J., Garrity, P.A., Griffith, C.C. (2009). Temporal Dynamics of neuronal activation by Channelrhodopsin-2 and TrpA1 determine behavioral output in *Drosophila* larvae. *Journal of Neurophysiology, Vol. 101, No. 6, 3075-3088.*

Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell, Vol. 123, No. 4, 621-629.*

Reiff, D.F., Thiel, P.R., Schuster, C.M. (2002). Differential regulation of active zone density during long-term strengthening of *Drosophila* neuromuscular junctions. *The Journal of Neuroscience, Vol. 22, No. 21, 9399-9409.*

Riemensperger, T., Pech, U., Dipt, S., Fiala, A. (2012). Optical calcium imaging in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1820, No. 8, 1169-1178.*

Rodrigues, V. (1980). Olfactory behavior of *Drosophila melanogaster*. Basic Life Sciences, Vol. 16, 361-371.

Roeder, T. (2005). Tyramine and Octopamine: Ruling behavior and metabolism. *Annual Review of Entomology, Vol. 50, 447-477.*

Roller, L., Tanaka, Y., Tanaka, S. (2003). Corazonin and corazonin-like substances in the central nervous system of the Pterygote and Apterygote insects. *Cell and Tissue Research, Vol. 312, No. 3,393-406.*

Roller, L., Yamanaka, N., Watanabe, K., Daubnerová, I., Žitňan, D., Kataoka, H., Tanaka,
Y. (2008). The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 38, No. 12, 1147-1157.*

Root, C.M., Ko, K.I., Jafari, A., Wang, J.W. (2011). Presynaptic facilitation by neuropeptide signaling mediates odor driven food search. *Cell, Vol. 145, No. 1, 133-144*.

Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G., Kobilka, B.K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature, Vol. 459, No. 7245, 356-363.*

Rosenzweig, M., Brennan, K.M., Tayler, T.D., Phelps, P.O., Patapoutian, A., Garrity, P.A. (2005). The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes & Development, Vol. 19, No. 4, 419-424.*

Rosenzweig, M., Kang, K., Garrity, P.A. (2008). Distinct TRP channels are required for warm and cool avoidance in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.105, No. 38, 14668-14673.*

Rottach, A., Kremmer, E., Nowak, D., Leonhardt, H., Cardoso, M.C. (2008). Generation and characterization of a rat monoclonal antibody specific for multiple red fluorescent proteins. *Hybridoma, Vol. 27, No. 5, 337-343*.

Rubin, G.M., Spradling, A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science, Vol. 218, No. 4570, 348-353*.

Ruedi, E.A., Hughes, K.A. (2008). Natural genetic variation in complex mating behaviors of male *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics, Vol. 38, No. 4, 424-436*.

Rulifson, E.J., Kim, S.K., Nusse, R. (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: Growth and diabetec phenotypes, *Science, Vol. 296, No. 5570, 1118-1120*.

Sahu, A. (2003). Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Frontiers in Neuroendocrinology, Vol.24, No. 4, 225-53.*

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science, Vol. 239, No. 4839, 487-491*.

Sam, A.H., Troke, R.C., Tan, T.M., Bewick, G.A. (2012). The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology, Vol. 63, No. 1, 46-56.*

Schjoldager, B., Mortensen, P.E., Myhre, J., Christiansen, J., Holst, J.J. (1989). Oxyntomodulin from distal gut-Role in regulation of gastric and pancreatic functions. *Digestive Diseases and Sciences, Vol. 34, No. 9, 1411-1419.*

Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, *Vol. 23, No. 33, 10495-10502*.

Schwartz, M.W., Porte, D. Jr. (2005). Diabetes, Obesity, and the brain. *Science, Vol. 307, No. 5708, 375-379.*

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D. Jr., Seeley, R.J., Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature, Vol. 404, No. 6778, 661-671*.

