



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7463

Molekulargenetische Untersuchung eines nahrungsabhängigen, neuronalen Schaltkreises in Drosophila

R. Bader

Institut für Toxikologie und Genetik

Juli 2009

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7463

**Molekulargenetische Untersuchung
eines nahrungsabhängigen, neuronalen
Schaltkreises in Drosophila**

Rüdiger Bader

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH) genehmigte DISSERTATION

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2009

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-074635

**Molekulargenetische Untersuchung eines
nahrungsabhängigen, neuronalen Schaltkreises in
*Drosophila***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Rüdiger Bader

aus Bruchsal

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse
Referent: Prof. Dr. M. J. Pankratz
Korreferent: Prof. Dr. M. Bastmeyer
Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2008

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Hilfsmittel als solche gekennzeichnet und angegeben habe. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut wurde nach bestem Wissen als solches gekennzeichnet. Ich habe die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung beachtet.

Karlsruhe, November 2008

Rüdiger Bader

„That which an organism can perceive is determined by the unique allotment of neurons with which it is genetically endowed, and we are therefore trapped in the representation of the world made possible by our genes.“

Richard Axel, 2004

Zusammenfassung

Nahrungsaufnahme kann sowohl durch eine Vielzahl externer sensorischer Stimuli wie beispielsweise Geruch oder Geschmack, als auch durch systemische Signale wie Ernährungszustand oder metabolische Bedürfnisse gesteuert werden. Durch die immer häufiger auftretenden Stoffwechsel-Krankheiten wie Fettleibigkeit und Diabetes wird es zunehmend wichtiger, das komplexe regulatorische Netzwerk zu verstehen, welches verschiedene Aspekte des Ess-/Fressverhaltens beeinflusst und die Frage zu klären, wie das zentrale Nervensystem relevante Informationen verarbeitet, um geeignete Entscheidungen zu treffen.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuronaler Schaltkreis beschrieben, der bei dem Fressverhalten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* eine modulatorische Rolle einnimmt. Dieser Schaltkreis besteht aus 20 Neuronen, die das *hugin*-Gen exprimieren, welches ein Neuropeptid kodiert. Die Hugin-Neurone befinden sich im suboesophagealen Ganglion des zentralen Nervensystems und innervieren vier Zielregionen: die Ringdrüse (neuroendokrines Organ), den Pharynx (Nahrungsaufnahme), das Protocerebrum (höheres Gehirnzentrum) und das ventrale Nervensystem. In dieser Studie wird gezeigt, dass Neuriten einzelner Hugin-Neurone nur eines der vier Haupt-Projektionsziele innervieren. Außerdem wird eine Komplexität der Neuron-Morphologie beschrieben, die aus der Untersuchung des gesamten Hugin-Clusters nicht ersichtlich ist. Eine bestimmte Gruppe der Hugin-Zellen besitzt Verästelungen lateral des ösophagealen Foramens, die als Dendriten identifiziert werden konnten. Dort überschneiden sie sich mit den Axon-Enden verschiedener gustatorischer Rezeptor-Neurone. Ein weiterer wichtiger Punkt dieser Arbeit ist die Identifizierung von homologen Peptiden in anderen Insekten und in Säugetieren. Es wird gezeigt, dass es sich bei dem in Säugetieren vorkommendem Neuromedin U (NmU) um ein Homolog zu Hugin handeln könnte. Außerdem wird beschrieben, dass die Morphologie des Hugin-Schaltkreises in verschiedenen Insekten, wie der Honigbiene *Apis mellifera* oder dem Tabakswärmer *Manduca sexta*, konserviert ist. Zusätzlich konnten bestimmte Hugin-Neurone als Zielzellen des als Insulin-Homolog geltenden Dilp2-Peptides (Drosophila-insulin-like-peptide-2) identifiziert werden. Somit war es möglich die morphologische Verbindung zweier neuronaler Schaltkreise im zentralen Nervensystem der *Drosophila*-Larve nachzuweisen.

Abstract

Molecular and genetic analysis of a taste dependent neuronal circuit in *Drosophila*

Feeding can be regulated by a variety of external sensory stimuli such as olfaction and gustation, as well as by systemic internal signals of feeding status and metabolic needs. Faced with a major health epidemic in eating-related conditions, such as obesity and diabetes, there is an ever increasing need to dissect and understand the complex regulatory network underlying the multiple aspects of feeding behavior. It is important to investigate the pivotal role of the central nervous system in integrating external and internal feeding-relevant information, thus enabling the organism to make one of the most basic decisions – to eat or not to eat.

This work focuses on a neural circuit in *Drosophila* that modulates feeding behavior in response to nutrient signals. This neural circuit consists of 20 cells that express the neuropeptide encoding gene *hugin*. The *hugin* neurons are located in the subesophageal ganglion of the central nervous system and innervate four major targets: the ring gland (neuroendocrine organ), the pharynx (uptake of food), the protocerebrum (higher brain center) and the ventral nerve cord. By investigating the *hugin* neurons at a single-cell level it can be shown that single cells project only to one of the four major targets. This study reveals novel complexity in the morphology of individual *hugin* neurons, which was not obvious by looking at the whole cluster. A defined subset of *hugin* neurons shows arborization lateral to the foramen that could be identified as dendritic neurites. These dendrites intermingle with axon endings of distinct gustatory receptor neurons coming from gustatory organs. Another important point of this study is the identification of homologous peptides in other insects and mammals. It is postulated that the mammalian Neuromedin U (NmU) is a homolog to the *hugin* neuropeptide. Furthermore it could be shown that the morphology of the *hugin* neuronal circuit is conserved among different insects such as the honeybee *Apis mellifera* or the tobacco hornworm *Manduca sexta*. In addition distinct *hugin* neurons could be described as target cells of the insulin homolog *Drosophila* insulin like peptide 2 (Dilp2), thus showing the connection between two neuronal circuits in the central nervous system of the *Drosophila* larva.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Organisation der chemosensorischen Organe von <i>Drosophila melanogaster</i>	2
1.2	Gustatorische Rezeptoren in <i>Drosophila melanogaster</i>	3
1.3	Verarbeitung interner Signale: das innere Milieu.....	5
1.4	Das Neuropeptid Hugin im ZNS von <i>Drosophila</i>	7
1.4.1	Lage und Projektion der Hugin-Neurone.....	8
1.4.2	Funktion der Hugin-Neurone beim Fressverhalten.....	8
1.5	Zielsetzung.....	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Antikörper.....	11
2.1.2	Enzyme.....	12
2.1.3	Fliegenlinien.....	12
2.1.4	Geräte.....	13
2.1.5	Kits.....	14
2.1.6	Primer.....	15
2.1.7	Puffer und Medien.....	15
2.1.8	Verbrauchsmaterial.....	16
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Fliegenhaltung.....	20
2.2.2	Flp-out Technik.....	20
2.2.3	Histochemische und Fluoreszenzfärbungen.....	21
2.2.4	Markierung von InSitu-Sonden.....	21
2.2.5	Histochemische InSitu-Hybridisierung.....	22
2.2.6	Fluoreszenz-Proteindetektion.....	22
2.2.7	Bakterien-Transformation.....	23
2.2.8	Präparation von Plasmid-DNA.....	24
2.2.9	Restriktionsverdau und Ligation.....	24
2.2.10	RNA-Isolation.....	25
2.2.11	PCR und RT-PCR.....	26
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Untersuchung der Projektionsmuster einzelner Hugin-Neurone.....	29

Inhaltsverzeichnis

3.1.1 Projektion in das Protocerebrum.....	30
3.1.2 Projektion in das ventrale Nervensystem.....	30
3.1.3 Projektion zur Ringdrüse	32
3.1.4 Projektion zum Pharynx.....	33
3.1.5 Morphologie der Hugin-Neurone an der Grenze zwischen SOG und Foramen.....	33
3.2 Die Hugin-Neurone und das olfaktorische System.....	36
3.3 Polarität der Hugin-Neurone: Dendriten im Tritocerebrum	36
3.4 Die Hugin-Neurone und das gustatorische System	39
3.4.1 Expressionsmuster verschiedener gustatorischer Rezeptor-Neurone relativ zur Lage der Hugin-Neurone.....	40
3.4.2 Expression von Gr28b.b in der <i>Drosophila</i> -Larve	41
3.5 Homologie.....	45
3.5.1 Homologe Peptide zu Hugin in Säugetieren und Insekten	45
3.5.2 Prozessierung der Prä-Propeptide PBAN und Hugin	47
3.5.3 Hugin und PBAN: Zwei konservierte neuronale Netzwerke.....	48
3.5.4 Hugin in der Honigbiene <i>Apis mellifera</i>	51
3.6 Hugin und Insulin: zwei neuronale Schaltkreise im <i>Drosophila</i> ZNS	53
3.6.1 Hugin und Insulin: Verbindung zwischen zwei neuronalen Schaltkreisen	53
3.6.2 Dilp2 wird nicht in den Hugin-Zellen exprimiert.....	55
3.6.3 Expression von Imp-L2 in den lateralen Hugin-Zellen	57
3.6.4 Aktivität der Insulin-Signal-Kaskade in den Hugin-Neuronen	58
3.6.5 Dilp2-Aufnahme kann durch Überexpression des <i>Drosophila</i> -Insulin-Rezeptors (dInR) verstärkt werden.....	59
3.6.6 Die Internalisierung von Dilp2 in die Hugin-Zellen findet nicht über Rab5-positive Endosomen statt	60
4 Diskussion.....	63
4.1 Einzelne Hugin-Neurone innervieren nur eine der vier übergeordneten Zielregionen...63	
4.1.1 Einzelne Hugin-Neurone besitzen sich überlappende Neuriten an der Grenze des Foramens zum SOG	63
4.2 Prozessierung der Prä-Propeptide von <i>hugin</i> und PBAN aus evolutionärer Sicht	66
4.3 Geschmack, Nahrungsaufnahme und Paarung	67
4.4 Neuromodulation neuronaler Schaltkreise im ZNS.....	69
4.5 Aufnahme von Insulin in die Hugin-Zellen.....	70
4.5.1 Metabolische und physiologische Funktion von Dilp2 in den Hugin-Neuronen	71

Inhaltsverzeichnis

4.5.2 Beobachtung des Insulin-Transportes und der Internalisierung des Insulin-Rezeptors	72
4.6 Der Hugin-Schaltkreis ist in der Biene konserviert	72
5 Literatur.....	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Neuroanatomie des chemosensorischen Systems der <i>Drosophila</i> -Larve.....	4
Abbildung 1.2: Zusammenspiel zwischen verschiedenen Organen und Signalkaskaden, die an der Stoffwechsel-Homöostase der <i>Drosophila</i> -Larve beteiligt sind.....	6
Abbildung 1.3: Lage und Projektion der Hugin-Neurone in Larven und adulten Fruchtfliegen.....	9
Abbildung 1.4: Modell von Hugin als Modulator für Fressverhalten.....	10
Abbildung 3.1: Projektion in das Protocerebrum.....	31
Abbildung 3.2: Projektion in das ventrale Nervensystem und in die Ringdrüse.....	32
Abbildung 3.3: Projektion zum Pharynx.....	34
Abbildung 3.4: Position der Hugin-Neurone relativ zum Foramen.....	35
Abbildung 3.5: Lage der Hugin-Neurone relativ zum olfaktorischen System.....	37
Abbildung 3.6: Polarität der Hugin-Neurone.....	38
Abbildung 3.7: Axon-Enden verschiedener gustatorischer Rezeptor-Neurone im SOG.....	42
Abbildung 3.8: Expression von Gr28b.b in der <i>Drosophila</i> -Larve.....	44
Abbildung 3.9: Homologie von PK-2 zu Neuropeptiden aus Insekten und Säugetieren.....	46
Abbildung 3.10: Vergleich der Prozessierung der Prä-Propeptide von PBAN und Hugin.....	49
Abbildung 3.11: Co-Lokalisation von Hugin und PBAN im <i>Drosophila</i> -Gehirn.....	50
Abbildung 3.12: Hugin in der Honigbiene <i>Apis mellifera</i>	52
Abbildung 3.13: Hugin und Insulin: morphologischer Zusammenhang zwischen zwei neuronalen Schaltkreisen.....	55
Abbildung 3.14: Dilp2-Transport in die lateralen Hugin-Neurone.....	56
Abbildung 3.15: Co-Lokalisation von Hugin und IMP-L2.....	57
Abbildung 3.16: Aktivität des Insulin-Signal-Weges in den Hugin-Neuronen.....	58
Abbildung 3.17: Überexpression des <i>Drosophila</i> -Insulin-Rezeptors (dInR) in den Hugin-Zellen.....	60
Abbildung 3.18: Expression von Rab5 und Rab5-DN in den Hugin-Zellen.....	61
Abbildung 4.1: Zusammenfassung der verschiedenen Gruppen der Hugin-Neurone.....	64
Abbildung 4.2: Fruitless (fru) in den Hugin-Neuronen.....	68
Abbildung 4.3: Modulation verschiedener Verhaltensweisen durch die Hugin-Zellen.....	70

Abkürzungsverzeichnis

A	anterior
Aaeg	<i>Aedes aegypti</i>
Agam	<i>Anopheles gambiae</i>
AKH	adipokinetisches Hormon
AL	Antennalloben
Amel	<i>Apis mellifera</i>
BH	Gehirnhemisphäre (engl.: brain hemisphere)
CA	Corpora allata
CC	Corpora cardiaca
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
CX	Calyx
D	dorsal
DH	Diapause Hormon
Dilp	<i>Drosophila</i> insulin-like peptide
dInR	<i>Drosophila</i> -Insulin-Rezeptor
Dmel	<i>Drosophila melanogaster</i>
DO	Dorsalorgan
DOG	Dorsalorgan Ganglion
Dper	<i>Drosophila persimilis</i>
DPS	dorsales Pharynx-Sinnesorgan
Dvir	<i>Drosophila virilise</i>
engl	englisch
ETH	ecdysis triggering hormone
F	Foramen
fru	Fruitless
GFP	Green Fluorescent Protein
GR	gustatorischer Rezeptor
GRN	gustatorisches Rezeptor-Neuron
hug	Hugin
Hzea	<i>Helicoverpa zea</i>
IGFBP-7	insulin-like-growth-factor-binding-protein-7
Imp-L2	imaginal morphogenesis-protein-late 2
IPZ	Insulin-produzierende Zelle
klu	klumpfuss
LAL	larvale Antennalloben

Abkürzungsverzeichnis

LH	laterals Horn
LN	locales Interneuron
MB	Pilzkörper (engl: mushroom body)
Msex	<i>Manduca sexta</i>
NmS	Neuromedin S
NmU	Neuromedin U
ORN	olfaktorisches Rezeptor-Neuron
P	posterior
PBAN	pheromone biosynthesis-activating -neuropeptide
PC	Protocerebrum
PGN	PBAN-encoding gene neuropeptide
PH	Pharynx
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
PIP ₃	phosphatidylinositol-3,4,5-P ₃
PK	Pyrokinin
PPS	posteriores Pharynx-Sinnesorgan
RG	Ringdrüse
SGNP	suboesophageal ganglion neuropeptide
SOG	suboesophageales Ganglion
TC	Tritocerebrum
Tca	<i>Tribolium castaneum</i>
TO	Terminalorgan
TOG	Terminalorgan Ganglion
TOR	Target of Rapamycin
Trans	Transmission
V	ventral
VNC	ventrales Nervensystem (eng.: ventral nerve cord)
VO	Ventralorgan
VOG	Ventralorgan Ganglion
VPS	ventrales Pharynx-Sinnesorgan
YFP	Yellow Fluorescent Protein
ZNS	zentralen Nervensystem

1 Einleitung

Die Nahrungsaufnahme ist eine der essentiellen Aktivitäten im Tierreich. Wie viel und wie oft gefressen wird, Jagdstrategien und Nahrungspräferenzen haben sich zwischen den Spezies zwar unterschiedlich entwickelt, aber eine Gemeinsamkeit bleibt: Nahrung muss die Anforderungen an Wachstum, Überleben und Reproduktion erfüllen. Das hat dazu geführt, dass sich innerhalb des Tierreiches spezialisierte Verhaltensweisen der Nahrungsaufnahme entwickelt haben, die sowohl vom Nahrungsangebot der Umwelt als auch vom Ernährungszustand abhängig sind. Viele Verhaltensweisen sind offensichtlich, wie zum Beispiel die Nahrungssuche bei Hunger. Andere wiederum beinhalten schwierigere Entscheidungen, wie beispielsweise die Entscheidung zwischen ähnlichen Nahrungsquellen oder zwischen Fressen oder von einem möglichen Jäger gefressen zu werden.

Zudem müssen sich alle Organismen ständig durch die Regulierung des Stoffwechsels sowohl an die Umwelt, als auch an die daraus resultierenden energetischen Bedürfnisse des Körpers anpassen. Unter allen Umständen muss gewährleistet sein, dass das innere Milieu ausgeglichen bleibt, um die Funktionalität der Organe aufrechtzuerhalten. Ein interessantes biologisches Problem ist die Frage, wie das zentrale Nervensystem (ZNS) relevante Informationen verarbeitet, um geeignete Entscheidungen zu treffen. Dieser Sachverhalt ist nicht nur für die biologische Grundlagenforschung von Interesse, sondern hat auch großen Einfluss auf Medizin und Landwirtschaft.

Das sich ständig ändernde Nahrungsangebot in modernen Industriestaaten zusammen mit einem sich ständig verändernden Lebensstil hat dazu beigetragen, dass immer mehr Menschen von ernstzunehmenden Krankheiten wie Diabetes und Fettleibigkeit betroffen sind. Das zentrale Nervensystem, das sich im Laufe der Evolution unter den Bedingungen von Nahrungsknappheit entwickelt hat, muss nun mit dem Überangebot an Nahrung zurechtkommen. In der Landwirtschaft verursachen Insekten einen immensen Schaden an Nutzpflanzen. Dieses Problem ist besonders akut in Regionen, in denen Nahrungsmangel und Hunger eine gewaltige Bedrohung darstellen.

Einige der Signalkaskaden, die bei der Aufrechterhaltung des inneren Milieus wichtige Funktionen einnehmen, wurden bereits in *Drosophila* identifiziert. Für die Untersuchung dieser Signalkaskaden ist *Drosophila* ein Modellorganismus erster Wahl. Die Fruchtfliege bietet ein einfaches, aber sehr ausgeglichenes System, bei dem die Homöostase durch das Zusammenspiel verschiedener, in ihrer physiologischen Aufgabe wohl definierter Organe,

aufrechterhalten wird. Auch die Organisation der chemosensorischen Organe von *Drosophila* wurde bereits ausgiebig studiert.

1.1 Organisation der chemosensorischen Organe von *Drosophila melanogaster*

Bei Insekten, die eine komplette Metamorphose durchlaufen, haben erwachsene Tiere und Larven sehr unterschiedliche Lebensweisen. Zum Beispiel müssen erwachsene Fruchtfliegen beachtliche Strecken zurücklegen, um Nahrungsquellen, Geschlechtspartner oder Orte für die Eiablage auszumachen. Im Gegensatz dazu leben die Larven der Fruchtfliege direkt auf ihrer Nahrungsquelle und müssen daher keine längeren Distanzen überwinden. Aufgrund dieser verschiedenen Lebensweisen gibt es zwischen diesen Stadien Unterschiede in der chemosensorischen Leistungsfähigkeit und in der Komplexität der grundlegenden, neuronalen Schaltkreise. Obwohl Larven auf viele flüchtige Geruchsstoffe reagieren (Cobb und Domain, 2000; Fishilevich et al., 2005; Heimbeck et al., 1999; Rodrigues, 1980), ist das Geruchssystem der Larve viel einfacher aufgebaut als das der erwachsenen Tiere, zumindest bezogen auf die Anzahl der Zellen (Fishilevich et al., 2005; Kreher et al., 2005; Masuda-Nakagawa et al., 2005; Python und Stocker, 2002; Ramaekers et al., 2005). Die Organisation der olfaktorischen Systeme bei Larven und erwachsenen Fliegen ist jedoch überraschend ähnlich.

Der chemosensorische Apparat der *Drosophila*-Larve enthält drei Haupt-Sinnesorgane, die sich auf der Kopfoberfläche befinden: das Dorsalorgan (DO), das Terminalorgan (TO) und das Ventralorgan (VO). Des Weiteren gibt es drei Pharynx-Sinnesorgane (Gendre et al., 2004) (siehe Abbildung 1.1). Diese Sinnesorgane setzen sich aus mehreren Sensillen zusammen, von denen jede ein oder mehrere sensorische Neurone, sowie drei akzessorische Zellen beinhaltet. Das Dorsalorgan besteht aus der zentralen „Kuppel“ (engl.: dome) sowie sechs peripheren Sensillen. Die „Kuppel“ wird von den dendritischen Verästelungen von 21 sensorischen Neuronen innerviert, die mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden (Kreher et al., 2005; Oppliger et al., 2000) oder Ablationsstudien (Heimbeck et al., 1999) als olfaktorische Rezeptor-Neurone (ORNs) identifiziert wurden. Wenn man diese Zellen durch die Expression von Toxinen blockiert oder zerstört, wird die Larve anosmisch, was darauf hinweist, dass diese Neurone die einzigen ORNs in der Larve sind (Fishilevich et al., 2005; Larsson et al., 2004). Analog zu *Musca* (Chu-Wang und Axtell, 1972; Chu und Axtell, 1971)

sind die verbleibenden Sensillen der „Kuppel“ sowie die des Terminal- und Ventralorgans wahrscheinlich überwiegend Geschmackssensillen. Jedoch enthalten diese Organe möglicherweise thermo- (Liu et al., 2003), mechano- und hygrosensorische Neurone. Gustatorische und mechanische Wahrnehmung wird auch für die drei Pharynx-Organen vermutet.

Vergleicht man die chemosensorischen Organe der Larven mit denen der erwachsenen Tiere, ist der wohl auffälligste Unterschied die Reduktion der Zellzahl der ORNs von 1300 in erwachsenen Tieren auf 21 in der Larve. Bei gustatorischen Rezeptor-Neuronen (GRN) ist dieser Unterschied weit weniger ausgeprägt. Die geschätzten 300 GRNs des Kopfes der erwachsenen Fliege (Matsunami und Amrein, 2003; Stocker, 1994) stehen etwa 80 GRNs der Larve gegenüber (Python und Stocker, 2002). Folglich sind in der Larve die GRNs den ORNs, im Gegensatz zur erwachsenen Fliege, zahlenmäßig überlegen. Dies spricht für eine erwartete, überwiegend Kurzstrecken-orientierte Wahrnehmung bei Larven. Ein weiteres larvenspezifisches Charakteristikum ist die Durchmischung von Geschmacks- und Geruchsfunktion auf sensorischer Stufe, sogar in ein und demselben Sinnesorgan. Unterscheidung zwischen Geruch und Geschmack mag bei Larven, die auf der Nahrungsquelle leben, weit weniger bedeutsam sein als für fliegende Insekten. Nichtsdestotrotz sind diese beiden Funktionen im Hinblick auf die Zielgebiete der abgehenden Nervenfasern klar unterschiedlich organisiert: die olfaktorischen, afferenten Neurite innervieren die glomerulär organisierten Antennalloben (AL), während Geschmacksinformationen zu verschiedenen Zielgebieten in das suboesophageale Ganglion (SOG) geschickt werden (Abbildung 1.1). Daher kann man behaupten, dass sich die chemosensorischen Organe von Larven und erwachsenen Fliegen zwar in der peripheren Aufnahme der Reize unterscheiden, jedoch denselben Aufbau der sensorischen Projektionsneurone und zentralen Signalwege aufweisen (Vosshall und Stocker, 2007).

1.2 Gustatorische Rezeptoren in *Drosophila melanogaster*

Drosophila kann viele der Stimuli schmecken, die auch von Säugetieren wahrgenommen werden können, wie zum Beispiel Zucker, Salze, Säuren, Alkohole und giftige Chemikalien (Scott, 2005). Die gustatorischen Rezeptoren (GR) werden von einer Klasse von Genen kodiert, die noch divergenter ist, als die olfaktorischen Rezeptoren. Manche haben untereinander weniger als 8% identische Aminosäuren (Robertson et al., 2003).