Schwartz, G.J. (2006). Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Vol.361, No. 1471, 1275-1280.*

Seidah, N.G., Chrétien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Research, Vol. 848, No. 1-2,* 45-62.

Sellami, A., Wegener, C., Veenstra, J.A. (2012). Functional significance of the copper transporter ATP7 in peptidergic neurons and endocrine cells in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letter, Vol. 586, No. 20, 3633-3638.*

Shiraiwa, T., Carlson, J.R. (2007). Proboscis Extension Response (PER) Assay in Drosophila. Journal of Visualized Experiments: JoVE, Vol. 3, e193.

Shutter, J.R., Graham, M., Kinsey, A.C., Scully, S., Lüthy, R., Stark, K.L. (1997). Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in *obese* and *diabetic* mutant mice. *Genes & Development, Vol. 11, No. 5, 593-602.*

Siddiqi, O. (1988). Olfaction in Drosophila. In Chemical Senses, Vol. 3, Chapter 7. Edited by Charles J. Wysocki, Morley R. Kare, Marcel Dekker, Inc., New York.

Sieburth, D., Madison, J.M., Kaplan, J.M. (2006). PKC-1 regulates secretion of neuropeptides. *Nature Neuroscience, Vol. 10, No. 1, 49-57.*

Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D. (1999). Basic Neurochemistry. 6th edition-Chapter 18, Philadelphia: Lippincott-Raven.

Simo, L., Zitnan, D., Park, Y. (2009). Two novel neuropeptides in innervation of the salivary glands of the black-legged tick, *Ixodes scapularis*: Myoinhibitory peptide and SIFamide. *The Journal of Comparative Neurology*, *517*, *No. 5*, *551-563*.

Slaidina, M., Delanoue, R., Gronke, S., Partridge, L., Leopold, P. (2009). A *Drosophila* Insulin-like peptide promotes growth during nonfeeding states. *Developmental Cell, Vol. 17, No. 6, 874-884.*

Sommer, M.V. (2012). Die Rolle des Neuropeptides SIFamide auf das appetitive Verhalten von Drosophila melanogaster. Bachelorarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P., Lieberman, J. (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine, Vol. 9, No. 3, 347-351.*

Southey, B.R., Sweedler, J.V., Rodrigues-Zas, S.L. (2008). Prediction of neuropeptide cleavage sites in insects. *Bioinformatics, Vol. 24, No. 6, 815-825*.

Söderberg, J.A.E., Carlsson, M., Nässel, D.R. (2012). Insulin-producing cells in the *Drosophila* brain also express satiety inducing cholecystokinin-like peptide, Drosulfakinin. *Frontiers in Endocrinology, Vol. 3, No. 109, 1-13.*

Spieth, H.T. (1974). Courtship Behavior in Drosophila. Annual Review of Entomology, Vol. 19, 385-405.

Stanley, B.G., Willet, V.L. 3rd, Donias, H.W., Ha, L.H., Spears, L.C. (1993). The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino-acid elicited eating. *Brain Research, Vol. 630, No. 1-2, 41-49.*

Statistica, (2009). Elektronisches Statistikbuch. Statistica Version 9, Statsoft (Europe) GmbH.

Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Buevalleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffman, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A., Mackellar, W., Rosteck, P.R.J., Schoner, B., Smith, D., Tinsley, F.C., Zhang, X.Y., and Heiman, M. (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the *obese* gene product. *Nature, Vol. 377, No.* 6549, 530-532.