Zwei gut untersuchte GRs, *Gr5a* und *Gr66a*, werden in einer Vielzahl von sich nicht überschneidenden gustatorischen Rezeptor-Neuronen exprimiert. Innerhalb der Bereiche, in denen *Gr66a* exprimiert wird, kann in sich teilweise überschneidenden Unterbereichen eine Vielzahl anderer GRs gefunden werden (Dunipace et al., 2001; Wang et al., 2004b). Für *Gr5a* konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen sehr fein abgestimmten Trehalose-Rezeptor handelt (Dahanukar et al., 2001; Ueno et al., 2001). *Gr5a*-Mutanten reagieren nicht mehr auf Trehalose, die Reaktion auf Saccharose bleibt jedoch normal. Dies lässt vermuten, dass in diesen GRNs zusätzliche Saccharose-Rezeptoren gemeinsam mit dem Trehalose-Rezeptor exprimiert werden (Amrein und Thorne, 2005; Dahanukar et al., 2001).

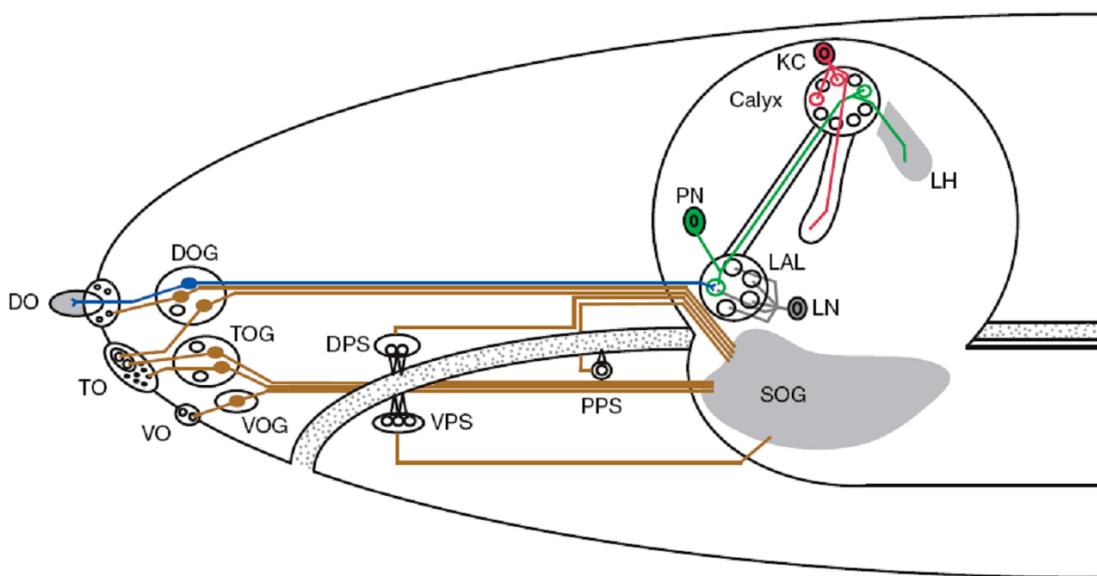


Abbildung 1.1: Neuroanatomie des chemosensorischen Systems der *Drosophila*-Larve. Von den drei externen chemosensorischen Organen beinhaltet das gemischte Dorsalorgan (DO) die olfaktorische „Kuppel“ (grau) und ein paar putative Geschmackssensillen (kleine Kreise). Das Terminalorgan (TO), das Ventralorgan (VO) und das dorsale, das ventrale und das posteriore Pharynx-Sinnesorgan (DPS, VPS, PPS) beinhalten hauptsächlich Geschmackssensillen. Die Zellkörper der sensorischen Neurone befinden sich in Ganglien unterhalb der Sinnesorgane (DOG, TOG, VOG). Einige Neurone, die das TO innervieren, befinden sich im DOG. Axone der olfaktorischen Rezeptor-Neurone (ORN, blau) innervieren einzelne Glomeruli der larvalen Antennalloben (LAL), welche über lokale Interneurone (LN) miteinander vernetzt sind. Projektionsneurone (PN, grün) verbinden die LAL mit zwei übergeordneten olfaktorischen Zentren, dem Calyx der Pilzkörper (engl.: mushroom body, MB) und dem lateralen Horn (LH). Afferente Nervenfasern von gustatorischen Rezeptor-Neuronen (GRN, braun) innervieren das suboesophageale Ganglion (SOG) über vier verschiedene Nerven. Der Pharynx ist gepunktet dargestellt. Die Abbildung wurde übernommen von Vosshall und Stocker (Vosshall und Stocker, 2007).

Tiere, in denen Gr66a-positive Neurone ausgeschaltet sind, vermeiden bittere Substanzen und hohe Salzkonzentrationen nicht mehr, während Tiere, bei denen Gr5a-positive Neurone fehlen, sich nicht mehr zu Zucker oder niedrigen Salzkonzentrationen hingezogen fühlen (Thorne et al., 2004; Wang et al., 2004b).

Überschneidungen des gustatorischen Systems mit dem olfaktorischen System sind ebenfalls bekannt. So werden zum Beispiel *Gr21a* und *Gr63a* in ORNs exprimiert, die auf Kohlenstoffdioxid (CO₂) reagieren (Benton et al., 2006; Faucher et al., 2006; Suh et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass *Gr21a* und *Gr63a* zusammen ausreichen, um die Empfindlichkeit für CO₂ zu induzieren, wenn diese beiden Rezeptoren ektopisch in Or22a-positiven ORNs exprimiert werden (Jones et al., 2007; Kwon et al., 2007).

Einige GRs sind eventuell Pheromon-Rezeptoren, die auf von Männchen und/oder Weibchen produzierte Hydrokarbone auf der Kuticula reagieren (Jallon, 1984). Der für Männchen spezifische Gr68a, wird im ersten Beinpaar exprimiert (Bray und Amrein, 2003). Obwohl bisher noch kein Ligand gefunden werden konnte, zeigen Verhaltensexperimente, dass GR68a-exprimierende Neurone -oder der Rezeptor selbst- für den normalen Ablauf des Paarungsverhaltens benötigt werden. Es wird vermutet, dass Gr32b aufgrund seiner engen Verwandtschaft zu Gr68a ähnliche Aufgaben übernehmen könnte.

1.3 Verarbeitung interner Signale: das innere Milieu

Die Entscheidung zwischen Fressen und Nicht-Fressen hängt nicht nur vom externen Nahrungsangebot ab, sondern auch vom Ernährungszustand des Organismus. So werden nicht nur äußere Reize wie Geschmack und Nährwert bewertet, sondern auch der Ernährungszustand des Körpers. Für die Erforschung der Signalkaskaden, die hierbei von Bedeutung sind, ist *Drosophila* ein hervorragender und bereits ausgiebig studierter Modellorganismus (Abb. 1.2).

Drosophila besitzt ein weniger komplexes Genom als Wirbeltiere und wenige Gene sind redundant. Zum Beispiel besitzen Fliegen lediglich einen einzigen Insulin-Rezeptor (dInR), der alle Funktionen vermittelt, die den Insulin-ähnlichen Peptiden in *Drosophila* (*Drosophila* insulin-like peptide, Dilps) bisher zugeordnet wurden. Die Zuckerkonzentration der Hämolymphe wird durch neurosekretorische Zellen aufrechterhalten, die sich im ZNS sowie in der Ringdrüse befinden und eine zweigeteilte „*Drosophila* Pankreas“ bilden. Diese Zellen sezernieren Insulin und adipokinetisches Hormon (AKH, das Glukagon der Insekten) in das offene Hämolympsystem (Brogiolo et al., 2001; Kim und Rulifson, 2004; Lee und Park,

generellen Verminderung des Wachstums während der larvalen Entwicklung führt (Colombani et al., 2003).

Letztendlich werden verschiedene komplexe Verhaltensweisen durch nahrungsabhängige Bedingungen hervorgerufen. Fressverhalten wird durch zwei sich überschneidende Kontrollen reguliert: das homöostatische und das hedonistische System (Saper et al., 2002). Die Homöostase-abhängige Regulierung des Fressverhaltens gewährleistet, dass die sich im Kreislauf befindende Menge an Nährstoffen detektiert wird, was wiederum direkten Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat. Durch Experimente an *Drosophila* und an Mäusen konnte erst 2006 gezeigt werden, dass ein TOR-abhängiger, molekularer Sensor für Aminosäuren in bestimmten Gehirnzellen existiert. Bei Mäusen befinden sich diese Zellen im Hypothalamus, während es sich bei *Drosophila* um neuroendokrine Zellen handelt. Diese Zellen detektieren Veränderungen der sich im Kreislauf befindenden Menge an Aminosäuren und regulieren daraufhin die Nahrungsaufnahme (Cota et al., 2006; Wu et al., 2005).

Von vorrangigem Interesse ist es, die neuronalen Netzwerke, die diese neuroendokrinen Signale verarbeiten und weiterleiten zu identifizieren, zu untersuchen und zu verstehen (Leopold und Perrimon, 2007).

1.4 Das Neuropeptid Hugin im ZNS von *Drosophila*

Um herauszufinden, welche Gene beim Fressverhalten beteiligt sind, wurden *Drosophila* Mutanten untersucht, die einen Defekt in der Nahrungsaufnahme zeigten. Eine dieser Fressmutanten hatte eine Mutation im *klumpfuss* (*klu*) Locus (Melcher und Pankratz, 2005). Das Gen kodiert für einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor und wird im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert. Obwohl die *klu*-Mutante keinen morphologischen Defekt aufweist, ist sie nicht in der Lage, die aufgenommene Nahrung vom Pharynx in den Oesophagus zu befördern. Außerdem zeigt sie ein verändertes Fressverhalten. Wenn Wildtyp-Larven auf Hefepaste gesetzt werden, verbringen sie einen Großteil des Larvalstadiums eingegraben in der Hefe. Im Gegensatz dazu bewegen sich Larven mit der *klu*-Mutation aktiv von der Futterquelle weg und verhungern. Durch Microarray-Analysen, die sich hauptsächlich auf das Expressionsprofil von Neuropeptiden konzentrierten, konnte gezeigt werden, dass *hugin* in den Mutanten eine erhöhte Expression aufweist. Die Synthese von Hugin ist auf das zentrale Nervensystem beschränkt.

1.4.1 Lage und Projektion der Hugin-Neurone

Bei den Hugin-Neuronen handelt es sich um 20 Zellen im SOG, welche das Neuropeptid Hugin exprimieren. *Hugin* kodiert für ein Prä-Propeptid, welches in mindestens zwei Peptide gespalten werden kann. Hugin- γ , eines der Peptide, zeigt Sequenzhomologie zu dem häutungs-modifizierenden Hormon ETH (ecdysis triggering hormone). Das zweite Peptid, PK-2 (*Drosophila melanogaster* Pyrokinin) scheint ein Pyrokinin mit myostimulatorischer Wirkung zu sein (Meng et al., 2002). Die Expression beginnt im späten Embryonalstadium und bleibt bis ins Adultstadium detektierbar. Ektopische Expression von *hugin* führt unter anderem zu Häutungsdefekten und Lethalität (Meng et al., 2002).

Die Konnektivität der Hugin-Neurone in der *Drosophila*-Larve wie auch im adulten Tier konnte bereits beschrieben werden. Neuriten der Hugin-Neurone innervieren vier Zielregionen: Die Ringdrüse (Neuroendokrines Organ), den Pharynx (Nahrungsaufnahme), das Protocerebrum (höheres Gehirnzentrum) und das ventrale Nervensystem (Abb. 1.2 B,C). Des Weiteren haben die Hugin-Zellen feine Verästelungen seitlich des oesophagealen Foramens. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Hugin-Neurone in erwachsenen Fliegen ähnlich organisiert sind wie in der Larve (Abb. 1.2 E,F) (Melcher und Pankratz, 2005).

1.4.2 Funktion der Hugin-Neurone beim Fressverhalten

Die Funktion der Hugin-Neurone wurde durch Verhaltensexperimente an erwachsenen Fliegen untersucht, bei denen die synaptische Aktivität der Hugin-Zellen durch die Expression von Tetanus-Toxin blockiert wurde (Melcher und Pankratz, 2005). Wenn diese Fliegen auf eine Futterquelle gesetzt werden, die sie in der davor liegenden Zeit nicht testen konnten, zeigen sie eine frühere Initiierung der Nahrungsaufnahme. Die Kontrollfliegen beginnen nicht sofort mit der Nahrungsaufnahme, sondern scheinen die verschiedenen Nahrungsquellen der Umgebung zunächst zu evaluieren, vermutlich um den Nährwert einschätzen zu können, oder um toxische Substanzen zu vermeiden. Dieses Verhalten ist bei Fliegen, bei denen die synaptische Aktivität der Hugin-Zellen blockiert wurde, nicht zu beobachten. Somit zeigen diese Fliegen ein ähnliches Verhalten wie Kontroll-Fliegen, die zuvor gehungert wurden.

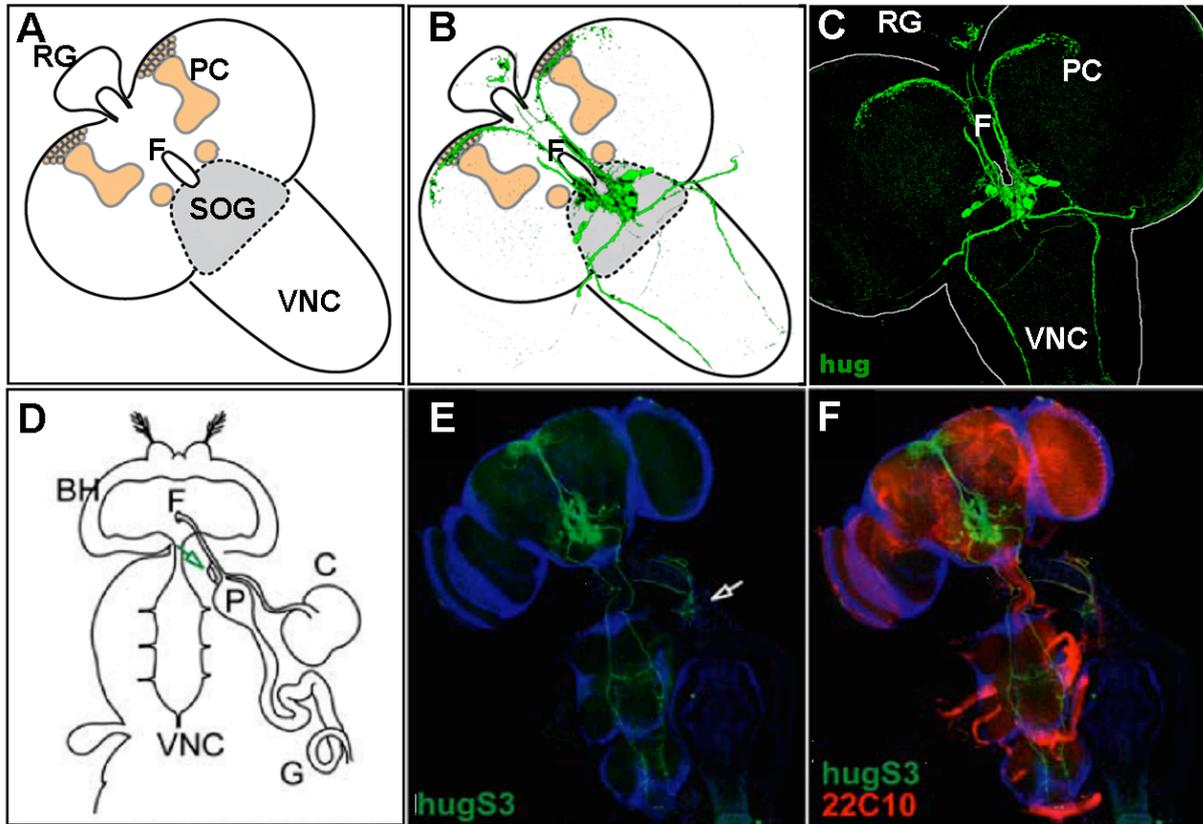


Abbildung 1.3: Lage und Projektion der Hugin-Neurone in Larven und adulten Fruchtfliegen. **A:** Schematische Darstellung des ZNS einer *Drosophila*-Larve. RG: Ringdrüse; PC: Protocerebrum; F: Foramen; SOG: Suboesophageales Ganglion, VNC: Ventrales Nervensystem (engl. ventral nerve cord). Die orange unterlegten Gebiete markieren die Pilzkörper und die Antennalloben (seitlich des Foramens). **B:** Überlagerung des Projektionsmusters der Hugin-Zellen aus C mit dem Schema aus A. **C:** ZNS einer Larve, die GFP (Green-Fluorescent-Protein, grün) unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors exprimiert. **D:** Schematische Darstellung des ZNS einer adulten Fruchtfliege. BH: Gehirnhemisphäre (engl.: brain hemisphere); C: Kropf (engl.: crop); P: Proventrikulus; G: Darm (engl.: gut). Der neuroendokrine Teil (Corpora cardiaca (CC)/ Corpora allata (CA)) befindet sich über dem Proventrikulus (grüner Pfeil). **E,F:** Lage der Hugin-Neurone und Projektionen der Neuriten im ZNS einer adulten Fruchtfliege. *hugS3* ist die Bezeichnung der benutzten *hugin*-Promotor-Linie, 22C10 ist ein Neuropilmarker. Projektionen zum Protocerebrum, zum ventralen Nervensystem und zur CC/CA (Pfeil) sind zu sehen. D-F wurde übernommen von Melcher und Pankratz (Melcher und Pankratz, 2005).

Die Konnektivität der Hugin-Neurone und das Verhalten von *Drosophila* bei veränderter Expressionsstärke von *hugin* sind in Abbildung 1.4 dargestellt. Die Hugin-Zellen fungieren als Relais, welches die gustatorischen Informationen aus den externen und internen Geschmackssinnesorganen aufnimmt. Diese werden in den Hugin-Zellen verschaltet und zu den Zielregionen weitergeleitet.

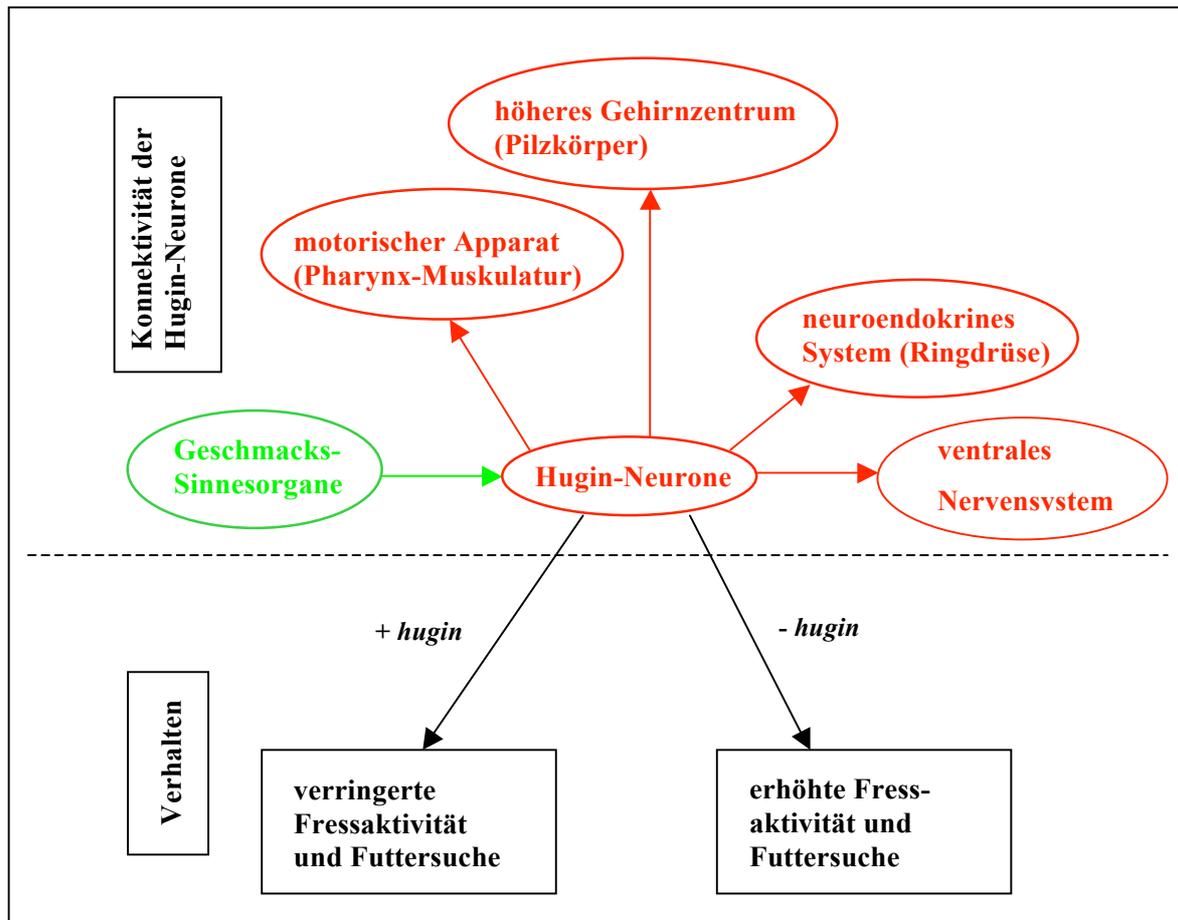


Abbildung 1.4: Modell von Hugin als Modulator für Fressverhalten.

Die Hugin-Neurone, die das Neuropeptid Hugin exprimieren und die Geschmackssinneszellen über das SOG mit der Pharynxmuskulatur, der Ringdrüse, den Pilzkörpern und dem ventralen Nervensystem verbinden, modulieren chemosensorisch abhängiges Verhalten. Erhöhte *hugin* Expression verursacht eine verringerte Fressaktivität und Futtersuche, während verringerte *hugin* Expression zu einer erhöhten Fressaktivität und zu erhöhter Futtersuche führt. Quelle: (Melcher und Pankratz, 2005).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Morphologie des neuronalen Hugin-Schaltkreises genauer zu untersuchen. Hierbei werden vor allem optische Methoden, wie histochemische oder Immunfluoreszenz-Färbungen angewendet. Von Interesse ist nicht nur die Polarität der Hugin-Neurone und die genaue Untersuchung der Morphologie einzelner Hugin-Zellen, sondern auch die Integration des Hugin-Schaltkreises in das gustatorische System. Zudem soll die Verknüpfung und die Interaktion der Hugin-Zellen mit anderen neuronalen Schaltkreisen untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Punkt dieser Arbeit ist die Identifizierung von homologen Peptiden in anderen Insekten und in Säugetieren. Außerdem soll gezeigt werden, inwiefern die Morphologie des Hugin-Schaltkreises in anderen Insekten konserviert ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Konzentration	Wirt	Bezugsquelle
α -22C10	unbekannt, neuropil-spez.	1:500	Maus	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
α -CD2	CD2 aus Ratte	1:100	Maus	Serotec GmbH, Düsseldorf
α -ChAT	<i>Drosophila</i> Choline acetyltransferase	1:500	Maus	DSHB
α -Dig	Digoxigenin	1:500	Schaf	Roche, Mannheim
α -Dig-AP	Digoxigenin	1:500	Schaf	Roche, Mannheim
α -dilp2 (HA)	Dilp2 (β -Kette)	1:500	Kaninchen	E. Hafen
α -dilp2 (Ru)	Dilp2 α -, β - und γ -Kette)	1:500	Kaninchen	E. Rulifson
α -elav	<i>Drosophila</i> elav	1:500	Ratte	DSHB
α -GFP-m	rek. GFP	1:500	Maus	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
α -GFP-rb	rek. GFP	1:1000	Kaninchen	Abcam, Cambridge
α -hug-gp	<i>Drosophila</i> hugin- γ ohne PRL	1:200	Meerschweinchen	Seqlab, Göttingen
α -hug-rb	<i>Drosophila</i> hugin- γ mit PRL	1:500	Kaninchen	Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim
α -Imp-L2	<i>Drosophila</i> Imp-L2	1:1000	Ratte	E. Hafen
α -InR	Menschlicher Insulin-Rezeptor (Tyr1146)	1:200	Kaninchen	Cell-Signalling-Technology,
α -nc82	Bruchpilot	1:50	Maus	A. Hofbauer

Material und Methoden

α -PBAN	<i>Manduca</i> PBAN	1:2000	Kaninchen	P. Ma und W. Roelofs
α -PK-2-rb	<i>Drosophila</i> PK-2	1:500	Kaninchen	Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim
α -gp-Cy5	Meerschweinchen	1:200	Ziege	JacksonLab, USA
α -m-Alexa488	Maus	1:200	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
α -m-Cy3	Maus	1:200	Ziege	JacksonLab, USA
α -m-Cy5	Maus	1:200	Ziege	JacksonLab, USA
α -rat-Cy3	Ratte	1:200	Ziege	JacksonLab, USA
α -rb-Cy2	Kaninchen	1:200	Ziege	JacksonLab, USA
α -rb-Cy3	Kaninchen	1:200	Ziege	JacksonLab, USA
α -rb-Cy5	Kaninchen	1:200	Ziege	JacksonLab, USA
α -rb-Alexa488	Kaninchen	1:200	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
α -rb-Alexa546	Kaninchen	1:200	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Enzyme

Name	Abkürzung	Quelle
Calf Intestine Phosphatase	CIP	NEB Frankfurt
Desoxyribonuklease	DNaseI	Promega, Mannheim
Lysozym		Roche, Mannheim
Proteinase K		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Restriktionsendonukleasen		Promega, Mannheim Gibco BRL – Lifetechnologies, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase		Gibco BRL – Lifetechnologies, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Taq	Gibco BRL – Lifetechnologies, Karlsruhe

2.1.3 Fliegenlinien

Linienbezeichnung	Genotyp	Liniennummer/ Bezugsquelle
dilp2-Gal4	w;dilp2/CyO; ;	E. Rulifson
Fruitless	w;UAS-CD8-GFP;fru p1-Gal4/MKRS	B. Baker

Material und Methoden

Gr5a-Gal4	w;Gr5a/CyO;Gr5a/Tm2	GR5a/ K.Scott
Gr21a-Gal4	Gr21D1;CyO/B;Tm2/Tm6b	Gr21D1/ K. Scott
Gr28a-Gal4	w;Gr28A3/CyO;Tm2/Tm6b	Gr28A3/ K.Scott
Gr28b.b-Gal4	w; ;Gr28b.b	SF40B9/ H. Amrein
Gr32b-Gal4	w;Gr28A3/CyO;Tm2/Tm6b	Gr32D1/ K. Scott
Gr47a-Gal4	w;Gr47A1/CyO;Tm2/Tm6b	Gr47A1/ K. Scott
Gr66a-Gal4	w;Gr66a/CyO;Tm2/Tm6b	Gr66C1/ K. Scott
hugS3-Gal4	w; ; pCaSpeR {w[+mC]=GAL4-hugS}	eigene Linie
hug-YFP	w; pCaSpeR {w[+mC]=YFP-hugS} (nicht lokalisiert)	eigene Linie
InsP3-Gal4	w; ; pCaSpeR {w[+mC]=GAL4-InsP3}	eigene Linie
tGPH	w;en-Gal4;tGPH/Tm3	B. A. Edgar
UAS-eYFP	Y,w; P {w[+mC]=UAS-2xEYFP} AH3	6660/ Bloomington
UAS-Flp-out	y,w,hsFLP;Sp/CyO;UAS>CD2y+>CD8-GFP	M583/ B. Dickson
UAS-Dscam17.1-GFP	nicht bekannt	Dscam17.1/ T. Lee
UAS-InR (II)	nicht bekannt	UAS-dinr ^{wt} / E. Hafen
UAS-mCD8-GFP	P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}LL4,y,w; Pin[Yt]/CyO	5136/ Bloomington
UAS-Rab5-GFP	Y,w;P {w[+mC]=UASp-YFP.Rab5}Pde8[08b]	9775/ Bloomington
UAS-Rab5-DN-GFP	Y,w[*];P {w[+mC]=UASp-YFP.Rab5.S43N}01	9771/ Bloomington
Wildtyp	Oregon RS	4269/ Bloomington

2.1.4 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Binokular	Leica MS5	Leica, Göttingen
Brutschränke mit Schüttler	HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Digital-Kamera	AxioCam	C. Zeiss, Jena
Durchlicht-Mikroskop	Axioskop	C. Zeiss, Jena
Fluoreszenz-Binokular	Leica MZ8+GFP	Leica, Göttingen
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss LSM 510 META	C. Zeiss, Jena
Heizblock	ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg
Heizblock mit Schüttler	ThermoMixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Netzgerät	für 200/2.0	BioRad, Hercules,

Material und Methoden

Elektrophorese		Kalifornien, USA
Netzgerät für Elektrophorese	E844	Consort
Pipetten	Pipetman	Gilson (Deutschland), Langenfeld
Schwenktisch	Polymax 2040	Heidolph, Nürnberg
Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ-Research	Biozym, Oldendorf
Tischzentrifuge	Biofuge A	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Gel Dokumentations System	E.A.S.Y Win32	Heraeus, Hanau
UV-Leuchttisch	Transilluminator TR-302	Spectroline, New York, USA
Vakuum-Zentrifuge	Speed Vac Concentrator, Savant	Bachofer, Reutlingen
Vakuum-Zentrifuge	Speed Vac SC 110, Savant	Bachofer, Reutlingen
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad		Köttermann, Hänigsen
Wasserbad	HAAKE E2	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge	Avanti J-20	Beckman, Fullerton, Kalifornien, USA
Zentrifuge	Centricon H401	Kontron Hermle, München
Zentrifuge	Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

2.1.5 Kits

Name	Bezugsquelle
Dig (Fluo/Bio) RNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
Dig (Fluo/Bio) Detection Kit	Roche, Mannheim
NucleoSpin [®] Extract 2 in 1 Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin [®] RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin [®] RNA L Kit	Macherey-Nagel, Düren
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

QuikHyb [®] Hybridization Solution	Stratagene, Heidelberg
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.1.6 Primer

Gen	Primersequenz
<i>dilp2</i> (CG8167)	Sinn: CAC ATG GTT GGT TTG GAA C Gegensinn: CAA GCC TTT GTC CTT CAT C

2.1.7 Puffer und Medien

Name	Zusammensetzung
Antikörper-Puffer	150 mM NaCl, 20 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
AP-Puffer (alkalische Phosphatase Puffer)	100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris 9.5, 0,1 % (v/v) Tween20, 1 mM Levamisol
Bindungspuffer	50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM KCl, 5 mM DTT, 50 µM ZnSO ₄ , 1 % (v/v) Triton X-100
Blockierungs-Lösung	4 % (w/v) Magermilchpulver, 0,5 % (v/v) Tween20 in PBS-T
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
DNA-Ladepuffer (10 x)	25 % (w/v) Ficoll 400, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylen Cyanol FF
Fliegenfutter (1,5 l)	1,33 l H ₂ O, 16,5 g Bierhefe, 81,5 g Maismehl, 8 g Fadenagar, 100 ml Zuckerrübensirup, 200 ml 10% Nipagin (in 100 % Ethanol gelöst)
Hybe	50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC, 200 µg/ml ssDNA, 100 µg/ml tRNA, 25 µg/ml Heparin, pH 5,0
Hybe-B	50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC
Hybridisierungspuffer	6 x SSC, 0,5 % (w/v) SDS, 100 µg/ml ssDNA
Hybridisierungswaschlösung	0,2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium
LB-Medium (Luria Bertani Medium)	171 mM NaCl, 1 % (w/v) Pepton 140, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
MESAB	40 mg 3-aminobenzoensäure-ethylester, 100mg Na ₂ HPO ₄ , 10 ml H ₂ O
Mowiol-Einbettmedium (50ml)	12 ml Glycerin, 4,8 g Mowiol40-88, 12 ml H ₂ O, 24 ml 200 mM Tris pH 8,5
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 8,0

Material und Methoden

PBS-T (10 x)	5 l H ₂ O, 151,4 g Tris, 450 g NaCl, pH 8,1
0,1 PBT	0,1 % (v/v) TritonX100 in PBS
0,5 PBT	0,5 % (v/v) TritonX100 in PBS
PBT	0,1 % (v/v) Tween20 in PBS
Ringer	182 mM KCl, 46mM NaCl, 3 mM CaCl ₂ , 10mM Tris
SSC (20 x)	3 M NaCl, 300 mM Na ₃ Citrat, pH 7,0
TBE (5 x)	445 mM Tris-Base, 520 mM H ₃ BO ₃ , 10 mM EDTA, pH 8,2
TE-Puffer	10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA
TELT-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4 % (v/v) Triton X-100
Topagar	0,7 % (w/v) Agar in LB-Medium

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Name	Abkürzung	Bezugsquelle
β-Mercaptoethanol		Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	MOPS	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid	X-Gal	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat	X-Phos	Roth, Karlsruhe
Aceton		Roth, Karlsruhe
Agar		Difco Laboratories, Augsburg
Agarose		PeqLab, Erlangen
Alanin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Ammoniumperoxydisulfat	APS	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Ampicillin	Amp	Roth, Karlsruhe
Azaserin-Hypoxanthin 50x		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Bacto Trypton, Select Pepton		Difco, Detroit, Michigan, USA
Bakterienplatten		Greiner, Frickenhausen
Bierhefe		Brecht, Eggenstein
Blaukappengefäße (15 ml und 50 ml)		Greiner, Frickenhausen

Material und Methoden

Borsäure	H ₃ BO ₃	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau		Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Desoxyadenosintriphosphat	dATP	Promega, Mannheim
Desoxycytosintriphosphat	dCTP	Promega, Mannheim
Desoxyguanosintriphosphat	dGTP	Promega, Mannheim
Desoxythymidintriphosphat	dTTP	Promega, Mannheim
Dinatriumphosphat	Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol; Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol; Cleland's Reagenz	DTT	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
DNA-Längenmarker, 1 kb-Leiter		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
DNA-Längenmarker, 100 bp-Leiter		PeqLab, Erlangen
EGTA		Roth, Karlsruhe
Essigsäure, 100%, p.A.		Merck, Darmstadt
Ethanol, p.A.		Roth, Karlsruhe
Ethanol, technisch		Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	EtBr	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure, Titrierkomplex 3	EDTA	Roth, Karlsruhe
Fadenagar		Brecht, Eggenstein
Ficoll 400		Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	FCS	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Formaldehyd 37 %	FA	Merck, Darmstadt
Formamid		Roth, Karlsruhe
Frischhefe		Fala, Straßburg, Frankreich
Gel Blotting Papier (GB002)		Schleicher&Schuell, Dassel
Glucose		Roth, Karlsruhe
Glycerol, Glycerin		Roth, Karlsruhe
Glycin		Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Hefe-Extrakt		Gibco Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe	BRL
Heparin		Gibco Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe	BRL
HEPES		Roth, Karlsruhe	
Hering-Sperma Einzelstrang-DNS	ssDNS	Roche, Mannheim	
Hybridisierungsröhren		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien	
Immobilon-P Transfer Membranen		Millipore, Eschbronn	
Isoamylalkohol		Roth, Karlsruhe	
Isopropanol, 2-Propanol		Merck, Darmstadt	
Kaliumchlorid	KCl	Roth, Karlsruhe	
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe	
Kanada Balsam		Serva, Heidelberg	
Kanamycin A Monosulfat	Km	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA	
Karminsäure		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA	
Klorix (Hypochloridlösung)		Colgate-Palmolive, Heidelberg	
Levamisol		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA	
Litiumchlorid	LiCl	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA	
Lysin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA	
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Roth, Karlsruhe	
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	Roth, Karlsruhe	
Maismehl		Friedrichstal Mühle, Stutensee	
Methanol		Roth, Karlsruhe	
Mikrozentrifugenreaktionsgefäße (1,6; 2,0 ml)		Eppendorff, Hamburg	
Mowiol40-88 (Polyvinylalkohol)		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA	

Material und Methoden

Natriumacetat, p.A.	NaAc	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	NaCO ₃	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat		Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat, p.A.	SDS	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.A	NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat		Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Na ₂ S ₂ O ₃	Roth, Karlsruhe
n-Heptan		Merck, Darmstadt
Nipagin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Nitro Blau Tetrazoliumchlorid	NBT	Roche, Mannheim
Oligo-d(T) ₁₂₋₁₈		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Oligonukleotide		MWG-Biotech, Ebersberg
OPI Medienzusatz		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
P81-Filterpapier		Schleicher&Schuell, Dassel
Phenol		Roth, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung	PBS	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Polyethylenglykol	PEG	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Prolin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Protein G Agarose		Dianova, Hamburg
PS-Röhrchen mit Ceaprenstopfen		Greiner, Frickenhausen
Rinderserum-Albumin	BSA	NEB, Frankfurt
RPMI-1640-Kulturmedium		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Saccharose		Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37%, p.A.	HCl	Merck, Darmstadt
Sarcosyl, L-Lauroyl-Sarcosin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

Serin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Texas Red SP6/T7 <i>Primer</i>		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Thioglycolsäure		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Triton X-100		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Roth, Karlsruhe
tRNA		Roche, Mannheim
Tween20		Roth, Karlsruhe
Zellkulturartikel		Greiner, Frickenhausen
Ziegenserum	ZS	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Zinksulfat	ZnSO ₄	Roth, Karlsruhe
Zuckerrübensirup		Grafschafter, Meckenheim

2.2 Methoden

2.2.1 Fliegenhaltung

Die Fliegenhaltung erfolgte bei 18°C bzw. 25°C auf Standard-Fliegenfutter in PS-Röhrchen. Mindestens alle vier Wochen wurden die verschiedenen Linien auf neues Futter umgesetzt.

2.2.2 Flp-out Technik

Fliegen, die den *hugS3*-Promotor besitzen, wurden mit Fliegen gekreuzt, die das Flp-out-Konstrukt beherbergen [*y w hsFLP;Sp/CyO;UAS>CD2+>CD8-GFP*]. Nach der Sammlung der Eier für 24 Stunden wurden diese einem zwei Stunden andauernden Hitzeschock bei 37° C ausgesetzt. Die Larven-Gehirne wurden während des späten dritten Larven-Stadiums präpariert. Diese Vorgehensweise ergab eine Vielzahl Gehirne, bei denen unterschiedliche

Flp-out Ereignisse im Hinblick auf Zellzahlen pro Gehirn stattfanden. Die folgende Anzahl unterschiedlicher, unabhängiger Proben wurden gescannt: Protocerebrum: 14; Ringdrüse: 10; Pharynx: 7; Ventrales Nervensystem: 4.

2.2.3 Histochemische und Fluoreszenzfärbungen

Alle ausgearbeiteten Färbeprotokolle orientierten sich im Wesentlichen an den Standard-Protokollen für X-Gal-Färbungen und Antikörper-Färbungen, nicht-radioaktiven InSitu-Hybridisierungen, sowie an den Hersteller-Angaben für die auf dem Tyramid[®]-System (Perkin-Elmer) basierenden Fluoreszenz-InSitu-Hybridisierungen. Histochemische InSitu-Hybridisierungen und X-Gal-Färbungen wurden nach Eindeckeln in Canada-Balsam oder Mowiol im Durchlicht-Mikroskop mit einer Digital-Kamera (Axiocam, Zeiss) oder mit dem Zeiss LSM 510 im Durchlicht-Modus (wobei hier blaues, grünes und rotes Laserlicht zu „+/- Weißlicht“ gemischt wurde) ausgewertet. Fluoreszenz-Färbungen wurden generell nach Eindeckeln und mehrtägiger Inkubation in Mowiol mit dem Zeiss LSM 510 im *multi track*-Modus ausgewertet. 2-Photonen Aufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP2 Mikroskop aufgenommen. Für die Aufnahmen wurden die Larven in gekühlter MESAB-Lösung anästhesiert.

2.2.4 Markierung von InSitu-Sonden

Die Markierung von InSitu-Sonden wurde nach Hersteller-Angaben (*Dig/Fluo/Bio RNA labeling Kit, Roche*) durchgeführt. Nach Klonierung der cDNA des interessierenden Gens in den pCRII TOPO[®]-Vektor und Maxipräparation wurden 10 µg Plasmid-DNA linearisiert, um nach Aufreinigung als *Template* für die RNA-Synthese zu dienen. Bei der Synthese der markierten RNA wurden unter Verwendung von SP6- bzw. T7-Primern (für *sense*- und *antisense*-Sonden) der entsprechenden Polymerase Nukleotide angeboten, welche mit Digoxigenin, Fluoreszein oder Biotin als Antigen markiert waren. Die Sonden-RNA wurde nach Aufreinigung (*NucleoSpin[®] RNA II Kit, Macherey-Nagel*) in *Hybe*-Lösung bei -20°C gelagert. In Abwandlung des Original-Protokolls wurden teilweise auch PCR-Produkte als *Template* für die RNA-Synthese verwendet. In diesen Fällen wurden PCR-Primer verwendet, welche die SP6-/T7-Bindestellen des pCRII TOPO[®]-Vektors beinhalten. Als *Template* dieser PCR's dienten in pCRII TOPO[®]-Vektor klonierte cDNAs.

2.2.5 Histochemische InSitu-Hybridisierung

Für InSitu-Hybridisierungen wurden Gehirne in *Drosophila*-Ringer präpariert und für 1-2 Std bei RT in 0,5 PBT+4% FA fixiert. Anschließend erfolgte bei RT ein einstündiger Waschschrift in 0,5 PBT sowie schrittweise Überführung (je 5 min 30% / 70% / 100%) in Methanol. Die besten Färberesultate wurden generell erzielt, wenn präparierte Gehirne vor der eigentlichen Hybridisierung über Nacht bei -20°C in MeOH gelagert wurden. Danach wurden die Gehirne schrittweise (je 5 min 70% / 30%) in 0,5 PBT zurück überführt und ausgiebig gewaschen (15 min/ 15 min/ 30 min/ 30 min/ 60 min in 0,5 PBT). Anschließend erfolgte schrittweise Überführung in die Hybridisierungslösung Hybe (je 5 min 1:1 PBT + *HybeB* / *HybeB* / 1:1 *HybeB* + *Hybe*), dafür wurden auf 65°C vorgewärmte Lösungen verwendet. In *Hybe* erfolgte bei 65°C (im Wasserbad) eine ein- bis mehrstündige Prähybridisierung. Nach Abnehmen eines Großteils des *Hybe* wurden entsprechende Mengen (1-5 μl je nach *labeling*-Effizienz) der antisense-RNA-Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C im Wasserbad über Nacht. Nach einem kurzen Waschschrift in *Hybe* erfolgte in frischer *Hybe*-Lösung ein einstündiger Posthybridisierungsschritt, anschließend wurde schrittweise in 0,5 PBT überführt (je 5 min 1:1 *HybeB* + *Hybe* / *HybeB* / 1:1 PBT + *HybeB*). Daran anschließend erfolgte wieder ausgiebiges Waschen in 0,5 PBT für 15/15/30/30/60 min. Nach einem 30-minütigen Blockierungsschritt in 0,5 PBT+5% Ziegen Serum (ZS) erfolgte in 0,5 PBT+5% ZS die Antikörper-Detektion (mit dem entsprechenden AP (Alkalische Phosphatase)-gekoppelten Antikörper). Vor der eigentlichen Färbung erfolgten Waschschriffe in 0,1 PBT für 15/15/30/30 min sowie eine Präinkubation in AP-Puffer für 10 Minuten. Die Färbung erfolgte dann bei RT im Dunkeln mit jeweils 3,5 μl X-Phos sowie 4,5 μl NBT pro ml AP-Puffer, wobei die Verwendung von Glasblockschälchen eine Kontrolle der Farbreaktion bis zur gewünschten Intensität ermöglichte. Bei schwacher Expression des Gens wurde über Nacht bei 4°C gefärbt. Dann wurde 2 ml AP-Puffer pro Ansatz benutzt und 5 μl X-Phos. Nach Abstoppen der Reaktion durch Abnehmen der Färbelösung sowie Waschen in 0,5 PBT für 5/5/15/15 min erfolgte schrittweises Entwässern über eine Ethanolreihe (je 5 min 30% / 70% / 100% EtOH) und anschließendes Eindeckeln in Canada-Balsam.

2.2.6 Fluoreszenz-Proteindetektion

Auch hier wurden *Drosophila*-Gehirne / Bienen-Gehirne in Ringer präpariert und anschließend in 0,5 PBT +4% FA für 1-2 Std fixiert. Für den $\alpha\text{-nc82}$ Antikörper wurde die

Fixierung auf 30 min reduziert. Nach einigen Waschschritten in 0,5 PBT (für 15/15/30/30 min) erfolgte auch hier schrittweise Überführung (je 5 min 30% / 70% / 100%) in Methanol sowie MeOH-Inkubation über Nacht bei -20°C . Die Überführung in MeOH wurde bei der Verwendung des α -nc82 Antikörpers übersprungen. Anschließend wurde schrittweise (je 5 min 70% / 30%) in 0,5 PBT zurück überführt und ausgiebig (15/15/30/30/60 min) in 0,5 PBT gewaschen. Nach einem 30-60 min Blockierungsschritt in 0,5 PBT+5% ZS erfolgte über Nacht bei 4°C Inkubation mit den gewünschten Antikörpern (entsprechend verdünnt in 0,5 PBT+5% ZS, siehe 2.1.1 Antikörper). Nach anschließendem Waschen in 0,1 PBT für 15/15/30/30/60 min und weiteren 30 min Blockieren in 0,1 PBT+5% ZS erfolgte bei RT im Dunkeln für 90 min die Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörpern gegen die verwendeten Primär-Antikörper (α -Bungarotoxin wurde wie ein Sekundär-Antikörper verwendet). Nach abschließendem Waschen in 0,1 PBT für 15/15/30 min erfolgte Eindeckeln in Mowiol.

2.2.7 Bakterien-Transformation

Um kompetente Bakterien herzustellen, wurden 2 ml einer Über-Nacht-Kultur des gewünschten *E.coli*-Stammes zu 200 ml LB-Medium gegeben und bis $\text{OD}_{600}=0,5$ inkubiert (Schüttler, 37°C). Dann wurden je 100 ml Bakterien 10 min bei 800xg und 4°C zentrifugiert und das Bakterienpellet auf Eis vorsichtig in je 25 ml steril filtrierter, auf 4°C vorgekühlter 0,1 M CaCl_2 -Lösung (frisch angesetzt) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (10 min, 4°C , 800xg), das Bakteriensediment auf Eis mit je 6 ml 0,1 M CaCl_2 -Lösung (vorbehandelt wie oben) resuspendiert und mit je 1,5 ml Glycerin versehen und vorsichtig gemischt. Diese Bakterien wurden entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder in vorgekühlte Gefäße aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für eine Transformation wurde pro Volumen Plasmid-DNA (5–10 ng/ μl) das 20- bis 40-fache Volumen an kompetenten Bakterien verwendet. Plasmid und Bakterien wurden 20 min auf Eis inkubiert, 2 min einem 42°C Hitzeschock unterzogen und erneut auf Eis gestellt. Um je nach Bedarf eine Resistenz gegen Antibiotika zu entwickeln, wurden die transformierten Bakterien in 2 bis 4-fachem Volumen LB-Medium 30 bis 60 min bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert, bevor sie auf LB-Agar (inklusive 100 mg/ml Ampicillin sowie bestrichen mit 4% XGal) ausgestrichen wurden. Nach dem Trocknen der Bakteriensuspension wurden die Platten mit der Oberseite nach unten bei 37°C 12 bis 24 h inkubiert. Die Klonierung von PCR-Produkten (mit *Taq* Polymerase)

erfolgte mit dem *TOPO TA Cloning*[®] Kit nach Herstellerangaben (*TOPO TA Cloning*[®] Version N: *TOPO*[®] Cloning Reaction and Transformation).