Steland, A. (2004). Mathematische Grundlagen der empirischen Forschung. 1. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Strausfeld, N.J. (1975). Atlas of an Insect Brain. 1. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Swensen, A.M., Marder, E. (2000). Multiple peptides converge to activate the same voltage-dependent current in a central pattern-generating circuit. *The Journal of Neuroscience, Vol. 20, No. 18, 6752-6759.*

Sykes, P.A., Condron, B.G. (2005). Development and sensitivity to serotonin of *Drosophila* serotonergic varicosities in the central nervous system. *Developmental Biology, Vol. 286, No. 1, 207-216.*

Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. (1982). Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature, Vol. 296, No. 5858, 659-660.*

Ter Horst, G.J., de Boer, P., Luiten, P.G.M., Van Willigen, J.D. (1989). Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A *Phaseolus vulgaris* lectin tracing study in the rat. *Neuroscience, Vol. 31, No. 3, 785-797.*

Terhzaz, S., Rosay, P., Goodwin, S.F., Veenstra, J.A., (2007). The neuropeptide SIFamide modulates sexual behavior in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 352, No. 2, 305-310.*

Terhzaz, S., O'Connell, F.C., Pollock, V.P., Kean, L., Davies, S.A., Veenstra, J.A., Dow, J.A. (1999). Isolation and characterization of a leucokinin-like peptide of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology, Vol. 202, No. 24, 3667-3676.*

Tian, L., Hires, S.A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M.E., Chalasani, S.H., Petreanu, L.,
Akerboom, J., McKinney, S.A., Schreiter, E.R., Bargmann, C.I., Jayaraman, V., Svoboda,
K., Looger, L.L. (2009). Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved
GCaMP calcium indicators. *Nature Methods, Vol. 6, No. 12, 875-881*.

Teleman, A.A. (2010). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *The Biochemical Journal, Vol. 425, No. 1, 13-26*.

Thévenaz, P., Ruttimann, U.E., Unser, M. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Transaction of Image Processing, Vol. 7, No. 1, 27-41.*

Thompson, R. (2001). Das Gehirn: Von der Nervenzelle zur Verhaltenssteuerung. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage, Berlin-Heidelberg.

Toshinai, K., Mondal, M.S., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., Kangawa, K., Matsukura, S., (2001). Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 281, No. 5, 1220-1225.*

Toates, F., (1986). Motivational Systems. 1. Auflage , University Press Cambridge, Cambridge-New York.

Tour, O., Adams, S.R., Kerr, R.A., Meijer, R.M., Sejnowski, T.J., Tsien, R.W., Tsien, R.Y. (2007). Calcium green FIAsH as a genetically targeted small-molecule calcium indicator. *Nature Chemical Biology, Vol. 3, No. 7, 423-431.*

Tully, T., Quinn, W.G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant Drosophila melanogaster. Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, Vol. 157, No. 2, 263-277.

Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M.B., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., Wilding, J.P.H., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Herbert, J., Bloom, S.R. (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature, Vol. 379, No. 6560, 69-72.*

Uher, R., Reasure, J., Heining, M., Brammer, M.J., Campbell, I.C. (2006). Cerebral processing of food-related stimuli: Effects of fasting and gender. *Behavioural Brain Research, Vol. 169, No., 1, 111-119.*

van der Bliek, A.M., Meyerowitz, E.M. (1991). Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature, Vol. 351, No. 6325, 411-414.*

van den Pol, A.N. (2012). Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron, Vol. 76, No. 1, 98-115.*

Vázques-Acevedo, N., Rivera, N.M., Torres-González, A.M., Rullan-Matheu, Y., Ruíz-Rodrígez, E.A., Sosa, A.A. (2009). GYRKPPFNGSIFamide (Gly-SIFamide) modulates aggression in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *The Biological Bulletin*, *Vol. 217, No. 3,313-326*.

Veenstra, J.A. (2000). Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology, Vol.* 43, No. 2, 49-63.

Venken, K.J.T., Simpson, J.H., Bellen, H.J. (2011). Genetic manipualtion of genes and cells in the nervous system of the fruit fly. *Neuron, Vol.* 72, *No.* 2, 202-230.

Verleyen, P., Huybrechts, J., Baggerman, G., van Lommel, A., de Loof, A., Schoofs, L. (2004). SIFamide is a highly conserved neuropeptide: a comparative study in different insects. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 320, No. 2, 334-341.*

Verleyen, P., Huybrechts, J., Schoofs, L. (2009). SIFamide illustrates the rapid evolution in Arthropod neuropeptide research. *General and Comparative Endocrinology, Vol. 162, No. 1*, 27–35.