2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde je nach benötigter Reinheit durch Mini-Präparation (TELT-Methode) oder Maxi-Präparation (*Qiagen Plasmid Maxi Kit*) aus Bakterien isoliert. Für die erste Überprüfung von Bakterienklonen nach Transformationen oder Ligationen wurde eine Mini-Präparation (Minipräp) durchgeführt. Die gewünschten Bakterienkolonien wurden in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum (Ampicillin 100 mg/ml oder/und Kanamycin 10 mg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von dieser Über-Nacht-Kultur wurden 1,6 ml in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt und 30 sek bei 10000xg pelletiert. Das Bakterien-Pellet wurde mit 200 µl TELT-Puffer und 20 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in TE) versetzt und durch vortexen resuspendiert. Dann wurde die Lösung 3 min bei 96°C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Die Reste aus Proteinen, Zellwand und genomischer DNA wurden durch Zentrifugation (8 min, 10000xg) pelletiert. Der Überstand wurde anschließend mit 100 µl Isopropanol versetzt, gevortext und dadurch die Plasmid-DNA ausgefällt. Nach 5 min Zentrifugation (10000xg) konnte das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und getrocknet werden. Die Plasmid-DNA wurde dann in 50 µl 10 mM Tris (pH 8,0) gelöst. 5 bis 10 µl dieser Minipräp-DNA konnten für Restriktionsverdau verwendet werden. Positive Klone wurden erneut selektiv ausplattiert (aus der 3 ml Über-Nacht-Kultur) und bei 37°C über Nacht inkubiert. Wurden für spezielle Applikationen (z.B. Injektion oder Sequenzierung) größere Mengen oder höhere Reinheit der Plasmid-DNA benötigt, so wurden Maxi-Präparationen mit dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* durchgeführt. Aus 200 ml Bakterienkulturen, die in selektivem LB-Medium mit dem gewünschten Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt worden waren, erfolgte die Plasmid-DNA-Isolierung nach Herstellerangaben (*QIAGEN Plasmid Purification Hand-book: Qiagen Maxi Protocol*).

2.2.9 Restriktionsverdau und Ligation

Für den Verdau von 1 µg DNA wurden abhängig vom jeweiligen Enzym fünf bis 20 Enzymeinheiten (Units, eine Unit entspricht der Enzymmenge, die in einer Stunde 1 µg

DNA des Phagen Lambda bei optimaler Temperatur- und Pufferbedingung vollständig verdaut) verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das Zwanzigfache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung und die Inkubationszeit ein bis zwei Stunden bei optimaler Reaktionstemperatur und idealen Pufferbedingungen (eingestellt mit dem Puffersystem des jeweiligen Anbieters). Bei Plasmid-DNA aus Minipräps wurde nach der Fraktionierung der Verdaureaktion 1 µg/µl RNaseA zugesetzt, wenn das Insert kleiner als 700 bp war. Nach Zugabe von DNA-Ladepuffer wurde der Verdauansatz zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente in einem DNA-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem *NucleoSpin[®] Extract 2 in 1* Kit nach Herstellerangaben (*Protocol for DNA extraction from agarose gels*). Die Extraktions-Effizienz und Konzentration der Eluate wurden danach auf einem DNA-Agarosegel überprüft. Dem Verdau eines Vektors folgte immer eine 5'-Dephosphorylierung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) oder *Calf intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP), um die Religation des Vektors zu verhindern. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde mit 1 U Phosphatase pro µg Vektor bei idealen Pufferbedingungen (Herstellerangaben) angesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C für 20 min inaktiviert und danach die Vektor-DNA gefällt. Dafür wurde die Lösung mit NaAc (300 mM NaAc, pH 6,0) und mit dem 1,5-fachen Volumen an 100%-igem Ethanol versetzt, gemischt und zentrifugiert (10000xg). Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in ddH₂O gelöst. Insertfragmente wurden nach dem Verdau in einem Agarosegel gereinigt und danach extrahiert. Vor der Ligation wurde die Konzentration der gefällten Vektor-DNA und der Insert-DNA auf einem Agarosegel verglichen. Für die Ligation wurde ein drei- bis fünffacher molarer Überschuss des zu inserierenden DNA-Fragments zum entsprechend vorbereiteten Vektor gegeben. Mit 400 U T4 DNA-Ligase wurde in einem Endvolumen von 20 µl 1 x T4 DNA-Ligase-Puffer entweder über Nacht bei 18°C oder 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnten erneut kompetente Bakterien transformiert werden.

2.2.10 RNA-Isolation

Je nach benötigter Menge wurde Gesamt-RNA mit dem *NucleoSpin[®] RNA II Kit* (bis zu 70 mg Gewebe) oder dem *NucleoSpin[®] RNA L Kit* (bis zu 200 mg Gewebe) von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben (*Standard protocol for isolation of total RNA*) isoliert. Die entsprechende Menge Adulte oder Larven wurde vor der Homogenisierung in

Zellkulturnetzen gewaschen und in den Lysis-Puffer (im Kit enthalten) überführt. Die Homogenisierung erfolgte mit einem elektro-mechanischen Homogenisator. Zur Verbesserung der Lyse wurden die homogenisierten Proben vor der RNA-Isolierung 30 bis 60 min bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt. Die Menge an isolierter Gesamt-RNS wurde spektralphotometrisch ermittelt (BioPhotometer) und die Qualität mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die so gewonnene Gesamt-RNA wurde für Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCRs) oder Microarray-Experimente (durchgeführt von Affymetrix®, Rostock) verwendet oder bei -80°C gelagert.

2.2.11 PCR und RT-PCR

Abschnitte von genomischer oder *Drosophila*-cDNA wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) isoliert und amplifiziert. Pro Ansatz wurden in 50 μl Volumen 200 μM dNTP-Mix, 1,5 mM MgCl_2 , 1 x PCR-Puffer, 1 U *Taq*-Polymerase, 10-100 ng *Template*-DNA und je 1 μM Vorwärts-*Primer* (*Primer+*) und Rückwärts-*Primer* (*Primer-*) eingesetzt. Für jedes *Primer*-Paar wurde auch eine Reaktion ohne *Template*-DNA angesetzt, um zu testen, ob Reagenzien mit Fremd-DNA kontaminiert waren (H_2O -Kontrolle). Die PCR-Temperaturprofile wurden je nach *Primer*-Paarung und PCR-Produktgröße festgelegt. Gestartet wurde mit einem Denaturierungsschritt (3 min 94°C), gefolgt von 30 bis 35 Wiederholungen von 30 sek 94°C (DNA-Denaturierung), 30 sek *Annealing*-Temperatur (4°C unter dem Schmelzpunkt der *Primer*) und pro 1 kb PCR-Produktgröße 1 min 72°C (optimale Temperatur für die *Taq*-Polymerase-Aktivität). Abschließend wurde die Reaktion erneut, abhängig von der Produktgröße, 5 bis 15 min bei 72°C inkubiert und dann bis zur Weiterverarbeitung auf 4°C oder 8°C abgekühlt. Die Überprüfung der PCR erfolgte durch Gelelektrophorese. Die PCR-Reaktionen wurden in einem *PTC-200 Peltier Thermal Cycler* durchgeführt. Die reverse Transkription (Erststrang-Synthese) von mRNA zu cDNA erfolgte mit der *SuperScriptTMII RNase H Reverse Transcriptase* (RT). Pro Reaktion wurde 1 μg Gesamt-RNA eingesetzt. Für jede neu isolierte RNA wurde außerdem eine Reaktion ohne RT ($-$ RT-Kontrolle) angesetzt, um zu testen, ob die Gesamt-RNA trotz DNaseI-Behandlung mit genomischer DNA kontaminiert war. Zur Gesamt-RNA wurde pro Ansatz 1 μl 500 ng/ μl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ in 11,75 μl Volumen (12,75 μl Volumen in $-$ RT-Kontrollen) gegeben und 10 min bei 72°C und 5 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden pro Ansatz 4 μl 5 x *First-Strand Buffer* (mitgeliefert zur *SuperScriptTMII*), 2 μl 0,1 M DTT (mitgeliefert zur *SuperScriptTMII*), 1 μl 10 mM dNTP-Mix, 0,25 μl RNasin (40 U/ μl) und 1 μl RT (200 U/ μl) zugegeben. Die

Material und Methoden

Reaktion erfolgte 50 min bei 42°C mit anschließender RT-Inaktivierung (15 min, 75°C). Die gewonnene cDNA wurde in einem Endvolumen von 100 µl aufgenommen. Von dieser cDNA-Lösung konnten jeweils 5 µl als *Template*-DNA für PCRs verwendet werden. Diese PCRs wurden in 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Je nach verwendetem *Primer*-Paar variierte die Anzahl an Zyklen und die *Annealing*-Temperatur. Nach einer PCR konnte die DNA in einer Gelelektrophorese semiquantitativ (relativ zu einer entsprechenden Ladekontrolle) analysiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Projektionsmuster einzelner Hugin-Neurone

Hugin wird in der *Drosophila* Larve in 20 Zellen des suboesophagealen Ganglions exprimiert (Melcher und Pankratz, 2005; Meng et al., 2002). Die Hugin-Neurone senden Dendriten zu dem Protocerebrum, dem ventralen Nervensystem, dem zentralen neuroendokrinen Organ (Ringdrüse) und zum Pharynx. Außerdem befinden sich die verzweigten Strukturen der Hugin-Neurone in unmittelbarer Nähe von speziellen gustatorischen Neuronen (Amrein und Thorne, 2005; Scott, 2005; Stocker, 1994). Dies führt zu der Vermutung, dass es sich bei den Hugin-Neuronen um Interneurone der zweiten Ordnung handeln könnte, welche Geschmacksinformationen vermitteln (Melcher und Pankratz, 2005). Auch die Frage, ob Axone einzelner Hugin-Neurone spezifische Ziele innervieren, wurde aufgeworfen. Durch geeignete Marker konnte bereits gezeigt werden, dass es unterschiedliche Gruppen von Hugin-Neuronen gibt. Wegen der limitierten Anzahl an Markern konnten jedoch bisher nur zwei Gruppen identifiziert werden. Eine dieser Gruppen besteht aus Neuronen, deren Axone ausschließlich die Ringdrüse innervieren, die andere identifizierte Gruppe sendet Axone zum Pharynx (Melcher und Pankratz, 2005). Es konnte nicht gezeigt werden, ob Hugin-Neurone, die zum ventralen Nervensystem oder in das Protocerebrum projizieren, ihre Axone ebenfalls spezifisch zu einem Projektionsziel senden. Zudem konnte das Projektionsmuster einzelner Hugin-Zellen noch nicht untersucht werden, da durch die bisher verwendeten Marker lediglich Zellgruppen, nicht aber Einzelzellen markiert werden konnten.

Um die Projektion einzelner Hugin-Neurone zu untersuchen, wurden mit Hilfe der Flp-out Technik (Wong et al., 2002) verschiedene Klone erzeugt, welche ermöglichen, das Projektionsmuster einzelner Hugin-Zellen im Detail zu untersuchen. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass individuelle Hugin-Zellen ihre Axone zu nur einem der vier Haupt-Projektionsziele senden. Außerdem konnte eine Komplexität der Neuron-Morphologie beschrieben werden, die aus der Untersuchung des gesamten Hugin-Clusters nicht ersichtlich war. Dies führte zur Identifizierung einer Region an der Grenze des ösophagealen Foramins zum SOG, welche eine Rolle bei der Regulierung von Fressverhalten spielen könnte (Bader et al., 2007a). In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Gruppen im Detail beschrieben.

3.1.1 Projektion in das Protocerebrum

Einzelne Zellen aus der Gruppe der Hugin-Neurone, die Axone in das Protocerebrum senden, projizieren ausschließlich ipsilateral in dieses Gebiet. Um die morphologischen Variationen der einzelnen Zellen zu verdeutlichen, sind verschiedene für diese Gruppe charakteristische Neurone in Abbildung 3.1 dargestellt. Diese Zellen zeigen Verästelungen ventrolateral zum Foramen des Ösophagus. Dies ist die Region, in der sich die Axon-Enden der gustatorischen Rezeptor-Neurone befinden, die für die Aufnahme und die Weiterleitung gustatorischer Reize verantwortlich sind. Zwischen den beiden Hemisphären besteht eine Verbindung, die ebenfalls von dieser Gruppe der Hugin-Neurone ausgebildet wird (Abb. 3.1 H). Die Tatsache, dass keine Zellen gefunden wurden, die contralateral in die dem Zellkörper gegenüberliegende Hemisphäre projizieren, schließt deren Existenz nicht aus. Abb. 3.1 I zeigt ein Gehirn, bei dem vier Hugin-Neurone ihre Neuriten ipsilateral in das Protocerebrum senden. Wenn man annimmt, dass dies auch auf der gegenüberliegenden Seite der Fall ist, wird das Protocerebrum von insgesamt acht Hugin-Zellen innerviert.

3.1.2 Projektion in das ventrale Nervensystem

Einzelne Hugin-Neurone projizieren in das ventrale Nervensystem (Abb. 3.2 A-D). Die Morphologie dieser Zellen ist sehr markant. Zusätzlich zu einem langen Ausläufer, der contralateral entlang der lateralen Neuropil-Grenze des ventralen Nervensystems verläuft, gibt es vier kürzere Nervenfasern, welche in der Mitte des ventralen Nervensystems nach oben und unten ziehen (Abb. 3.2 A-C). Die Neuriten, welche an der Seite des ventralen Nervensystems verlaufen, verzweigen sich an der Spitze (Abb. 3.2 D); die genaue Zielregion ist jedoch noch nicht charakterisiert. Die beiden Fasern, welche in anteriore Richtung zeigen, gehen rechts und links am Foramen vorbei und enden im medianen Teil des Protocerebrums. Wenn man sich in Abb. 3.2 C die ipsilaterale Projektion in das ventrale Nervensystem genauer anschaut, ist zu erkennen, dass der grünen Faser noch mindestens eine weitere CD2 markierte Faser (magenta) folgt. Daraus lässt sich schließen, dass mindestens zwei Neurone pro Hemisphäre das ventrale Nervensystem innervieren. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass von den 20 Hugin-Neuronen vier Neurone den Pharynx und ebenfalls vier Neurone die Ringdrüse innervieren (Melcher und Pankratz, 2005). Daher ist es wahrscheinlich, dass vier Neurone das ventrale Nervensystem innervieren und acht Neurone Nervenfasern zum Protocerebrum senden.

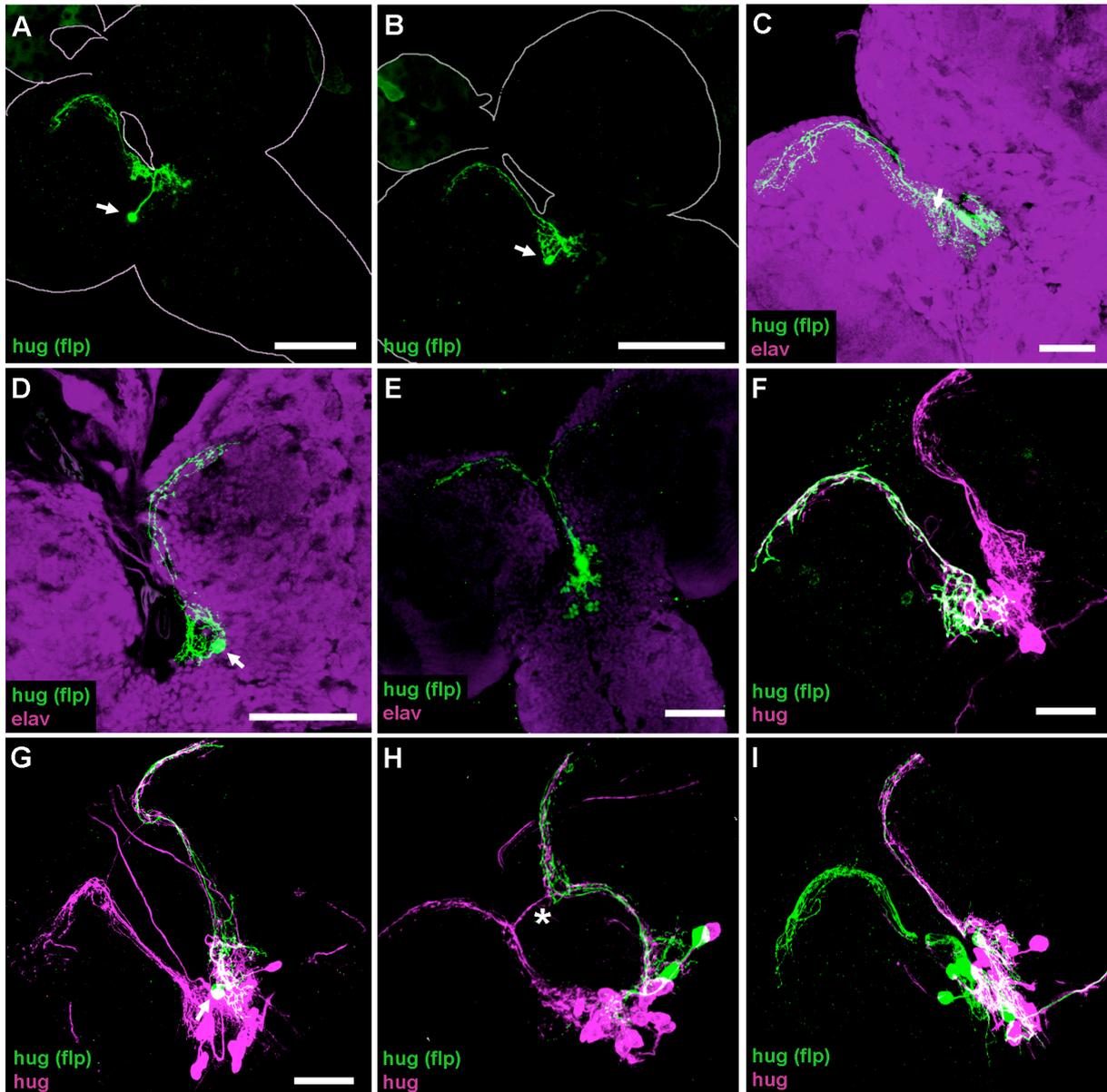


Abbildung 3.1: Projektion in das Protocerebrum. Einzelne, mit der Flp-out-Technik erzeugte Hugin-Neurone gegen GFP gefärbt (*hug (flp)*, grün), ohne zusätzliche Färbung (A,B). Der Umriss des Gehirns ist durch eine weiße Linie gekennzeichnet. Zusätzliche Färbung gegen *elav* (C,E) und einzelne durch die Flp-out-Technik erzeugte Zellen im Verbund mit den übrigen Hugin-Zellen, die gegen CD2 gefärbt wurden (*hug*, magenta; F-I). **A-D:** Einzelne Zellen, die ipsilateral ins Protocerebrum projizieren. Die Zellkörper sind mit einem Pfeil markiert. **E:** Einzelne Zelle, die Neuriten in beide Hemisphären sendet. **F,G:** Einzelne Hugin-Zellen, die Neuriten ipsilateral in das Protocerebrum senden, in Relation zu den übrigen Hugin-Zellen. **H:** Zwei Zellen senden Neuriten in beide Hemisphären. Die dünne Verbindung zwischen den beiden Hemisphären ist mit einem Stern gekennzeichnet. **I:** Vier Zellen projizieren zur linken Seite des Protocerebrums, eine Zelle zur rechten Hemisphäre, eine Zelle projiziert zum Pharynx. Maßstab bei A,B,E beträgt 50 μ m, bei G 20 μ m (Bader et al., 2007a). Verwendete primäre Antikörper: α -GFP-rb (A-I), α -*elav* (C-E), α -CD2 (F-I).

3.1.3 Projektion zur Ringdrüse

Des Weiteren wurden einzelne Neurone entdeckt, die zur contralateralen Seite der Ringdrüse projizieren (Abb. 3.2 E-H). Diese Neurone sind zusätzlich durch einen ipsilateralen Fortsatz charakterisiert, der seitlich vom ösophagealen Foramen endet. Die Länge des Neurits kann variieren (vgl. Abb. 3.2 F mit Abb. 3.2 G). Immer wieder wurden Fasern entdeckt, die in die Grenzregion der Antennalloben und des SOGs projizieren. Jedoch verlaufen diese Fasern manchmal in dorsaler Richtung weiter. In der Ringdrüse bilden die Fasern eine dicht verzweigte Struktur aus, welche auf der ipsilateralen Seite der in die Ringdrüse eindringenden Faser liegt. Nach einer Abzweigung in die andere Hälfte der Ringdrüse sind weit weniger verästelte Strukturen ausgebildet (Abb. 3.2 F). Mögliche Zielzellen dieser Neurone befinden sich in den Corpora cardiaca (Siegmund und Korge, 2001).

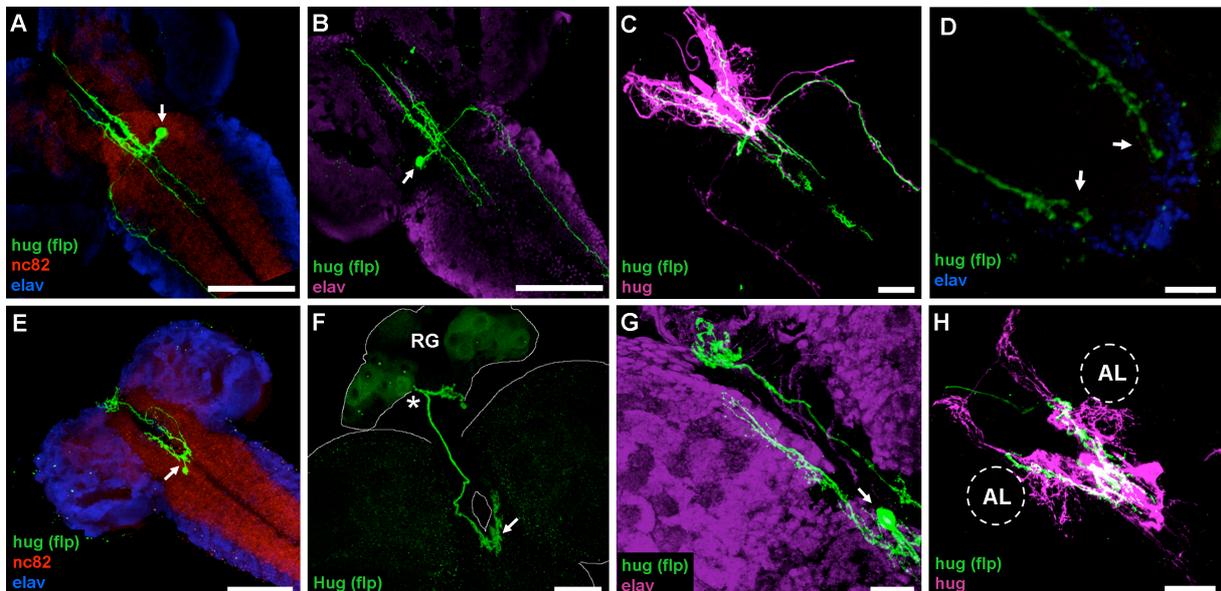


Abbildung 3.2: Projektion in das ventrale Nervensystem und in die Ringdrüse. **A,B:** Einzelne Hugin-Zellen (*hug (flp)*, grün), deren Neuriten das ventrale Nervensystem innervieren. Die Pfeile verdeutlichen die Zellkörper. **C:** Einzelne Zelle, die in das ventrale Nervensystem projiziert in Relation zu den übrigen Hugin-Zellen (*hug*, magenta). **D:** Vergrößerung der Enden der Hugin-Neuriten am posterioren Ende des ventralen Nervensystems. **E-G:** Einzelne Zellen, deren Neuriten in die Ringdrüse projizieren. Die Zellkörper werden durch Pfeile verdeutlicht. Der Stern in F markiert den Punkt, an dem die Nervenfasern die Ringdrüse innervieren. **H:** Einzelne Zelle (grün), welche die Ringdrüse innerviert in Relation zu den übrigen Hugin-Zellen (magenta). Die Position der Antennalloben (AL) ist zur besseren Orientierung hervorgehoben. Maßstab bei C,D,F-H beträgt 20 μm , 50 μm bei A,B und E (Bader et al., 2007a). Verwendete primäre Antikörper: α -GFP-rb (A-H), α -nc82 (A,E), α -elav (A,B,D,E,G), α -CD2 (C,H).