Vömel, M., Wegener, C. (2008). Neuroarchitecture of aminergic systems in the larval ventral ganglion of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One, Vol. 3, No. 3, e1848*.

Wachowiak, M., Economo, M.N., Díaz-Quesada, M., Brunert, D., Wesson, D.W., White, J.A., Rothermel, M. (2013). Optical dissection of odor information processing *in vivo* using GCaMPs expressed in specified cell types of the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, *Vol. 33, No. 12, 5285-5300.*

Wagh, D.A., Rasse, T.M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Dürrbeck, H., Bucher, A., Dabauvalle, M.C., Schmidt, M., Qin, G., Wichmann, C., Kittel, R., Sigrist, S-J., Buchner, E. (2006). Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron, Vol. 49, No. 6,833-844*.

Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowaska, D.E., Wang, X-M., McBay, D.L., Neville, W.A., Taddayon, M., Pickavance, L., Dryden, S., Thomas, M.E.A., McHale, M.T., Gloyer, I.S., Wilson, S., Buckingham, R., Arch, J.R.S., Trayhurn, P., Williams, G. (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptid Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes, Vol. 46, No. 3, 335-341*.

Wei, Z., Baggerman, G.R.J.N., Goldsworthy, G., Verhaert, P., De Loof, A., Schoofs, L. (2000). Sulfakinins reduce food intake in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology, Vol.46, No. 9, 1259-1265.*

White, K., Tahaoglu, E., Steller, H. (1996). Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. *Science, Vol. 271, No. 5250, 805-807.*

Wilding, J.P. (2002). Neuropeptides and appetite control. *Diabetic Medicine, Vol. 19, No.* 8, 619-627.

Williams, K.W., Scott, M.M., Elmquist, J.K. (2011). Modulation of the central melanocortin system by leptin, insulin, and serotonin: co-ordinated actions in a dispersed neuronal network. *European Journal of Pharmacology, Vol. 660, No. 1, 2-12.*

Williams, K.W., Elmquist, J.K. (2012). From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature Neuroscience, Vol. 15, No. 10, 1350-1353.*

Wu, Q., Wen, T., Lee, G., Park, J.H., Cai, H.N., Shen, P. (2003). Developmental Control of Foraging and Social Behavior by the *Drosophila* Neuropeptide Y-like System. *Neuron, Vol. 39, No. 1, 147-161.*

Wu, Q., Zhang, Y., Xu, J., Shen, P. (2005a). Regulation of hunger-driven behaviors by neural ribosomal S6 kinase in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102, No. 37, 13289-13294.

Wu, Q., Zhao, Z., Shen, P. (2005b). Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y- and insulin-like systems. *Nature Neuroscience, Vol. 8, No. 10, 1350-1355.*

Wu, Y., Reece, R.J., Ptashne, M. (1996). Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *The EMBO Journal, Vol. 15, No. 15, 3951-3963.*

Yang, C-H., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L.Y., Jan, Y-N. (2008). *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making Processes. *Science, Vol. 319, No. 5870, 1679-1683.*

Yasuda, A., Yasuda-Kamatani, Y., Nozaki, M., Nakajima, T. (2004). Identification of GYRKPPFNGSIFamide (crustacean-SIFamide) in the crayfish *Procambarus clarkii* by topological mass spectrometry analysis. *General and Comparative Endocrinology, Vol.* 135, No. 3, 391-400.

Yasuda-Kamatani, Y., Yasuda, A. (2006). Characteristic expression patterns of Allatostatin-like peptide, FMRFamide-related peptide, Orcokinin, Tachykinin-related peptide, and SIFamide in the olfactory system of crayfish *Procambarus clarkii*. *The Journal of Comparative Neurology, Vol. 496, No. 1, 135-147.*

Yeo, G.S., Heisler, L.K. (2012). Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nature Neuroscience, Vol.15, No. 10, 1343-1349*.