3.1.4 Projektion zum Pharynx

Die vierte Gruppe der Hugin-Zellen projiziert in die Nähe des cephalo-pharyngealen Skeletts des Pharynx (Abb. 3.3 A-C). Die Neuriten verlassen das SOG und vollziehen eine U-förmige Wendung, um am anterioren Teil der dorsalen Pharynxmuskulatur zu enden. Ob die Nervenzellen die Pharynxmuskulatur tatsächlich innervieren, lässt sich jedoch nicht genau bestimmen. Es gibt sowohl Neurone, welche die mittlere Linie des zentralen Nervensystems kreuzen, als auch solche, die nicht kreuzen. Die Unterscheidung zwischen diesen beiden Gruppen ist jedoch häufig schwierig, da die Zellkörper oft sehr nahe an der mittleren Linie liegen (Abb. 3.3 D,E). Zusätzlich zu diesen Fortsätzen haben diese Neurone kurze Neuriten, die zu beiden Seiten entlang des Foramens verlaufen (Abb. 3.3 E-G).

3.1.5 Morphologie der Hugin-Neurone an der Grenze zwischen SOG und Foramen

Die Verästelungen der in das Protocerebrum projizierenden Hugin-Neurone liegen seitlich des Foramens an der Grenze zum SOG. Die anderen Gruppen der Hugin-Neurone weisen solche Verästelungen nicht auf, jedoch besitzen alle von ihnen Neuriten, die diese Region direkt innervieren. Die Morphologie der Hugin-Neurone in dieser Region lässt darauf schließen, dass sich die Fortsätze der verschiedenen Gruppen der Hugin-Neurone in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (Abb. 3.4 A-D). Die Gruppen der Hugin-Neurone, die das ventrale Nervensystem (Abb. 3.4 E-G), die Ringdrüse (Abb. 3.4 H,I) oder den Pharynx (Abb. 3.4 J-L) innervieren, besitzen allesamt Fortsätze, die in die Region seitlich des Foramens gehen. Die Hugin-Neurone, die in das ventrale Nervensystem projizieren, besitzen zudem kleine Verästelungen, die sich am unteren Ende des Foramens an der Grenze zum SOG befinden (Abb. 3.4 F,G). Die den Pharynx innervierenden Hugin-Neurone besitzen zwei zusätzliche Fortsätze, die in derselben Region in dorsaler und ventraler Richtung abgehen (Abb. 3.4 K,L). Diese Beobachtungen belegen, dass die Hugin-Neurone neben ihren spezifischen Zielregionen zusätzliche, sich überschneidende Neuriten in der Nähe des SOGs haben. Basierend auf diesen Tatsachen lässt sich vermuten, dass die Grenzregion zwischen dem Foramen und dem SOG eine besondere Rolle bei der durch die Hugin-Neurone vermittelten Informationen spielen könnte.

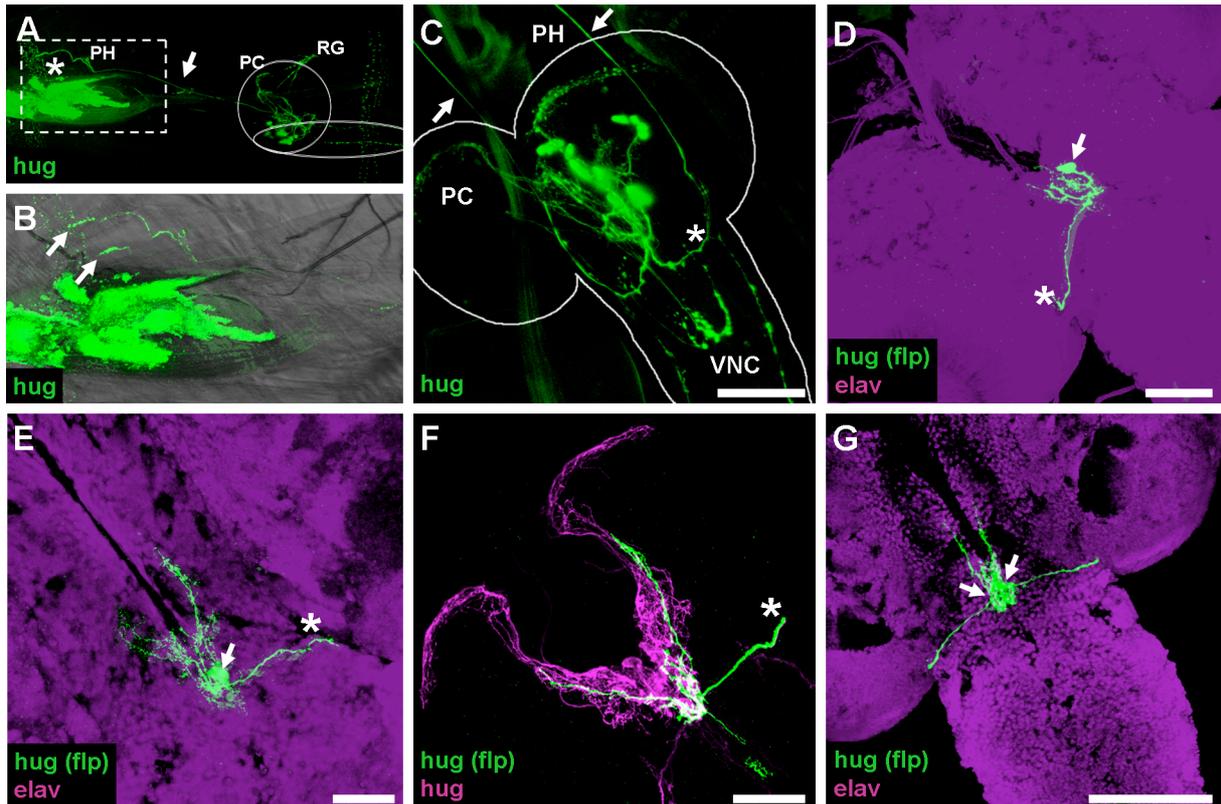


Abbildung 3.3: Projektion zum Pharynx. **A:** Kopfreion einer lebenden Larve im dritten Larval-Stadium, welche Yellow-Fluorescent-Protein (YFP) unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors exprimiert. Die Aufnahme wurde mit Hilfe eines 2-Photonen-Laser-Mikroskops gemacht. Der Kopf der Larve zeigt nach links. Die Nervenfasern, die im Pharynx (PH) enden, ist mit einem Pfeil markiert. Der Stern markiert die Enden der Neuriten. Die starke Autofluoreszenz unter dem Stern stammt von den sklerotisierten Teilen des Cephalothorax. **B:** Pharynx einer lebenden Larve. Vergrößerung der in A markierten Region. Die Pfeile deuten auf die Enden der Neuriten. **C:** Aufnahme des zentralen Nervensystems einer *Drosophila*-Larve mit Hilfe eines 2-Photonen-Laser-Mikroskops. Das Bild wurde von einem ventralen Blickwinkel aus aufgenommen. Der Umriss des zentralen Nervensystems ist durch die weiße Linie angedeutet; Neuriten, die den Pharynx innervieren, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Stern markiert die U-Förmige Wendung, die die Neuriten beschreiben. Die Nervenfasern, die das Protocerebrum (PC), die Ringdrüse und das ventrale Nervensystem (VNC) innervieren, sind ebenfalls sichtbar. **D,E:** Einzelne Hugin-Zellen (Pfeile) mit Neuriten (Sterne), die das zentrale Nervensystem in Richtung des Pharynx verlassen. **F:** Zellen, die zum Pharynx (Stern) und in das ventrale Nervensystem projizieren in relativer Lage zu anderen Hugin-Zellen (magenta). **G:** Zwei Zellen (Pfeile) mit Neuriten, die das zentrale Nervensystem zu beiden Seiten verlassen. Maßstab bei D-F beträgt 20 μm , 50 μm bei C und G (Bader et al., 2007a). Verwendete primäre Antikörper: α -GFP-rb (D-G), α -elav (D,E,G), α -CD2 (F).

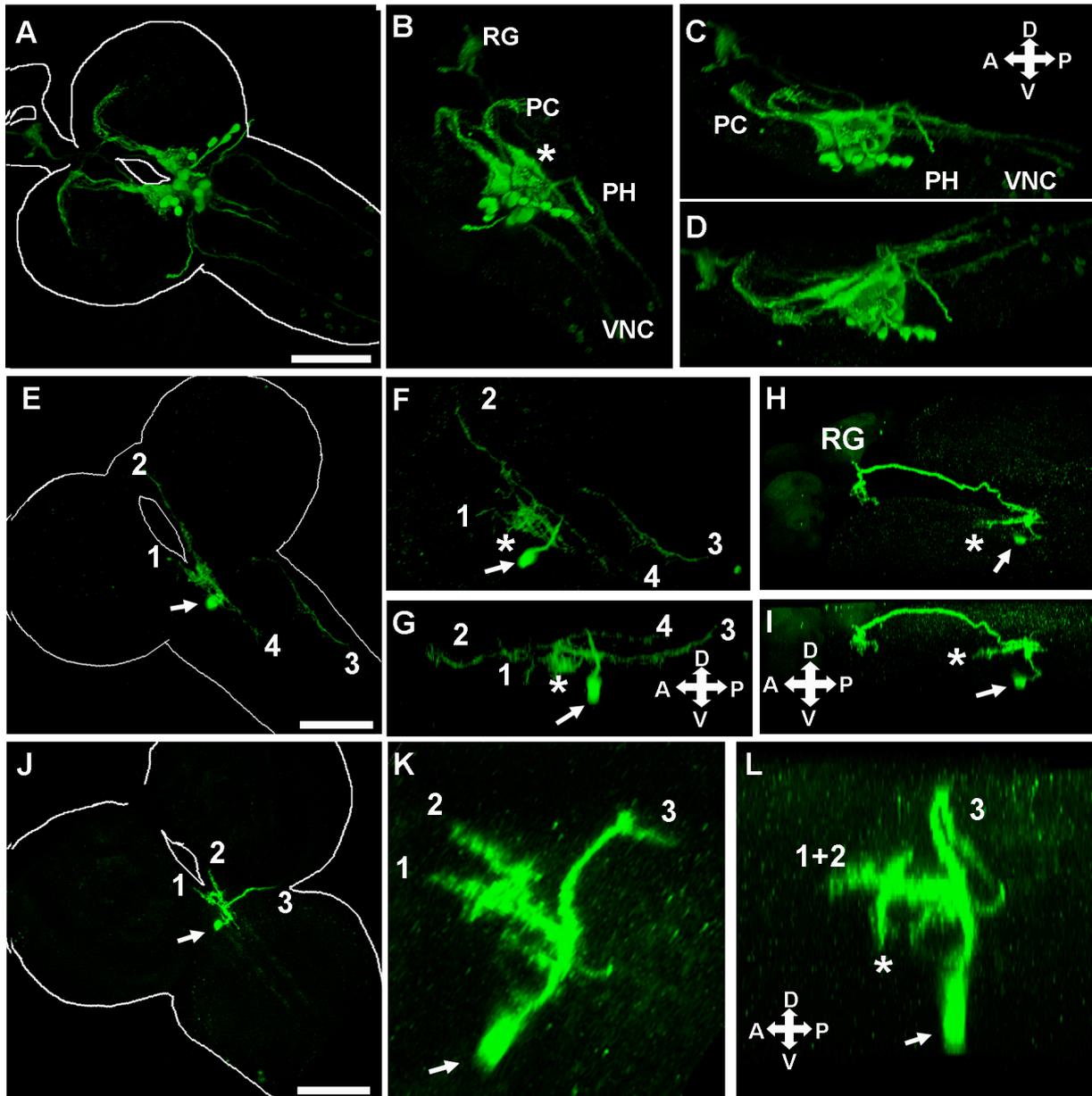


Abbildung 3.4: Position der Hugin-Neurone relativ zum Foramen. A-D: 3D-Rekonstruktion eines Gehirns durch Rotation um verschiedene Winkel. Die Zellkörper befinden sich im ventralen Teil des SOGs. Alle Neuriten verlaufen zunächst in dorsaler Richtung auf das Foramen zu, bevor sie sich in Richtung ihrer spezifischen Zielregionen verzweigen. Der Stern in B verdeutlicht die Verästelungen lateral des Foramens. Richtungspfeile wurden in den Abbildungen eingefügt, welche die Hugin-Neurone aus einer seitlichen Perspektive zeigen: anterior (A), posterior (P), dorsal (D), ventral (V). E-G: 3D-Rekonstruktion einer einzelnen Zelle, die in das ventrale Nervensystem projiziert. Die Zahlen wurden zur besseren Orientierung während der Objektdrehung eingeführt. Die Verästelungen am unteren Ende des Foramens sind mit einem Stern markiert. Pfeile deuten auf den Zellkörper. H,I: 3D-Rekonstruktion einer einzelnen Zelle, die zur Ringdrüse projiziert (siehe Abb 3.2 F). Sterne markieren den kurzen Fortsatz, der seitlich des Foramens endet. J-L: 3D-Rekonstruktion einer einzelnen Zelle, die zum Pharynx projiziert. Die Zahlen dienen der besseren Orientierung während der Drehung der Abbildung. Zusätzlich zu den beiden kurzen Neuriten, die sich seitlich vom Foramen befinden (1 und 2), gibt es Fortsätze (Stern), die nach dorsal und ventral zeigen. K und L zeigen Vergrößerungen von J. Maßstab bei A, E und J beträgt 50 μ m (Bader et al., 2007a). Verwendeter primärer Antikörper: α -GFP-rb.

3.2 Die Hugin-Neurone und das olfaktorische System

Die Tatsache, dass das SOG sehr nahe an den Antennalloben liegt, die bei der primären Verarbeitung von Geruchreizen eine wichtige Rolle spielen, gab Anlass, den morphologischen Zusammenhang zwischen den Hugin-Neuronen, die das Protocerebrum innervieren und den Antennalloben genauer zu untersuchen. Es stellte sich die Frage, ob die Verästelungen der Gruppe der Hugin-Neurone, welche in das Protocerebrum projizieren, die Antennalloben innervieren. In Gehirnen, in denen spezifisch die Gruppe der Hugin-Zellen, die in das Protocerebrum projiziert und in denen zusätzlich chemische Synapsen mit dem α -nc82-Antikörper gefärbt wurden, kann gezeigt werden, dass sich die für diese Zellgruppe spezifischen Verästelungen nur an der Grenze zu den Antennalloben befinden, diese aber nicht innervieren (Abb. 3.5 A). In Gehirnen erwachsener Fliegen, bei denen die Antennalloben relativ zum SOG signifikant größer sind, ist die Situation die selbe (Abb. 3.5 B). Als nächstes wurden die Neuriten, die in der Larve zum Protocerebrum projizieren, genauer untersucht, um herauszufinden, ob diese den Calyx der Pilzkörper, welcher das sekundäre Zentrum für die Verarbeitung olfaktorischer Reize darstellt, innervieren. Die Bilder zeigen jedoch, dass die Neuronen der Hugin-Zellen dorsal von den globulär strukturierten Calyces der Pilzkörper liegen und diese nicht innervieren (Abb. 3.5 C-F). Daher gibt es aus morphologischer Sicht keine Überlappung zwischen den Hugin-Neuronen und dem zentralen olfaktorischen System. Da die durch *hugin* kodierte Neuropeptide jedoch ausgeschüttet werden, kann man den Einfluss auf das olfaktorische System nicht völlig ausschließen.

3.3 Polarität der Hugin-Neurone: Dendriten im Tritocerebrum

Nachdem die einzigartige und komplexe Morphologie der Hugin-Neurone untersucht wurde, stellte sich die Frage nach der Polarität dieser Nervenzellen. Um eine Vorstellung davon zu bekommen, bei welchen Neuriten es sich um Axone oder Dendriten handelt, wurde das Marker-Protein Dscam17.1 verwendet. Von Dscam17.1 ist bekannt, dass es sich vorzugsweise in den Dendriten der Pilzkörper-Neurone ansammelt (Wang et al., 2004a). Die Expression von Dscam17.1 unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors führt zu einer starken Akkumulation dieses Proteins in einer Region ventrolateral des ösophagealen Foramens und in der medianen Projektion in das ventrale Nervensystem; die Projektionen in das Protocerebrum, in die Ringdrüse und in das laterale ventrale Nervensystem sind nicht gefärbt

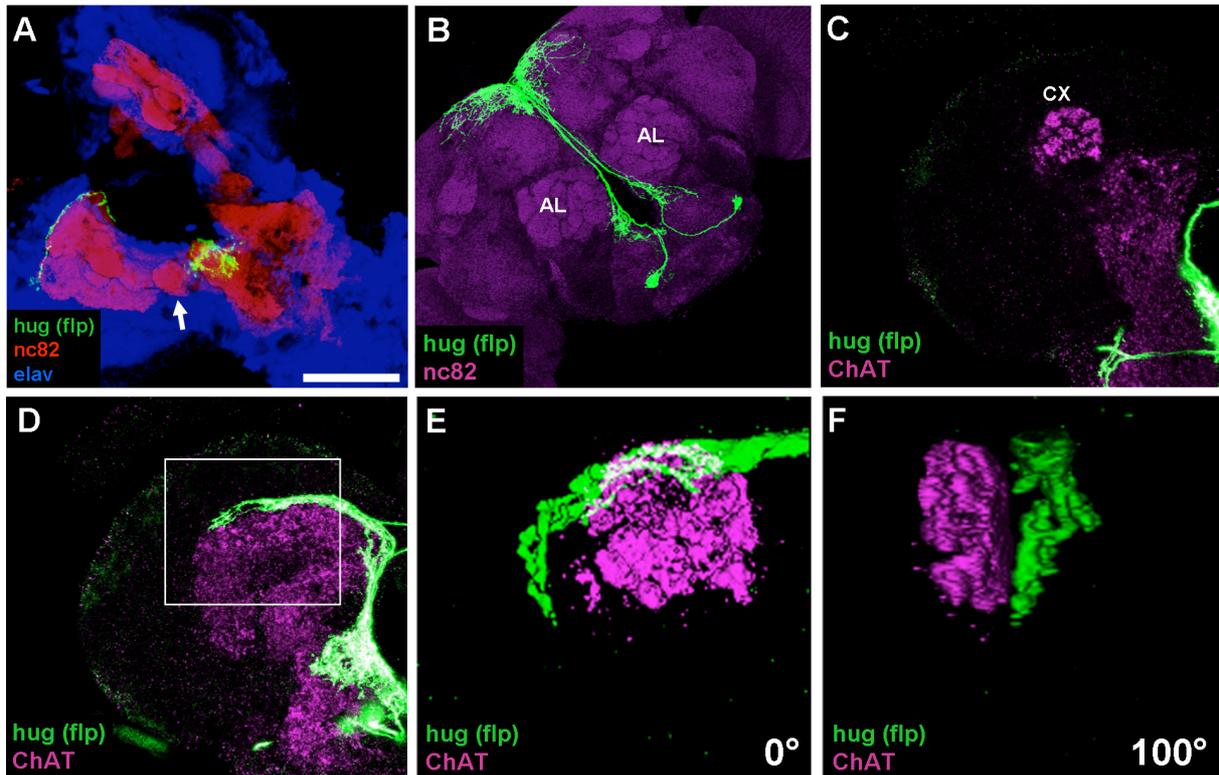


Abbildung 3.5: Lage der Hugin-Neurone relativ zum olfaktorischen System. **A:** Einzelne Hugin-Neurone (*hug (flp)*, grün) im larvalen zentralen Nervensystem, die in das Protocerebrum projizieren. Der Pfeil markiert den linken larvalen Antennallobus, der mit dem synaptischen Marker *nc82* (rot) angefärbt wurde. **B:** Adultes Gehirn mit drei in das Protocerebrum projizierenden Hugin-Zellen; Antennalloben (AL) sind mit *nc82* gefärbt (magenta). **C,D:** Benachbarte Stapel optischer Schnitte der linken Hemisphäre eines larvalen Gehirns; Hugin-Neurone sind grün angefärbt. Das Neuropil, inklusive des Pilzkörper-Calyx (cx), wurde mit einem Antikörper gegen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) (magenta) angefärbt, welches sich in cholinergen Neuronen befindet. **E,F:** Durch das Rechteck in D markierter Ausschnitt. Das Bild zeigt die Position der Axon-Enden der Hugin-Neuriten relativ zur Lage des Calyx (magenta). In F wurde das Gehirn um 100° gedreht. Verwendete primäre Antikörper: α -GFP-rb (A-F), α -*nc82* (A,B), α -*elav* (A), α -ChAT (C-F).

(Abb. 3.6 C,D). *Dscam17.1* konnte ebenfalls in den Projektionen zum Pharynx nachgewiesen werden. Dies war überraschend, da diese Neurone für Motoneurone gehalten wurden und daher nicht von einem für Dendriten spezifischen Marker angefärbt werden sollten.

Bei der durch *Dscam17.1* gefärbten Region, welche an das Foramen grenzt, handelt es sich wahrscheinlich um das Tritocerebrum (Bader et al., 2007a). Studien aus *Drosophila* und anderen Insekten deuten darauf hin, dass sich das Tritocerebrum ventro-lateral vom Foramen befindet (Aubele und Klemm, 1977; Ignell et al., 2005). In der *Drosophila*-Larve ist das Tritocerebrum schwer einzugrenzen, da es dorsal mit dem Deutocerebrum (welches die Antennalloben beinhaltet) und ventral mit dem suboesophagealen Ganglion verschmolzen ist. In verschiedenen Insekten empfängt das Tritocerebrum sensorische Informationen von

gustatorischen Neuronen (Aubele und Klemm, 1977; Ignell et al., 2005). Dies gilt in ähnlicher Weise auch für *Drosophila*.

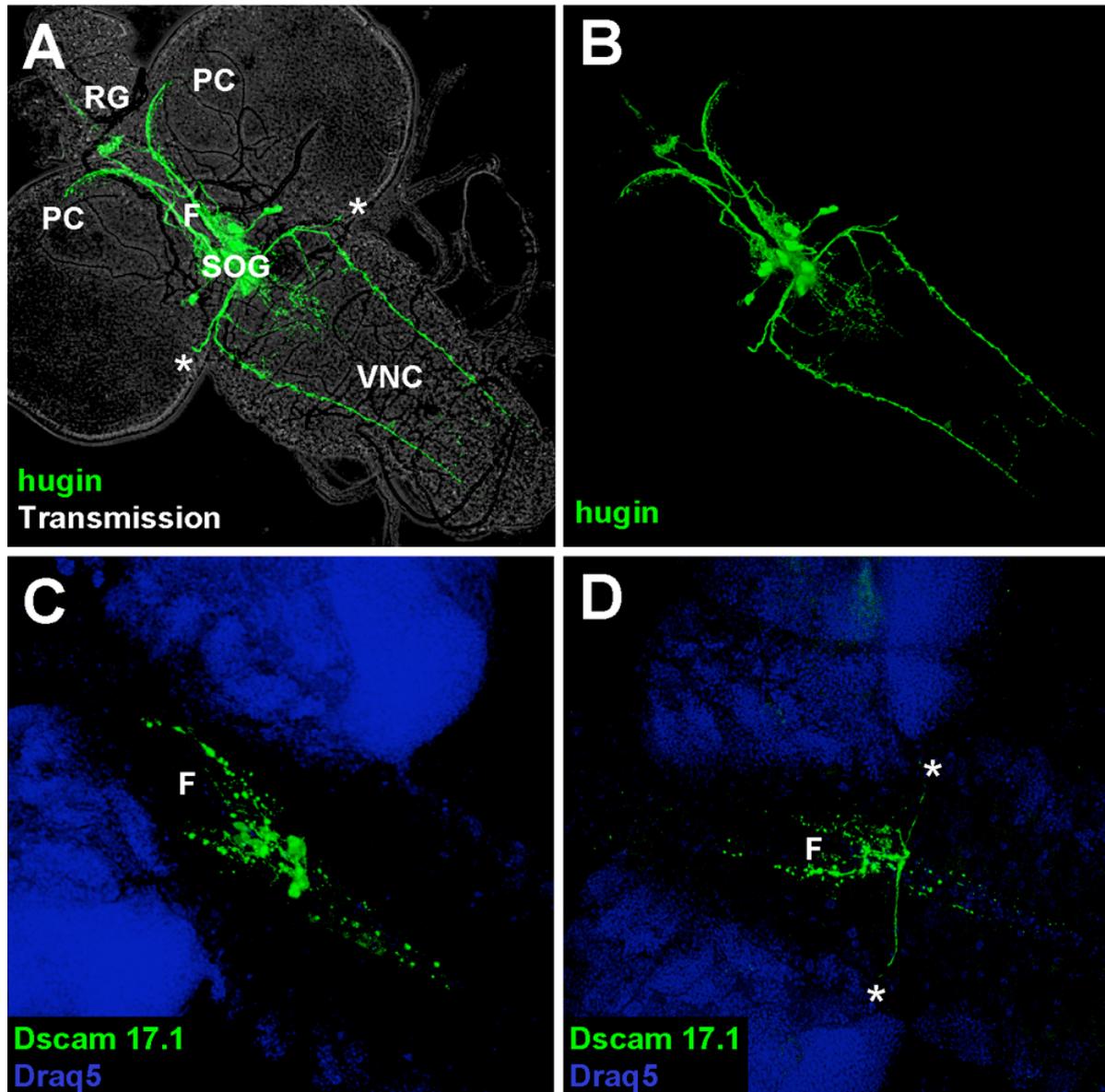


Abbildung 3.6: Polarität der Hugin-Neurone. A,B: Zentrales Nervensystem einer *Drosophila*-Larve, bei welcher YFP unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors exprimiert wird. Zellkörper und Neurite der Hugin-Neurone sind durch Färbung gegen YFP grün sichtbar. In A ist der Durchlichtkanal zur besseren Orientierung angezeigt. PC: Protocerebrum, RG: Ringdrüse, F: Foramen, VNC, ventrales Nervensystem. Die Sterne markieren die Neuriten, die das zentrale Nervensystem verlassen und zum Pharynx verlaufen. C,D: Zwei verschiedene larvale Gehirne, bei denen Dscam17.1-GFP unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors exprimiert wird. Auffällig ist die Verteilung des GFPs in spezifischen Gebieten ventro-lateral des Foramens, entlang des medianen Teils des ventralen Nervensystems, sowie in den Projektionen zum Pharynx. Verwendeter primärer Antikörper: α -GFP-rb.