Yu, J.H., Kim, M-S. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes & Metabolism Journal, Vol. 36, No. 6, 391-398.*

Zeidler, M.P., Tan, C., Bellaiche, Y., Cherry, S., Häder, S., Gayko, U., Perrimon, N. (2004). Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins. *Nature Biotechnology, Vol. 22, No. 7, 871-876.*

Zeltser, L.M., Seeley, R.J., Tschöp, M.H. (2012). Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nature Neuroscience*, Vol. 15, No. 10, 1336-1342.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature, Vol. 372, No. 6505, 425-432.*

Zhang, W., Ge, W., Wang, Z. (2007). A toolbox for light control of *Drosophila* behaviors through Channelrhodopsin 2-mediated photoactivation of target neurons. *The European Journal of Neuroscience, Vol. 26, No. 9, 2405-2416.*

Zhao, Y., Bretz, C.A., Hawksworth, S.A., Hirsh, J., Johnson, E.C. (2010). Corazonin neurons function in sexually dimorphic circuitry that shape behavioral responses to stress in *Drosophila*. *PLoS One*, *Vol. 5*, *No. 2*, *e9141*.

Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L.M., Steller, H., Nambu, J.R. (1997). Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 94, No. 10, 5131-5136.*

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Abdominalganglion
Ago2	Argonaute2
AgRP	Agouti-ähnliche-Protein
АКН	Adipokinetisches Hormon
AL	Antennalloben
AN	Antennen
AstA	Allatostatin A
AstB/MIP	Allatostatin B
AstC	Allatostatin C
BA	Benzaldehyd
Вр	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin, dt. Rinderserumalbumin
Burs A	Bursicon
Burs B	Partner von Bursicon
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
CART	Kokain-Amphetamin-regulierende Transkript
CCAP	Crustacean Cardioactive Peptide
ССК	Cholezystokinin
CG	Computed Gene
CO_2	Kohlendioxid
СРН	Carboxypeptidase E
Crz	Corazonin
d.h.	Das heißt
dILP	Drosophila Insulin-ähnliches Peptid
DMN	Dorsomedialer Nukleus
DORK	Open Rectifier Potassium channel, dt. offener
	Gleichrichter K ⁺ Kanal
DSK	Drosulfakinine

dsRNA	Doppelsträngige RNA
EA	Ethylacetat
EB	Ellipsoid body, dt. Ellipsoidkörper
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase
FB	Fan-shaped body, dt. Fächerförmiger Körper
GI	Gastrointestinaltrakt
GK	Glukokinase
Glc6P	Glukose-6-Phosphat
GLP-1	Glukagon-ähnliches Peptid
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
ILP	Insulin-ähnliches Peptid
IPC	Insulin produzierende Zelle
\mathbf{K}^+	Kalium
Kir2.1	Einwärts Gleichrichter K ⁺ Kanal
K.P.	Keine Paralyse
LB Medium	Lysogeny broth medium
LDCV	Large Dense Core Vesikel
leuc	Leucokinin
LHA	Lateraler Hypothalamus
lkr	Leucokinin Rezeptor
МАРК	Mitogen activated protein Kinase
MP	Maxillarpalpen
mRNA	messenger RNA
α-MSH	Alpha-Melanozyten-stimulierendes Hormon
MW	Mittelwert
Na ²⁺	Natrium
N. ARC	Nukleus Arcuatus
NGS	Normal goat serum
NPF	Neuropeptid F
NPY	Neuropeptid Y
N. splanchnicus	Splanchnischer Nerv
NTS	Nucleus tractus solitarii
N. vagus	Vagus-Nerv

OP	Optical lobe
OPN	Olfaktorische Projektionsneurone
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone
OS	Ösophagus
OXN	Oxyntomodulin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Prohormon-Konvertasen
PCR	Polymerase chain reaction, dt. Polymerase-
	kettenreaktion
PDF	Pigment-dispersing factor
PFA	Paraformaldehyd
PI	Pars intercerebralis
РКА	Protein Kinase A
POMC	Pro-Opiomelanokortin
PVN	Paraventrikulärer Nukleus
РҮҮ	Peptid-Tyrosyl-Tyrosin
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA _i	RNA Interferenz
ROI	Region of interest, Region
Rpr	Reaper
RT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-PCR
siRNA	Short interfering RNA
sNPF	Short neuropeptide F, dt. kurzes Neuropeptid F
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SOG	Suboesophagiales Ganglion
STG	Stomatogastrisches Ganglion
Tab.	Tabelle
TDC2	Thyroxin Carboxylase 2
TG	Thorakalganglion
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Trh	Thyrotropin-Releasing Hormon
UAS	Upstream Activation Sequence
vgl.	vergleiche

Abbürzungsverzeichnis		
VMN	Ventromedialer Nukleus	
z.B.	Zum Beispiel	
ZNS	Zentrales Nervensystem	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1	Schematisches Modell und Aspekte der Peptidhormon Synthese	6
	und Transportes	
Abb. 2	Orexigene und Anorexigene Neuropeptide in der Regulation der	13
	Nahrungsaufnahme	
Abb. 3	Das UAS/Gal4-System	18
Abb. 4	Der Drosophila Offene Gleichrichter K ⁺ dORK als Methode zur	19
	Stilllegung von Zellen	
Abb. 5	Schematische Darstellung zur Störung der synaptischen	20
	Übertragung mittels shibire ^{ts}	
Abb. 6	Schematische Darstellung des UAS/Gal4-Systems in Kombination	21
	mit Gal80	
Abb. 7	Mechanismen der RNA-Interferenz	22
Abb. 8	Wirkungsweise des Drosophila Transient Rezeptor Protein A1	23
Abb. 9	Optogenetische Strategie für die Aktivierung von Neuronen	24
	mittels Channelrhodopsin2	
Abb. 10	Schematische Wirkungsweise des Q-Systems	25
Abb. 11	Schematische Darstellung des LexA/LexAOp-Systems	25
Abb. 12	Schematische Darstellung der split-GFP Technik	26
Abb. 13	Schematischer Aufbau und Funktion des Proteins G-CaMP	26
Abb. 14	LR Klonase Reaktion	50
Abb. 15	Die Durchflusskammer, Olfaktometer und schematische Übersicht	51
	über den experimentellen Aufbau zum in-vivo Calcium Imaging	
Abb. 16	Protokoll einer in-vivo Calcium Messung	53
Abb. 17	Experimenteller Versuchsaufbau für die Balzverhaltens-	56
	experimente	
Abb. 18	Speziell zubereitetes rotes Fliegenfutter	58
Abb. 19	Weibliche Drosophila vor A) und nach B) einer Stunde	59
	Nahrungsaufnahme von angefärbten Futter	
Abb. 20	Tully-Quinn Maschine für die Experimente zur olfaktorischen	60
	Präferenz	