Der Teil, der als Tritocerebrum bezeichnet wird und in dem sich die dendritischen Verästelungen sowie der Dendriten Marker Dscam17.1 befinden, steht in engem Kontakt zu gustatorischen Rezeptor-Neuronen aus den Geschmacksorganen (vgl. Kap. 3.4) (Bader et al., 2007a; Colomb et al., 2007).

3.4 Die Hugin-Neurone und das gustatorische System

Die chemischen Sinne – Geschmack und Geruch – erlauben es Tieren, wertvolle Futterquellen einzuschätzen und diese von gefährlichen Substanzen in der Umwelt zu unterscheiden. Die zentralen Mechanismen, durch die das Gehirn attraktiven und abstoßenden Geruch oder Geschmack erkennen und unterscheiden kann und die darauf basierenden Entscheidungen für bestimmtes Verhalten trifft, sind weitgehend ungeklärt. In *Drosophila* konnte in letzter Zeit durch die Anwendung von neuen neuroanatomischen und molekularen Methoden ein nahezu vollständiges Bild der peripheren Neuroanatomie sowie der Funktion von Geruch und Geschmack erstellt werden. Neurophysiologische Experimente erlauben erste Einblicke in die Mechanismen, die für die Verarbeitung von chemosensorischen Reizen verantwortlich sind (Vosshall und Stocker, 2007). Aus der Literatur ist bekannt, dass viele der Axone, die von den gustatorischen Rezeptor-Neuronen stammen, direkt in das SOG führen (Thorne et al., 2004; Wang et al., 2004b). In diesem Kapitel soll geklärt werden, ob die neuroanatomischen Voraussetzungen bestehen, dass der neuronale Hugin-Schaltkreis die Informationen von den peripheren, gustatorischen Rezeptoren aufnehmen kann, um diese zu verarbeiten und an entsprechende Zielregionen weiterzuleiten. Hierbei wird die Lage der Axon-Enden verschiedener Neurone, die gustatorische Rezeptoren exprimieren, relativ zur Lage der dendritischen Strukturen der Hugin-Neurone lateral des Foramens untersucht (Tabelle 3.1). Die Neurone, die den Rezeptor Gr28b.b exprimieren, werden in einem eigenen Kapitel beschrieben, da sie ein eher atypisches, aber dennoch sehr interessantes Expressionsmuster aufweisen.

3.4.1 Expressionsmuster verschiedener gustatorischer Rezeptor-Neurone relativ zur Lage der Hugin-Neurone

Die räumliche Nähe von Axon-Enden bestimmter gustatorischer Rezeptor-Neurone zu den dendritischen Verzweigungen der Hugin-Neurone lassen die Vermutung zu, dass es sich bei den Hugin-Neuronen um gustatorische Projektionsneurone handeln könnte (Melcher und Pankratz, 2005). Gr66a ist der wohl bekannteste und am besten untersuchte gustatorische Rezeptor für die Detektierung von abschreckenden Substanzen, wie zum Beispiel Bitterstoffe. Axone der Gr66a exprimierenden Neurone enden und verzweigen sich direkt in unmittelbarer Nähe der Dendriten der Hugin-Neurone lateral des ösophagealen Foramens (Abb. 3.7 A-C). Bei der Betrachtung einzelner Schichten der Projektion (Abb. 3.7 C) sieht man die ausgesprochen eng verwundenen Neurite beider Zelltypen. Jeder Schnitt hat eine Schichtdicke von 1,7 μm . Die Gr66a-positiven Axone überschneiden sich hauptsächlich mit den Neuriten der Hugin-Neurone, die in das Protocerebrum projizieren. Des Weiteren wurde die relative Lage von Gr28a, Gr21a, Gr32b, Gr5a und Gr47a in der *Drosophila*-Larve untersucht. Man sieht deutlich in den Übersichtsbildern (Abb. 3.7 D-F), dass die Axone der verschiedenen gustatorischen Rezeptor-Neurone (Gr28a, Gr21a und Gr32b) im SOG enden, jedoch verschiedene Zielgebiete innervieren. In den Vergrößerungen der in Abb. 3.7 D-F

Tabelle 3.1: Auflistung der für diese Studie verwendeten Gr-Gal4-Linien. Neben dem Namen wird die bisher beschriebene oder angenommene Funktion der jeweiligen Rezeptoren, sowie die Literaturquelle angegeben.

Name	Funktion	Literatur
Gr5a	Trehalose Rezeptor	(Thorne et al., 2004; Wang et al., 2004b)
Gr21a	CO ₂ -Rezeptor	(Kwon et al., 2007)
Gr28a	unbekannt	(Amrein und Thorne, 2005)
Gr28b.b	vermeintlicher Rezeptor für Bitterstoffe	(Thorne und Amrein, 2008)
Gr32b	vermeintlicher Pheromon Rezeptor	(Ebbs und Amrein, 2007)
Gr47a	vermeintlicher Rezeptor für Bitterstoffe	(Vosshall und Stocker, 2007; Wang et al., 2004b)
Gr66a	Rezeptor für Bitterstoffe und hohe Salzkonzentrationen	(Thorne et al., 2004; Wang et al., 2004b)

abgebildeten Gehirne (Abb. 3.7 G-H) kann man erkennen, dass Gr28a und Gr32b die dendritischen Verästelungen der Hugin-Neurone in ähnlicher Weise innervieren, während Gr21a keine Überschneidung mit den Hugin-Neuronen aufweist. Gr32b innerviert das larvale SOG in gleicher Weise symmetrisch wie Gr21a und Gr28a. Bei den gezeigten Abbildungen (Abb. 3.7 F,I) wurde lediglich die Projektion einer Seite dargestellt, da das Gehirn bei der Aufnahme durch das Mikroskop schräg lag und deswegen nicht beide Seiten mit der gleichen Intensität gescannt werden konnten. Die Tatsache, dass Gr21a das SOG in einer anderen Region als die übrigen untersuchten GRs innerviert, war bereits aus der Literatur bekannt (Colomb et al., 2007). Die Axone der Gr5a- und Gr47a-positiven Neurone scheinen nicht im SOG der Larve zu enden (Abb. 3.7 J). Lediglich das Neuropil im medianen ventralen Nervensystem, das bei allen untersuchten GRs zu finden ist, wird durch die Antikörper detektiert. In adulten Tieren innervieren Gr5a-positive Neurone das SOG, was in der Larve nicht der Fall ist (Abb. 3.7 K). Für Gr32b besteht dieser Unterschied nicht. Sowohl in der adulten Fliege, als auch in der Larve enden die Axone dieser Rezeptor-Neurone in ähnlicher Weise im SOG (vgl. Abb 3.7 F,I mit L). Da diese Untersuchung jedoch hauptsächlich auf die Expressionsmuster in der Larve ausgerichtet ist, wird auf die Situation in adulten Fliegen nicht weiter eingegangen.

3.4.2 Expression von Gr28b.b in der *Drosophila*-Larve

Wie bereits erwähnt, weisen die Neurone, die Gr28b.b exprimieren, ein atypisches Expressionsmuster auf. Thorne et al. beschreiben das Expressionsmuster dieses Rezeptors in adulten Fliegen. Gr28b.b ist der einzige Rezeptor, der nicht in gustatorischen Rezeptor-Neuronen im Labellum exprimiert wird. Außerdem wird beschrieben, dass die Axon-Enden der Gr28b.b-positiven Neurone im zentralen Nervensystem eine starke Innervierung der Antennalloben und des SOG aufweisen. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass es im gesamten zentralen Nervensystem verschiedene Cluster von Gr28b.b-positiven Zellen gibt, die hauptsächlich für das Netzwerk der Neuriten im ZNS verantwortlich sind (Thorne und Amrein, 2008). Von besonderem Interesse für diese Arbeit war die Frage, ob es sich bei den Gr28b.b-positiven Zellen im SOG möglicherweise um *hugin* exprimierende Zellen handelt. Außerdem wurde untersucht, ob es sich bei den Gr28b.b-positiven Zellen im Pars intercerebralis um die Insulin-produzierenden Zellen (IPZs) handelt. Durch die Expression

Ergebnisse

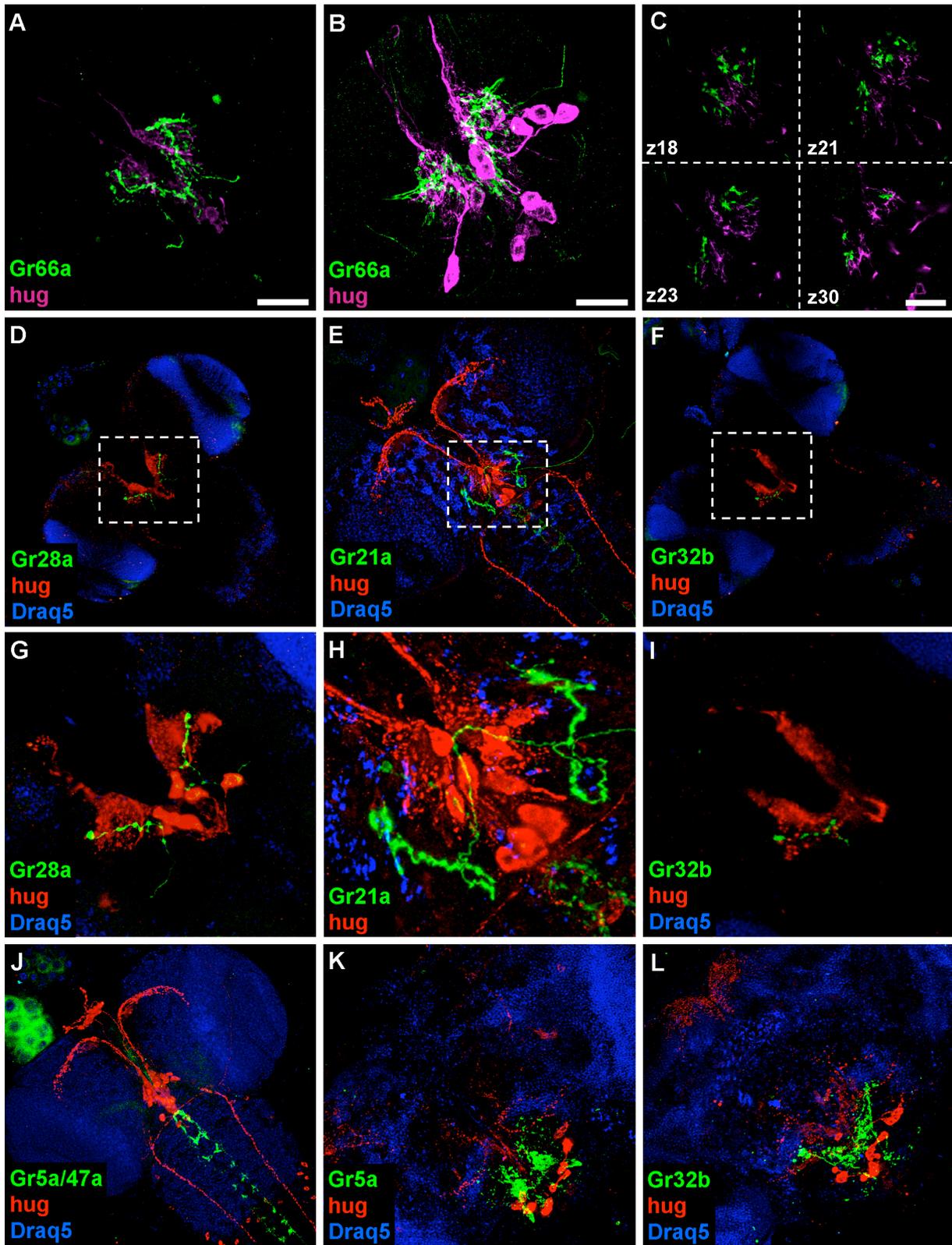


Abbildung 3.7: Axon-Enden verschiedener gustatorischer Rezeptor-Neurone im SOG. A,B: Axon-Enden von Gr66a-positiven Neuronen (grün) überlappen die Verästelungen der Hugin-Neurone (magenta) lateral vom ösophagealen Foramen. **C:** Einzelne konfokale Schnitte (vier repräsentative nummerierte Schnitte) von der Z-Projektion aus B (Bader et al., 2007a). **D-F:** Gehirne aus Larven, die YFP unter der Kontrolle von verschiedenen *Gr*-Promotorkonstrukten (Gr28a, Gr21a und Gr32b) exprimieren (grün). **G-I:** Vergrößerung der in D,E und F durch die gestrichelte Linie markierten Bereiche des ösophagealen Foramens. Gr28a und Gr32b überlappen die dendritischen Gebiete der Hugin-Neurone (rot), während die Axon-Enden von den Gr21a-positiven Neuronen seitlich an den Verästelungen vorbei verlaufen, ohne sie zu überschneiden. **J:** Gehirn einer Larve, die YFP unter der Kontrolle von Gr5a exprimiert (grün). Dieses Gehirn steht stellvertretend für Larven, die YFP unter der Kontrolle eines *Gr47a*-Promotor-Konstruktes synthetisieren, da diese das exakt selbe Expressionsmuster aufweisen: keine Innervierung des SOGs oder des Tritocerebrums. Im ventralen Nervensystem ist jedoch Gr5a/Gr47a-positives Neuropil vorhanden. **K,L:** Gehirne von adulten Fliegen, die YFP unter der Kontrolle eines *Gr5a*- beziehungsweise eines *Gr32b*-Promotor-Konstruktes exprimieren. Überschneidungen der Axon-Enden der GRNs mit den Hugin-Neuronen sind bei beiden Gehirnen zu erkennen. Verwendete primäre Antikörper: α -GFP-rb (A-C), α -GFP-m (D-L), α -CD2 (A-C), α -PK-2-rb (D-L).

des YFP-Reporters konnte zunächst festgestellt werden, dass Gr28b.b in Geschmacksorganen im Mundbereich der *Drosophila*-Larve zu finden ist (Abb. 3.8 A-C). Diese sind bilateral-symmetrisch angeordnet und werden durch Neuriten verbunden. Im zentralen Nervensystem gibt es mehrere Gruppen symmetrisch angeordneter Gr28b.b-positiver Neurone (Abb. 3.8 D). Diese befinden sich unter anderem im ventralen Nervensystem, vornehmlich im posterioren Teil der Hemisphären, der Ringdrüse und dem SOG. Die Co-Lokalisation von Dilp2 und Gr28b.b wird durch eine Doppelfärbung sichtbar (Abb. 3.8 E). Jedoch exprimieren nicht alle Insulin-produzierenden Zellen Gr28b.b. Lediglich drei Insulin-produzierende Zellen pro Hemisphäre sind gleichzeitig Gr28b.b-positiv. In der Ringdrüse wird Gr28b.b in den Corpora cardiaca exprimiert (Abb.3.8 F). Neuriten dieser Zellen durchlaufen die Prothoraxdrüse und enden in den Corpora allata. Bei genauerer Betrachtung des SOGs ist zu erkennen, dass Gr28b.b in einigen Zellen exprimiert wird (Abb. 3.8 G). Diese Gruppe überschneidet sich mit der Gruppe der Hugin-Zellen (Abb. 3.8 G). Bei einer Doppelfärbung gegen YFP und gegen Hugin wird deutlich, dass bestimmte Zellen sowohl den gustatorischen Rezeptor, als auch Hugin synthetisieren. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um die Hugin-Zellen, die in das ventrale Nervensystem projizieren. In den lateralen Hugin-Zellen, deren Neuriten das Protocerebrum innervieren, ist dieser Rezeptor nicht vorhanden.

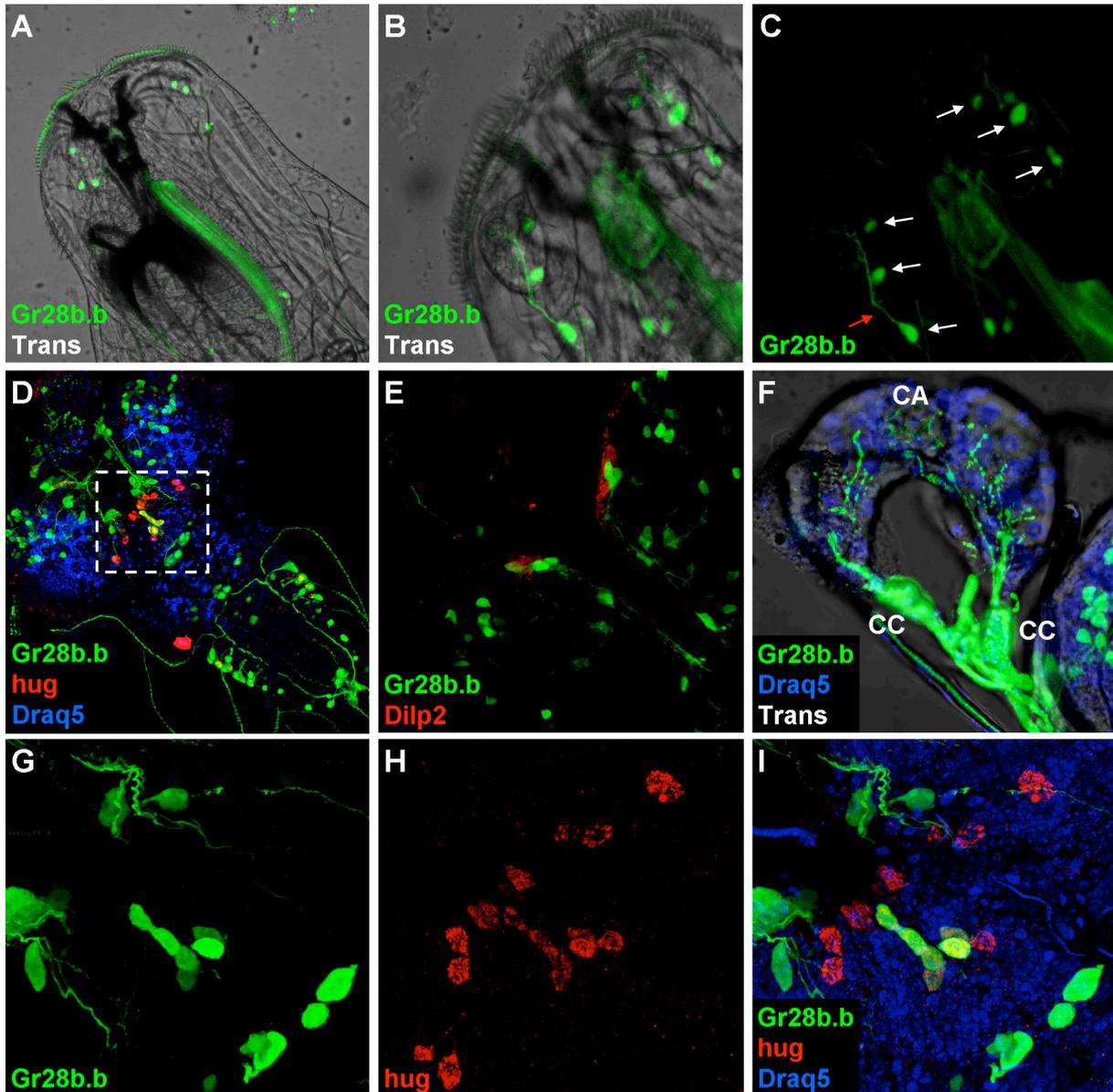


Abbildung 3.8: Expression von Gr28b.b in der *Drosophila*-Larve. A-C: Kopfreion einer Larve, die YFP unter der Kontrolle eines *Gr28b.b*-Promotors exprimiert (Thorne und Amrein, 2008). Die sklerotisierten Mundhaken heben sich im Durchlicht (Trans) aufgrund ihrer dunklen Farbe deutlich vom Hintergrund ab. Gr28b.b-positive Neurone (grün) befinden sich an der Spitze des Kopfes der Larve. In C sind die Zellkörper (weiße Pfeile) und die Axone zu sehen, die die Mundregion in Richtung des zentralen Nervensystems verlassen (roter Pfeil). D: Gesamtes zentrales Nervensystem einer *Drosophila*-Larve. Gr28b.b-positive Neurone sind grün, Hugin-Neurone sind rot und Zellkerne blau dargestellt. E: Posteriores Ende des Protocerebrums. Insulinproduzierende Zellen sind in rot dargestellt, Gr28b.b-positive Neurone sind grün gefärbt. Man sieht, dass Gr28b.b in bestimmten Insulin-produzierenden Zellen zu finden ist. F: Ringdrüse einer *Drosophila*-Larve mit Gr28b.b-positiven Neuronen. Diese Neurone liegen in den Corpora cardiaca (CC) und senden Neuriten über die Prothoraxdrüse in die Corpora allata (CA). G-I: Vergrößerung der Region des SOG, die in D durch die gestrichelte Linie markiert ist. In G und H sind die verschiedenen Kanäle getrennt voneinander dargestellt. In der Überlagerung (I) der beiden Kanäle sieht man deutlich, dass eine bestimmte Gruppe Zellen im SOG eine Co-Expression von Gr28b.b und Hugin aufweisen. Verwendete primäre Antikörper: α -GFP-m (A-I), α -PK-2-rb (A-D, G-I), α -Dilp2-HA (E).

3.5 Homologie

Hugin-Neurone scheinen zu einem neuronalen Netzwerk im zentralen Nervensystem zu gehören, welches bei der Nahrungsaufnahme und bei der Modulation von nahrungsabhängigem Verhalten bei *Drosophila* eine wichtige Rolle spielen könnte. *Hugin* kodiert für ein Prä-Propeptid, welches durch eine Peptidase in mindestens zwei Neuropeptide geschnitten werden kann, hugin- γ und PK-2 (Meng et al., 2002). Diese Neuropeptide sind spezifisch für Insekten. Ein weiteres Projekt dieser Studie war die Identifizierung eines zu hugin- γ und PK-2 homologen Peptides in Säugetieren. Ebenfalls von Interesse ist die Frage, inwiefern der neuronale Schaltkreis der Hugin-Neurone in anderen Insekten konserviert ist. Das folgende Kapitel setzt sich mit der Lösung dieser Fragen mit Hilfe von Sequenzanalysen und vergleichender, molekularer Genetik auseinander.

3.5.1 Homologe Peptide zu Hugin in Säugetieren und Insekten

In dieser Studie wird gezeigt, dass es sich bei dem in Säugetieren vorkommendem Neuromedin U (NmU) um das Homolog zu Hugin handeln könnte (Melcher et al., 2006). NmU wurde ursprünglich aus dem Rückenmark von Schweinen isoliert, da es in der Lage ist, die glatte Muskulatur der Gebärmutter zu kontrahieren (Brighton et al., 2004). Bei der Charakterisierung des aus dem Schwein stammenden NmU wurden zwei Peptide mit ähnlicher biologischer Aktivität identifiziert, ein 25mer (NmU-25) und ein 8mer (NmU-8). NmU-8 entsteht durch das Schneiden von NmU-25 und besitzt denselben C-Terminus, welcher bei der biologischen Aktivität eine entscheidende Rolle spielt und innerhalb der Säugetiere hochgradig konserviert ist (Brighton et al., 2004).

Eines der Peptide, die durch das *hugin*-Gen in *Drosophila* kodiert werden, ist Pyrokinin-2 (PK-2), welches myostimulatorische Funktion besitzt (Meng et al., 2002). Des Weiteren besitzt dieses Peptid eine auffallend ähnliche Sequenz zu NmU-8. Beide setzen sich aus acht Aminosäuren zusammen. PK-2 und NmU-8 haben zudem drei gemeinsame Aminosäurereste. Diese drei Aminosäurereste liegen innerhalb der letzten fünf Aminosäuren. Bei den Säugetieren sind diese letzten fünf Aminosäuren identisch. Die Sequenz des Pyrokinins der Schabe *Periplaneta americana* zeigt eine noch höhere Homologie zu NmU-8 des Menschen. Hierbei sind vier der letzten fünf Aminosäurereste konserviert (Abb. 3.9 A). Die putativen G-Protein gekoppelten Rezeptoren für PK-2 aus *Drosophila* und NmU-8 aus Säugetieren weisen ebenfalls eine hohe Sequenzhomologie auf (Park et al., 2002; Rosenkilde et al., 2003).

Ergebnisse

Zudem sind die Strukturen der Prä-Propeptide, aus denen NmU-8 der Säugetiere oder PK-2 aus *Drosophila* hervorgehen, sehr ähnlich. Die NmU-Gene aus Mensch und Ratte, sowie das *hugin*-Gen aus *Drosophila* kodieren Prä-Propeptide, die zu drei möglichen Peptiden weiterverarbeitet werden können (Austin et al., 1995; Meng et al., 2002). NmU-8 und PK-2 sind beides diejenigen Peptide, die dem C-Terminus am nächsten liegen. In *Drosophila* wurde das mittlere Peptid *hugin*- γ genannt (Abb. 3.9 B).

Die Ähnlichkeit zwischen *hugin* und NmU ist sogar in deren Funktion festzustellen. In Ratten wird NmU hauptsächlich im ventromedianen Hypothalamus exprimiert, eine Region, die bei der Regulation der Nahrungsaufnahme eine Rolle spielt. Außerdem ist bekannt, dass die Expression von NmU während des Fastens herunterreguliert wird (Howard et al., 2000);

A Säuger	Mensch	NmU-25	FRVDEEFQSPFASQSRGYFLFRPRN
	Mensch	NmU-8	YFLFRPRN
	Maus	NmU-23	FKAHEYQSPSVGQSKGYFLFRPRN
	Mensch	NmS	ILQRGSGTAAVDFTKKDHTATWGRPFLLFRPRN
	Maus	NmS	LPRLRLDSRMATVDFPKKDPTTSLGRPFLLFRPRN
D. mel	Drm-PK-2 (von <i>hugin</i>)		SVPFKPRL
	Drm-capa-3 (von <i>capa</i>)		TGPSASSGLWFGPRL
Insekten	<i>P. americana</i>	(PK-2)	LVPFRPRL
	<i>H. zea</i>	PBAN	LSDDMPATPADQEMYRQDPEQIDSRTKYFSPRL
	<i>H. zea</i>	PGN-8	TMNFS PRL

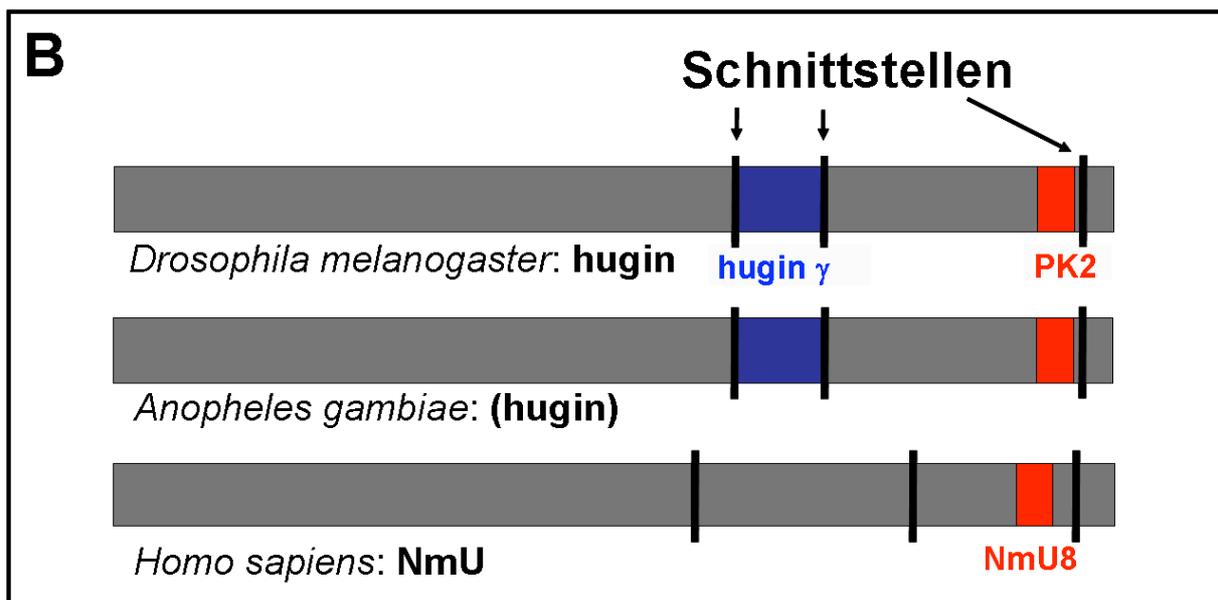


Abbildung 3.9: Homologie von PK-2 zu Neuropeptiden aus Insekten und Säugetieren. **A:** Es sind die Sequenzen einiger Neuropeptide aus Säugetieren und Insekten dargestellt. Vor allem der C-Terminus, der bei der Bindung an den Rezeptor eine wichtige Rolle spielt, ist konserviert. Er weist die Konsensus-Sequenz FxPRx auf, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht (Melcher et al., 2007). **B:** Organisation der Prä-Propeptide vom menschlichen NmU, Hugin, sowie dem zu Hugin homologen Protein aus *Anopheles*. Die möglichen Bereiche, an denen das Prä-Propeptid durch geeignete Peptidasen geschnitten werden kann, sind durch schwarze Balken markiert. (Bader et al., 2007a).

hugin wird sehr spezifisch im SOG exprimiert und wird während einer Hungerphase ebenfalls reprimiert (Melcher und Pankratz, 2005). Verabreichung von NmU führt bei Ratten zu einer verringerten Nahrungsaufnahme (Howard et al., 2000), während NmU-Knockout-Mäuse unter Hyperphagie leiden (Hanada et al., 2004). In *Drosophila* bewirkt die Überexpression von *hugin* verringertes Wachstum und verringerte Nahrungsaufnahme (Melcher und Pankratz, 2005; Meng et al., 2002), während eine Blockade der synaptischen Aktivität der Hugin-Neurone zu erhöhter Nahrungsaufnahme führt (Melcher und Pankratz, 2005; Meng et al., 2002).

NmU ist mit dem ebenfalls in Säugetieren vorkommenden Neuropeptid Neuromedin S (NmS, (Mori et al., 2005), welches eine Rolle bei der Regulierung des circadianen Rhythmus zu spielen scheint, eng verwandt. Bei der NmU/NmS-Familie sind die letzten 7 Aminosäuren identisch.

In der Motte *Helicoverpa zea* befinden sich die Peptide PBAN (pheromone biosynthesis-activating-neuropeptide) und PGN-8 (PBAN-encoding gene neuropeptide 8) auf demselben Prä-Propeptid (Choi et al., 2003; Hull et al., 2005). Durch zusätzliche Sequenzanalysen und funktionelle Studien der Aktivität dieser Peptide ist der C-Terminus wohl der wichtigste Teil für die Aktivierung des Rezeptors, während die Variabilität des N-Terminus in dieser Hinsicht nur eine geringe Rolle zu spielen scheint. Das PBAN Prä-Propeptid ist homolog zum Hugin-Prä-Propeptid (Abb 3.10).

3.5.2 Prozessierung der Prä-Propeptide PBAN und Hugin

Frühere Studien gingen davon aus, dass das Hugin Prä-Propeptid zwei Neuropeptide enthält (Meng et al., 2002): *hugin-γ* und PK-2. Beide Peptide besitzen die Pyrokinin-Sequenz (PRLa-Motiv) am C-Terminus. Außerdem konnte durch bioinformatische und biochemische Studien gezeigt werden, dass die *Drosophila*-Gene CG8784 und CG8795 eng verwandte G-Proteingekoppelte-Rezeptoren kodieren, welche beide sowohl mit *hugin-γ*, als auch mit PK-2 aktiviert werden können (Park et al., 2002; Rosenkilde et al., 2003). Diese Beobachtung

fürte zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei beiden Peptiden um funktionelle Neuropeptide handelt.

Andererseits konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen isolierter Hugin-Zellen nur PK-2, jedoch nicht hugin- γ detektiert werden (Neupert et al., 2007). Weiterhin konnte nur PK-2, nicht aber hugin- γ in den Corpora cardiaca der Ringdrüse von *Drosophila melanogaster* (Predel et al., 1999; Wegener et al., 2006) oder anderen *Drosophila*-Arten nachgewiesen werden. Natürlich sollten negative Ergebnisse stets vorsichtig interpretiert werden. Die aktuellen Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass hugin- γ nicht produziert wird. Somit geht nur ein chemisch identifiziertes funktionelles Neuropeptid aus dem Hugin Prä-Propeptid hervor, während in der Motte fünf identifizierte funktionsfähige Neuropeptide aus dem homologen PBAN Prä-Propeptid entstehen (Abb 3.10). Im Diskussionsteil dieser Arbeit wird versucht, dieses Problem aus evolutionärer Sichtweise zu erklären (siehe Diskussion 4.2).

3.5.3 Hugin und PBAN: Zwei konservierte neuronale Netzwerke

Aufgrund aktueller genomischer Daten (Abb 3.10) wird vermutet, dass das Gen, welches PBAN in Motten kodiert, das Homolog zum *hugin*-Gen aus *Drosophila* ist. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Rezeptoren von PBAN eine sehr hohe Sequenzhomologie zu den Neuromedin U-Rezeptoren aus Säugern, wie auch zu den Hugin-Rezeptoren CG8795 und CG8784 aufweisen (Choi et al., 2003; Hull et al., 2004). PBAN ist außerdem in der Lage den Hugin-Rezeptor (CG8795) aus *Drosophila* zu aktivieren. NmU wiederum kann den PBAN-Rezeptor aktivieren (Choi et al., 2003). Die Ansicht, dass PBAN und Hugin von homologen Genen kodiert werden, wird durch neuroanatomische Studien in verschiedenen Insekten weiter untermauert. Hierbei wird deutlich, dass das Netzwerk der Neurone, die diese Gene exprimieren, eine ähnliche morphologische Struktur aufweisen. Im Tabakswärmer, *Manduca sexta*, wird PBAN in bestimmten Clustern im SOG exprimiert, von denen jedes ein bestimmtes Projektionsziel hat (Davis et al., 1996). Drei der identifizierten Zielregionen sind die Corpora cardiaca, das ventrale Nervensystem und das Protocerebrum. Dies sind ebenfalls die Zielregionen der Hugin-Neurone. Die Neurone, die das Protocerebrum innervieren, zeigen, genau wie die Hugin-Neurone, Verästelungen im Bereich des Tritocerebrums (Abb. 3.11 D). Der Antikörper gegen PBAN markiert bestimmte Neurone in *Drosophila* (Choi et al., 2001), deren Projektionsmuster denen der Hugin-Neurone

Ergebnisse

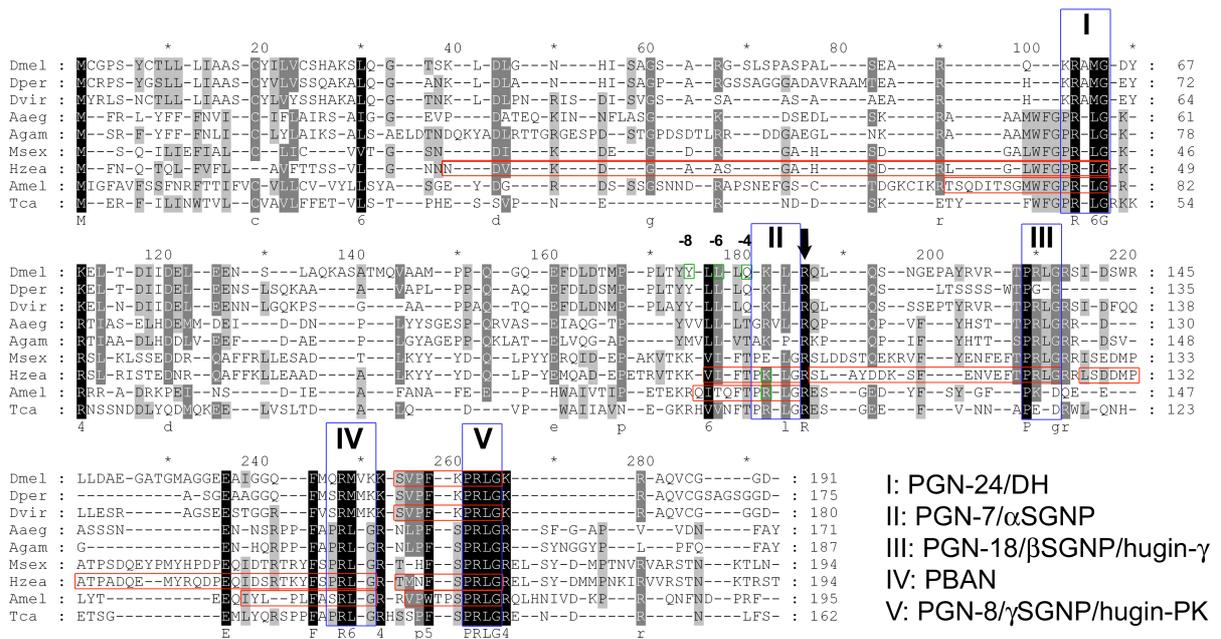


Abbildung 3.10: Vergleich der Prozessierung der Prä-Propeptide von PBAN und Hugin. Sequenzvergleich der Hugin/PBAN Prä-Propeptide der Diptera: *Drosophila melanogaster*, *D.persimilis*, *D. virilis*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, Lepidoptera: *Manduca sexta*, *Helicoverpa zea*, Hymenoptera: *Apis mellifera*, Coleoptera: *Tribolium castaneum*. Chemisch identifizierte Peptide (Hummon et al., 2006; Li et al., 2008; Ma et al., 2000; Predel et al., 2004; Wegener et al., 2006) sind rot umrahmt, die PRXamid C-Termini sind blau umrahmt. Die Bezeichnungen der Peptide (römische Zahlen) beziehen sich auf gebräuchliche Bezeichnungen aus *M. sexta*, *H. zea*, und *D. melanogaster*. Man beachte, dass die Peptide unter V die einzigen sind, deren C-Termini in allen Ordnungen vollständig konserviert sind. Die putative N-terminale Schnittstelle von hugin-γ wird durch einen Pfeil markiert. In *Drosophila* fehlen basische Reste an wichtigen Positionen -4, -6, -8 (grün umrahmt). Basische Reste können jedoch an der Position -4 bei der Biene und *H. zea* gefunden werden. Die Existenz beider Peptide konnte biochemisch nachgewiesen werden. PGN: PBAN-encoding gene neuropeptides; SGNP: subesophageal ganglion neuropeptide; DH: diapause hormone.

ähnelt. Um diesen Sachverhalt endgültig zu verifizieren, wurden die Neurone, die Hugin und PBAN exprimieren, durch eine Doppelfärbung im Gehirn einer *Drosophila*-Larve sichtbar gemacht. Wie in Abb. 3.11 zu erkennen ist, sind alle Hugin-Neurone durch den Antikörper gegen PBAN markiert. Außerdem konnten mehrere Neurone im SOG entdeckt werden, welche positiv für PBAN sind, in denen *hugin* jedoch nicht exprimiert ist; einige dieser Neurone sind wahrscheinlich Zellen, die das Neuropeptid CAPA (auch bekannt als PK-1) herstellen, welches ebenfalls zur Gruppe der PRXamide gehört (Abb. 3.11). Die auffällige neuroanatomische Ähnlichkeit zusammen mit der Sequenzanalyse (Bader et al., 2007b) unterstützen die Hypothese, dass es sich bei PBAN und *hugin* um homologe Gene handelt, die in homologen neuronalen Netzwerken exprimiert werden.

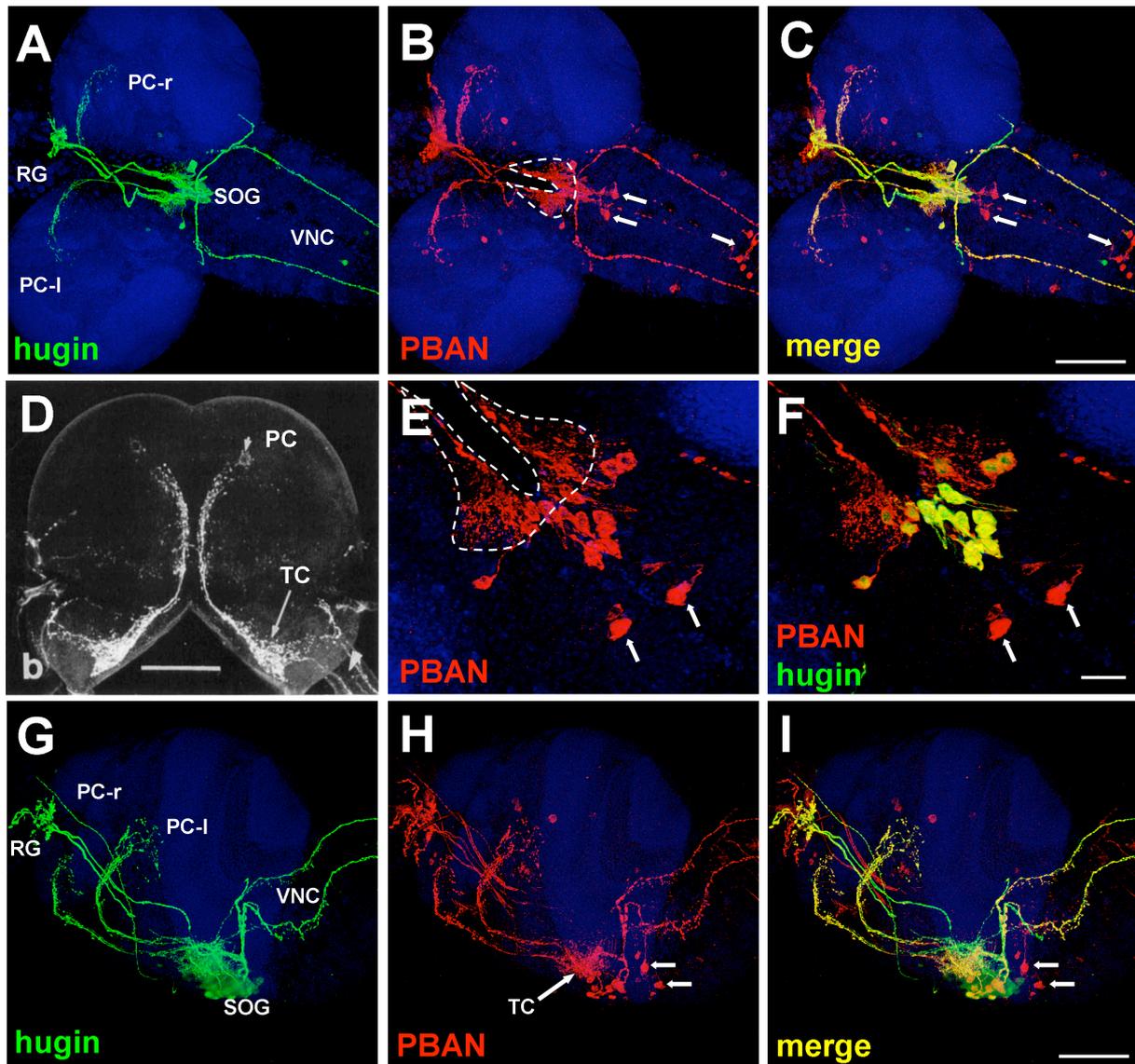


Abbildung 3.11: Co-Lokalisation von Hugin und PBAN im *Drosophila*-Gehirn. A-C: Gehirn einer *Drosophila*-Larve, welche YFP unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors exprimiert. Antikörper gegen GFP und gegen PBAN wurden benutzt. Eine ausgeprägte Überschneidung der Projektionen der Neuriten ist zu erkennen. Die ungefähre Lage des Tritocerebrums ist durch die gestrichelte Linie hervorgehoben. **D:** PBAN-Färbung in einer Larve im dritten Larval-Stadium von *Manduca sexta*. Der kleine Pfeil auf der dorsalen Seite markiert das Protocerebrum. Dort enden die Projektionen. Der lange Pfeil unten rechts deutet auf die dendritischen Verästelungen im Tritocerebrum. Das Bild stammt von Davis et al. (Davis et al., 1996). Die Buchstaben PC (Protocerebrum) und TC (Tritocerebrum) wurden nachträglich hinzugefügt. **E,F:** Gleiches Gehirn wie in A-C, jedoch ist der Fokus auf den Zellkörpern im SOG. Alle Hugin-Zellen werden vom PBAN-Antikörper gefärbt. Die ungefähre Lage des Tritocerebrums ist durch die gestrichelte Linie angedeutet. **G-I:** Seitenansicht der Co-Lokalisation von Hugin und PBAN im Gehirn einer Larve. Die ungefähre Lage des Tritocerebrums wird durch den Pfeil in H angedeutet. PC-r und PC-l markieren die linke und die rechte Hemisphäre des Protocerebrums. RG: Ringdrüse; SOG: suboesophageales Ganglion; VNC: ventrales Nervensystem; Die weißen Pfeile (außer in D und TC in H) markieren die CAPA-Zellen. Zellkerne sind durch Draq5 gefärbt und blau dargestellt. Der Maßstab beträgt 100 μ m (C und I) oder 20 μ m (F) (Bader et al., 2007b). Verwendete primäre Antikörper: α -GFP-m (A-C,E-I), α -PBAN (A-I).

3.5.4 Hugin in der Honigbiene *Apis mellifera*

Wie bereits in Kapitel 3.5.2. erwähnt, besitzt die Honigbiene, *Apis mellifera*, ebenfalls ein zum Hugin-Prä-Propeptid homologes Protein. Dieses wird in vier verschiedene, chemisch identifizierte Peptide geschnitten (Abb. 3.10). Um herauszufinden, ob die Zellen, die dieses Prä-Propeptid exprimieren, oder in denen sich zumindest eines der funktionellen Neuropeptide befindet, ähnlich organisiert sind wie die Hugin-Zellen in *Drosophila melanogaster*, wurden Gehirne von ausgewachsenen Arbeiterbienen sowie von Larven präpariert und mit einem Antikörper inkubiert, der *Drosophila*-PK-2 erkennt. Sowohl das Larven-Gehirn, als auch das Gehirn der ausgewachsenen Biene ist ähnlich organisiert wie das Gehirn einer adulten Fruchtfliege. Außer der Größe gibt es zwischen den Gehirnen der beiden verschiedenen Bienenstadien keinen nennenswerten Unterschied.