Abb.21	Tully-Quinn Box	61
Abb. 22	Aufbau des T-maze für die olfaktorische Präferenz	62
Abb. 23	Aufnahme von Kragenkammern	64
Abb. 24	Immunreaktivität gegen SIFamid im Zentralnervensystem von Drosophila	67
Abb. 25	Immunreaktion gegen die Dendriten der SIFamidergen Neurone	69
Abb. 26	Immunhistochemische Färbungen gegen dILP und Lokalisation von Zell-Zell-Kontakten der SIFamidergen Neurone und der IPCs mittels der split-GFP Technik	71
Abb. 27	Immunhistochemische Färbungen gegen sNPF und Lokalisation von Zell-Zell-Kontakten zwischen SIFamidergen Neuronen und sNPF produzierenden Zellen mit Hilfe der split-GFP Technik	73
Abb. 28	Immunhistochemische Färbungen gegen Corazonin und Lokalisation von Zell-Zell-Kontakten zwischen den SIFamidergen Neurone und Corazoninergen Zellen mit Hilfe der split-GFP Technik	75
Abb. 29	AnatomischeKorrelationzwischenOktopaminergen-undSIFamidergenZellenmitHilfedersplit-GFPTechnikundimmunhistochemischenMethoden </td <td>77</td>	77
Abb. 30	Das Balzverhalten von männlichen Drosophila melanogaster	80
Abb. 31	Balzverhalten von transgenen Männchen (mit dem <i>Drosophila</i> TrpA1 Kanal) mit transgenen Weibchen bei 22°C und 28°C	81
Abb. 32	Nachweis, dass die SIFamiderge Neurone ablatiert werden können	83
Abb. 33	Balzverhalten von transgenen Männchen und Weibchen mit ablatierten SIFamidergen Neuronen bei 22°C	84
Abb. 34	Experimente zur Nahrungsaufnahme von weiblichen <i>Drosophila</i> durch eine artifiziell hervorgerufene Depolarisation der SIFamidergen Neurone	87
Abb. 35	Expression des Neuropeptids SIFamid nach induzierter RNA Interferenz und Experimente zur Nahrungsaufnahme	90
Abb. 36	Versuch in adulten Fliegen die SIFamidergen Neurone mit Rpr- Technik zu ablatieren	93
Abb. 37	Rüsselreflex Antwortverhalten auf Stimulation mit	94

unterschiedliche Saccharosekonzentrationen

Abb. 38	Olfaktorische Präferenzen von gesättigten und ungesättigten	97
	Drosophila mit unterschiedliche Düften bei 29°C und 18°C	
Abb. 39	Expressionsstärke der Fluoreszenz zwischen den unterschiedlichen	101
	SIFa-LexA Linien	
Abb. 40	Überprüfung der neu generierten LexAOp:dTrpA1-mCherry	102
	Fliegen	
Abb. 41	In-vivo Calcium Imaging in olfaktorischen Projektionsneurone und	104
	SIFamidergen Neuronen	
Abb. 42	Calcium-Aktivitätsmuster in den Glomeruli während einer	105
	Duftgabe und thermogenetisch induzierter Aktivierung der	
	SIFamidergen Neurone	
Abb. 43	Hypothetischer Vergleich zwischen Menschen und Drosophila	119
	melanogaster in Bezug der Nahrungsaufnahme	

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tab. 1	Tabellarische Übersicht der Neuropeptide bei Invertebraten	7
Tab. 2	Orexigene und anorexigene Neuropeptide bei Vertebraten	12
Tab. 3	Neuropeptide und die mögliche orexigene oder anorexigene	16
	Wirkung auf das Tier	

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Simon Kobbenbring, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel, sofern nicht anders angegeben, benutzt habe. Jegliche Kooperation bei Experimenten habe ich als diese kenntlich gemacht. Mir ist bewusst, dass eine nicht ordnungsgemäße Angabe von Quellen und Beiträgen Dritter zu einem Entzug des Titels führen.

Ich gebe ebenso folgende Erklärung ab: Eine entsprechende Promotion wurde an keiner anderen Hochschule im In- oder Ausland beantragt; die eingereichte Dissertation oder Teile von ihr wurden nicht für ein anderes Promotionsvorhaben verwendet.

Göttingen,..... Simon Kobbbenbring

(Ort,Datum)

(Unterschrift)

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst bei Herr Prof. Dr. André Fiala für die sehr gute Betreuung während meinen Jahren als Doktorand in seiner Arbeitsgruppe: Molekulare Neurobiologie des Verhaltens bedanken. Besonders für die Möglichkeit, in einem faszinierenden Bereich der Neurowissenschaften einzutauchen und für die Möglichkeit meine Doktorarbeit, in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Ich möchte mich ebenso bei Herr Prof. Dr. Martin Göpfert bedanken für die gute Betreuung als Zweitbetreuer und für seine Zeit für die "Thesis"-Komitees.

Meinen Dank gilt ebenso der gesamten Arbeitsgruppe "Molekulare Neurobiologie des Verhaltens" und zwar ehemaligen Mitgliedern und derzeitigen Mitgliedern: Abud, Atefeh, Mandy, Priyanka, Uli, Jonas, Shubham, David, Tom, Sandra, Britta, Angelika, Ulla, Sophia und Jutta. Ich möchte mich für die tolle Unterstützung, die ich von euch erhalten habe, herzlich bedanken! Besonderen Dank gilt auch Ulrike Pech, für ihre guten Kommentare zu meiner Dissertation und für die Abende auf der "Wissensbank". Dr. Thomas Riemensperger für seine Hilfe bei der Anatomie und seiner Hilfsbereitschaft. Nicht zu vergessen möchte ich mich bei Mirjam-Vanessa Sommer bedanken für die Unterstützung innerhalb meines Projektes als Bachelorstudentin. Meinen Dank gilt auch Britta Bahl für die Hilfe bei den Durchführungen der split-GFP Färbungen zusammen mit Ulrike Pech in Rahmen ihrer Bachelorarbeit.

Natürlich möchte ich mich herzlich bei meinen Freunden aus Oldenburg, Bremen, Bremerhaven und Göttingen bedanken! Ihr hattet immer ein offenes Ohr und habt mich immer wieder motiviert! Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern Peter und Elana Kobbenbring bedanken. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich auf meinen Stationen in Düsseldorf, Oldenburg und Göttingen und schwierigen Lebensphasen unterstützt.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten	X down
	Simon Kobbenbring Hannoversche Straße 152B 37077Göttingen 20.08.1981 Bremerhaven simonkobbenbring@yahoo.de
C4 1:	
10.2002-03.2003	Biologiestudium an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
04.2003-06.2009	Biologiestudium an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg. Abschluss: Dipl. Biol.
01.2008-06.2009	Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Biodiversität und Evolution der Tiere unter der Anleitung von Prof. Dr. Gabriele Gerlach.
07.2009-09.2009	Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Biodiversität und Evolution der Tiere an der Carl-von- Ossietzky Universität Oldenburg.
10.2009-12.2009	Molekularbiologisches Praktikum in der Arbeitsgruppe Biodiversität und Evolution der Tiere an der Carl-von- Ossietzky Universität Oldenburg.
01.2010-Heute	Doktorand in der Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie des Verhaltens an der Georg-August- Universität Göttingen. Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. André Fiala.
Fremdsprachenkenntnisse	Englisch (gut)

Spanisch (Grundlagen)

Französisch (Grundlagen)

Konferenzen und Publikationen

Ausgewählte Konferenzen

<u>Kobbenbring</u>, <u>S.</u> und Gerlach, G. (2009). Kin recognition in zebrafish (*Danio rerio*). 14th Annual DZG Evolution PhD. Meeting 2009, München, Deutschland. *Poster*

<u>Kobbenbring</u>, <u>S.</u>, Sommer, M.V., Riemensperger, T., Fiala, A. (2012). The neuropeptide SIFamid enhances appetitive behavior in *Drosophila melanogaster*. 14th European *Drosophila* neurobiology conference, Padua, Italien. *Poster*

<u>Kobbenbring</u>, <u>S.</u>, Riemensperger, T., Pech, U., Jauch, M., Schweig, J., Barth, J., Bahl, B., Fiala, A. (2013). The neuropeptide SIFamid enhances appetitive behavior in *Drosophila melanogaster*. 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Deutschland. *Poster*

Publikation

Hinz, C., <u>Kobbenbring</u>, <u>S.</u>, Kress, S., Sigman, L., Müller, A., Gerlach, G. (2013). Kin recognition in zebrafish *Danio rerio* is based on olfactory and visual stimuli. *Animal Behavior*, *Vol.* 85, *Issue* 5, 925-930.