Im Gehirn der adulten Arbeiterbiene konnten zwei Zellen mit dem PK-2-Antikörper detektiert werden, die sich beide im SOG befinden. Neurite konnten nicht nachgewiesen werden, was mit der Tatsache zusammenhängen mag, dass das Gewebe zu massiv ist, um mit dem Laser-Scanning-Mikroskop tief genug eindringen zu können.

Bei der Bienen-Larve konnten acht Zellen detektiert werden, die in Zweier-Gruppen organisiert sind. Diese befinden sich ausnahmslos im SOG. Es ist deutlich zu erkennen, dass es sich bei den gefärbten Zellen um ein neuronales Netzwerk handelt, das dem Netzwerk der Hugin-Neurone in *Drosophila* ähnlich ist. So scheinen die Zellen über Nervenfasern miteinander verbunden zu sein, die sich unterhalb des ösophagealen Foramens überschneiden. Diese Nervenfasern projizieren symmetrisch in die Region lateral des Foramens. Vermutlich detektiert der *Drosophila*-PK-2-Antikörper eines der Peptide, die die Konsensus-Sequenz FxPRx enthalten, oder das Prä-Propeptid selbst. Man kann deutlich erkennen, dass die Morphologie des Hugin-Netzwerkes aus *Drosophila* in den aus evolutionärer Sicht betrachteten „altertümlicheren“ Bienen konserviert ist. Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um einen homologen neuronalen Schaltkreis handelt. Ob die Funktion ebenfalls beibehalten wurde, oder ob dieses neuronale Netzwerk noch in anderen Insekten konserviert ist, ist sicherlich von Relevanz, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht ermittelt werden.

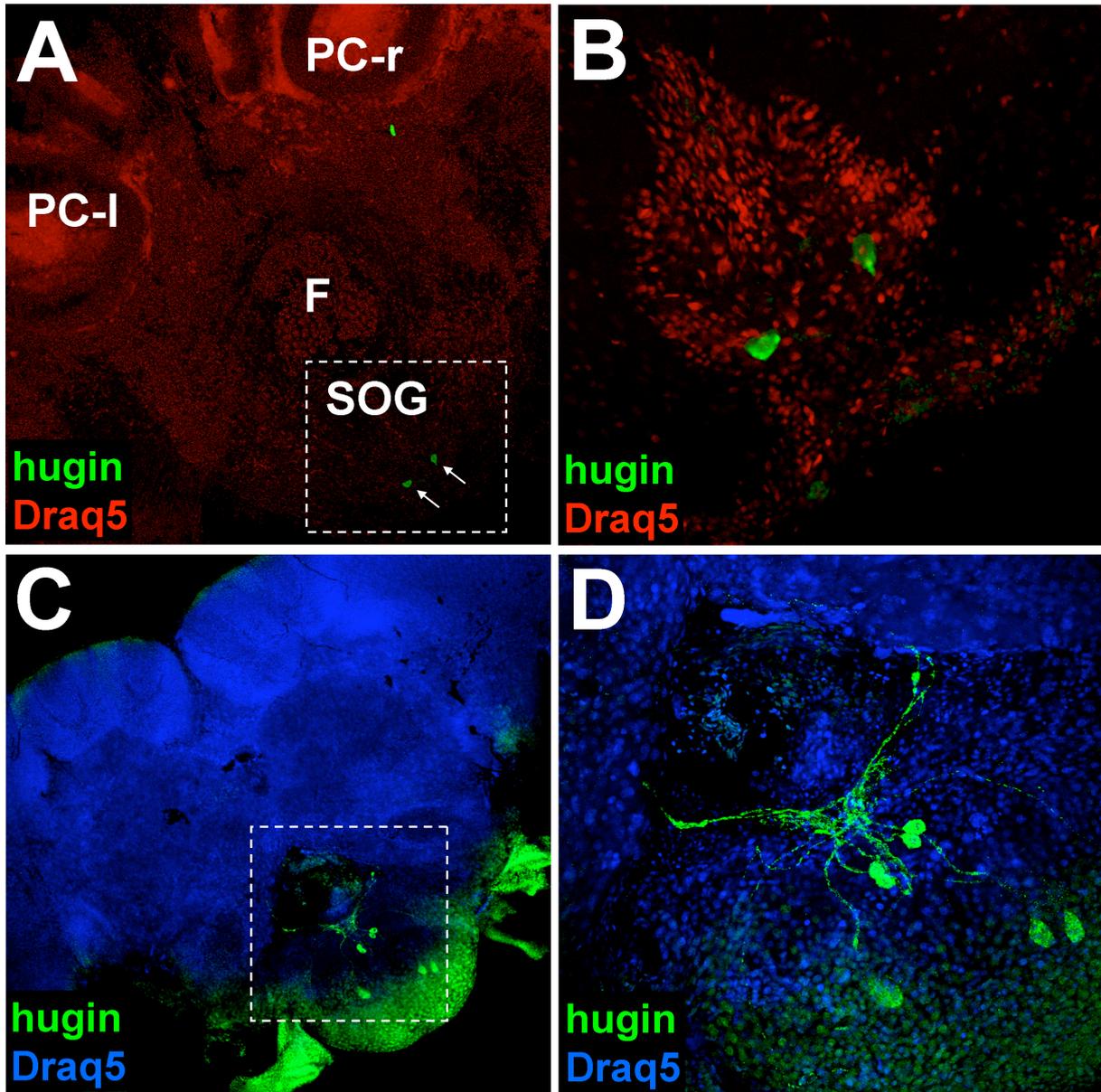


Abbildung 3.12: Hugin in der Honigbiene *Apis mellifera*. A,B: ZNS einer adulten Honigbiene. Zwei Zellen (Pfeile) im SOG wurden durch den Antikörper gegen *Drosophila* PK-2 angefärbt. B zeigt die Vergrößerung des in A durch eine gestrichelte Linie markierten Bereiches. PC-r: rechte Seite des Protocerebrums; PC-l linke Seite des Protocerebrums; F: Foramen; SOG: suboesophageales Ganglion. C,D: ZNS einer *Apis mellifera* Larve. Die acht markierten Zellen wurden ebenfalls durch Inkubation mit dem *Drosophila* PK-2 Antikörper angefärbt. D zeigt die Vergrößerung des in C durch eine gestrichelte Linie markierten Bereiches. Die acht gefärbten Zellen (grün) liegen alle im SOG und senden Neuriten zu einer Region lateral des Foramens. Die grüne Färbung am ventralen Ende des SOG ist unspezifischer Hintergrund. Zellkerne wurden mit Draq5 markiert. Verwendeter primärer Antikörper: α -PK-2-rb.

3.6 Hugin und Insulin: zwei neuronale Schaltkreise im *Drosophila* ZNS

Insulin spielt eine entscheidende Rolle bei der Koordination des Stoffwechsels in verschiedenen Geweben und Organen, die auf veränderte Nahrungsbedingungen reagieren müssen. *Drosophila* besitzt sieben Insulin-artige Peptide (*Drosophila* insulin-like peptides, Dilps) (Brogiolo et al., 2001). Diese werden in verschiedenen Geweben exprimiert. Drei der Dilps werden in denselben Neuronen im ZNS von *Drosophila* hergestellt. Diese werden als Insulin-produzierende Zellen (IPZs) bezeichnet. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen Kohlehydrat-Homöostase, Wachstum und Langlebigkeit steuern (Broughton et al., 2005; Buch et al., 2008; Ikeya et al., 2002; Rulifson et al., 2002).

Ein Großteil der existierenden Arbeiten über *Drosophila*-Insulin befasst sich mit der Erforschung der Verwandtschaft zu Insulin aus Säugetieren, sowie der Untersuchung, welche Rolle Insulin bei der Verlängerung der Lebenszeit spielt. Dagegen wurde der Funktion der verschiedenen Axonprojektionen der IPZs bisher wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Die Neurite der IPZs innervieren drei spezifische Zielgebiete. Eines davon ist die Aorta, welche für den Kreislauf der Hämolymphe von *Drosophila* verantwortlich ist. Daher wird allgemein angenommen, dass dies der Weg ist, auf welchem Insulin das Gehirn verlässt, um an periphere Gewebe -wie zum Beispiel den Fettkörper- zu gelangen. Ein weiteres Ziel der IPZs sind die Corpora cardiaca (CC). Die CC liegen außerhalb des ZNS und werden mit diesem über Nervenfasern verbunden, die zu verschiedenen neurosekretorischen Zellen innerhalb des ZNS gehören (Siegmund und Korge, 2001). Die IPZs, sowie die Hugin-produzierenden Neurone, gehören zu dieser Gruppe von Zellen. Die Zellen, die sich in den CC befinden, produzieren wiederum das sogenannte adipokinetische Hormon (AKH), welches analog zum Glukagon der Säugetiere ist und damit eine entscheidende Rolle bei der Zuckerhomöostase spielt (Kim und Rulifson, 2004; Lee und Park, 2004). Das dritte Zielgebiet, welches von den IPZs innerviert wird, ist das SOG. In keiner der bisher veröffentlichten Studien wurden Zielzellen von den IPZs im SOG identifiziert oder beschrieben.

3.6.1 Hugin und Insulin: Verbindung zwischen zwei neuronalen Schaltkreisen

Um herauszufinden, wie die beiden neuronalen Schaltkreise in Relation zueinander liegen, wurden die entsprechenden Zellen mit Antikörpern gegen Hugin beziehungsweise Insulin angefärbt. Für die Hugin-Färbung wurde ein Antikörper gegen das PK-2 Protein aus

Meerschweinchen verwendet, für die Insulin-Färbung wurde ein Antikörper gegen Teile der Dilp2 α -Untereinheit, der β -Untereinheit, sowie des gesamten C-Peptids benutzt. Die Zellkörper beider Schaltkreise liegen in verschiedenen Gehirnzentren. Während die IPZs in zwei Gruppen im posterioren Teil des Protocerebrums liegen, befinden sich die Hugin-Neurone im SOG (Abb. 3.13 A). Die Neurite beider Zelltypen weisen jedoch deutliche Überschneidungen auf. So liegen zum Beispiel die Neurite, welche vom SOG lateral des Foramens in Richtung Protocerebrum projizieren, gut sichtbar übereinander. Sehr bemerkenswert ist die Tatsache, dass sich Verästelungen beider Schaltkreise im Tritocerebrum überschneiden (Abb. 3.13 B). Hier könnte aus morphologischer Sicht ein Informationsaustausch zwischen den beiden neuronalen Schaltkreisen stattfinden. Es handelt sich hierbei um dieselbe Region, die auch von Axon-Enden bestimmter gustatorischer Rezeptor-Neurone innerviert wird (siehe Kapitel 3.4.1) und die Dendriten der Hugin-Neurone beherbergt (Kapitel 3.3). Neben den Überschneidungen der Neuriten kann das Dilp2-Protein auch in Zellen nachgewiesen werden, in denen es nicht exprimiert wird. Wenn durch eine Doppelfärbung Hugin und Dilp2 sichtbar gemacht werden, lässt sich erkennen, dass Dilp2 unter anderem in einigen Hugin-Zellen nachweisbar ist. Jedoch nicht alle Hugin-Zellen enthalten Dilp2, sondern nur die Gruppe, deren Neurite das Protocerebrum innervieren. Die Dilp2-positiven Hugin-Zellen sind in Abbildung 3.13 C durch die weißen Pfeile hervorgehoben. Eine andere Gruppe von Zellen, in denen man Dilp2 nachweisen kann, sind die AKH-Zellen der Corpora cardiaca, die durch die grünen Pfeile markiert sind. Kim und Rulifson beschrieben in ihrem Artikel die Anwesenheit von Dilp2 in den AKH-Zellen der Corpora cardiaca (Kim und Rulifson, 2004). Dass es sich bei den Dilp2-positiven Zellen im SOG um eine bestimmte Gruppe Hugin-positiver Neurone handelt, war bisher noch nicht bekannt.

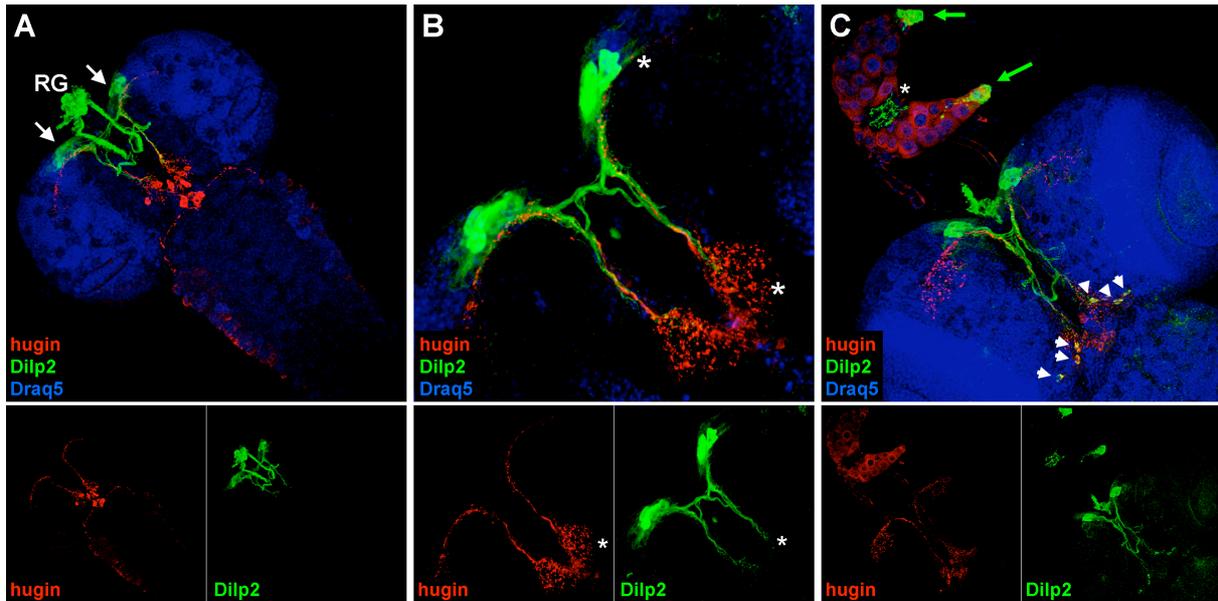


Abbildung 3.13: Hugin und Insulin: morphologischer Zusammenhang zwischen zwei neuronalen Schaltkreisen. Die Abbildung zeigt verschiedene Gehirne von *Drosophila*-Larven, bei denen durch entsprechende Antikörperfärbungen sowohl Hugin als auch Dilp2 sichtbar gemacht wurde. Der Anti-Hugin Antikörper erkennt die PK-2 Sequenz (rot), während der Anti-Insulin-Antikörper Teile der α -Untereinheit und der β - Untereinheit sowie das gesamte C-Peptid von Dilp2 erkennt. Zur Markierung der Zellkerne wurde Draq5 verwendet. In den kleineren Bildern sind der Hugin-Kanal und der Insulin-Kanal voneinander getrennt sichtbar. **A:** In der Abbildung sind die Zellkörper der IPZs im Protocerebrum zu erkennen (Pfeile) sowie die sich im SOG befindenden Hugin-Neurone. Deutlich zu erkennen ist die Innervierung der Ringdrüse (RG) und des SOGs durch die IPZs. **B:** Diese Abbildung zeigt eine Vergrößerung eines Teils des Protocerebrums, sowie das Tritocerebrum. Die Sterne markieren mögliche Interaktionspunkte beider neuronaler Schaltkreise. Besonders im Tritocerebrum (unterer Stern) wird deutlich, dass beide Schaltkreise Verästelungen im selben Zielgebiet ausbilden. **C:** Gehirn mit abgerissener, aber unversehrter Ringdrüse. Die grünen Pfeile zeigen auf die AKH-Zellen der CC, in denen Dilp2 nachgewiesen werden kann. Die weißen Pfeile markieren Dilp2-positive Hugin-Neurone. Verwendete primäre Antikörper: α -dilp2 (RU) (A-C), α -hug-gp (A-C).

3.6.2 Dilp2 wird nicht in den Hugin-Zellen exprimiert

Um herauszufinden, ob es sich bei dem Dilp2 Signal in den Hugin-Neuronen um Expression oder Transport handelt, wurde zunächst eine InSitu-Hybridisierung mit einer Dilp2-RNA-Sonde durchgeführt (Abb. 3.14 A). Neben der schon beschriebenen Expression in den IPZs im Protocerebrum konnten jedoch selbst nach langer Inkubationszeit keine weiteren Zellen identifiziert werden. Auch in einer Linie, die GFP unter der Kontrolle des *dilp2*-Promotors exprimiert, konnte GFP nur in den IPZs nachgewiesen werden (Abb. 3.14 E). Nur unter Verwendung des Antikörpers gegen das Dilp2-Protein (Abb. 3.14 B und F) werden neben den IPZs andere Zellen angefärbt. Natürlich sollte Dilp2 aufgrund seiner Funktion in der Kohlehydrat-Homöostase in jeder Zelle zu finden sein. Dies ist jedoch in so geringen Mengen

nicht mit den Antikörpern detektierbar. Umso beachtlicher ist die Tatsache, dass in einigen Neuronen das Dilp2-Signal so deutlich sichtbar ist. Zur Verifizierung, dass es sich bei den Dilp2-positiven Zellen im SOG um die Hugin-Neurone handelt, wurden verschiedene Doppelfärbungen durchgeführt. In Abbildung 3.14 B-D ist ein Gehirn einer *Drosophila*-Larve, die GFP unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors exprimiert, zu sehen. Bei gleichzeitiger Immunfärbung gegen Dilp2 wird deutlich, dass es sich wirklich um die lateralen Hugin-Neurone handelt. In Abb. 3.14 E-H handelt es sich um ein Gehirn einer *Drosophila* Larve, die GFP unter der Kontrolle des *dilp2*-Promotors exprimiert. Bei der Färbung gegen GFP sind -außer den IPZs am oberen Bildrand- keine weiteren Zellen markiert (Abb. 3.14 E). Dies lässt darauf schließen, dass es keine weitere Dilp2 Expression neben der in den IPZs gibt. Das Dilp2-Protein jedoch ist wiederum in den lateralen Hugin-Zellen zu finden, was man anhand der Doppelfärbung gegen das Dilp-Protein (Abb. 3.14 F) und das Hugin-Protein (Abb. 3.14 G) erkennen kann. In der Überlagerung der Kanäle ist die Co-Lokalisation von Hugin und Dilp2 an der hellblauen Farbe zu sehen.

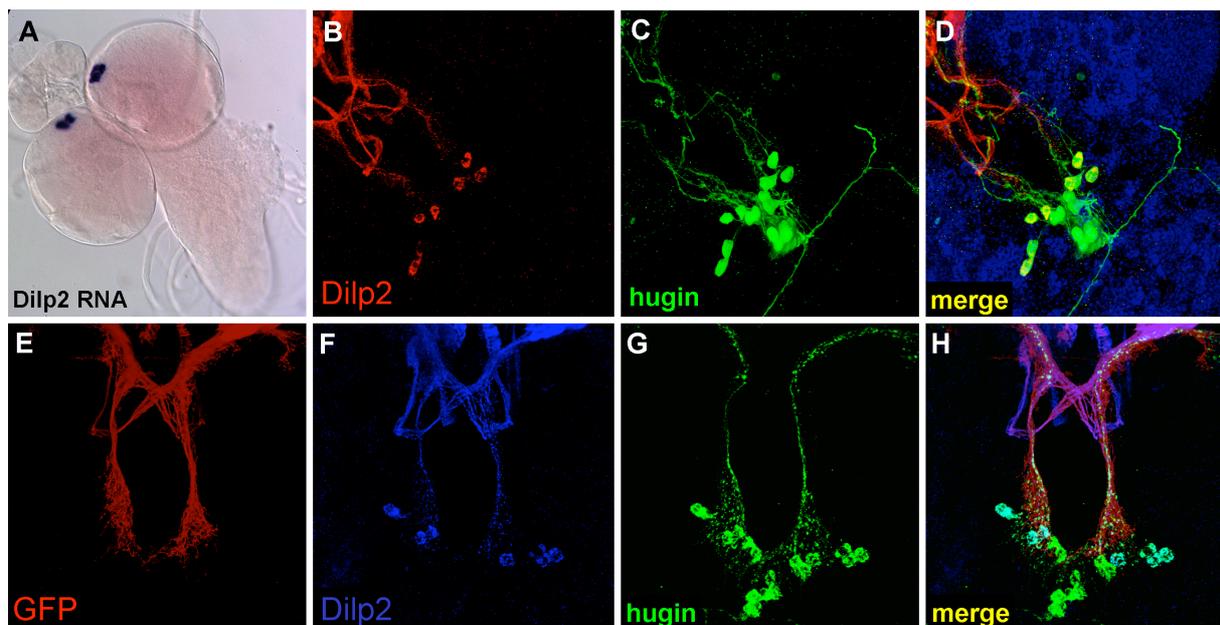


Abbildung 3.14: Dilp2-Transport in die lateralen Hugin-Neurone. **A:** Zentrales Nervensystem einer *Drosophila*-Larve. Die IPZs wurden durch eine InSitu-Hybridisierung unter Verwendung einer RNA-Sonde gegen *dilp2*-mRNA angefärbt (violett). **B-D:** Ausschnitt aus dem Gehirn einer *Drosophila*-Larve, die GFP unter der Kontrolle eines *hugin*-Promotors exprimiert. Zusätzlich wurde eine Immunfärbung gegen Dilp2 durchgeführt (rot). Die Hugin-Neurone sind durch eine Färbung gegen GFP (C) sichtbar gemacht (grün). Bei der Überlagerung der Kanäle (D) sind die doppelt-positiven Zellen gelb zu sehen. **E-H:** Gehirn einer *Drosophila* Larve, die GFP unter der Kontrolle eines *dilp2*-Promotors synthetisiert. Es wurden Antikörper gegen GFP (E, rot), Dilp2 (F, blau) und Hugin (G, grün) verwendet. Bei der Überlagerung der Kanäle (H) sind die für Dilp2 und Hugin doppelt-positiven Zellen in hellblau zu sehen. Verwendete primäre Antikörper: α -dilp2 (RU) (B-H), α -GFP-m (B-H).

3.6.3 Expression von Imp-L2 in den lateralen Hugin-Zellen

Das imaginal morphogenesis-protein-late 2 (Imp-L2) aus *Drosophila* wurde kürzlich als das Homolog des insulin-like-growth-factor-binding-protein-7 (IGFBP-7) aus Säugetieren beschrieben (Honegger et al., 2008). Es wird angenommen, dass es direkt an den Liganden Dilp2 bindet und auf diese Weise den Insulin-Signal-Weg negativ reguliert. Eine immunohistochemische Färbung von Imp-L2 in Larven zeigt, dass das Protein neben der starken Expression in den CC außerdem schwach in den IPZs zu finden ist und Neuriten der Imp-L2-positiven Zellen die CC, die Aorta, das Herz sowie das SOG innervieren (Cao und Brown, 2001; Rulifson et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Imp-L2 an menschliches Insulin und Insulin-verwandte Proteine binden kann (Andersen et al., 2000). Um herauszufinden, ob Imp-L2 in den Hugin-Neuronen zu finden ist, wurden Immunfärbungen gegen Hugin und gegen Imp-L2 angefertigt. Dabei wurde deutlich, dass es sich bei einigen der Imp-L2-positiven Zellen im SOG tatsächlich um Hugin-Neurone handelt. (Abb. 3.15 B). Auffällig ist, dass genau die Hugin-Neurone Imp-L2-positiv sind, in denen auch Dilp2 detektiert werden kann. Hierbei handelt es sich, wie schon zuvor beschrieben, um die lateralen Hugin-positiven Neurone, deren Neurite in das Protocerebrum projizieren. Imp-L2-positive Neurone zeigen dasselbe Projektionsmuster (Abb. 3.15 A).

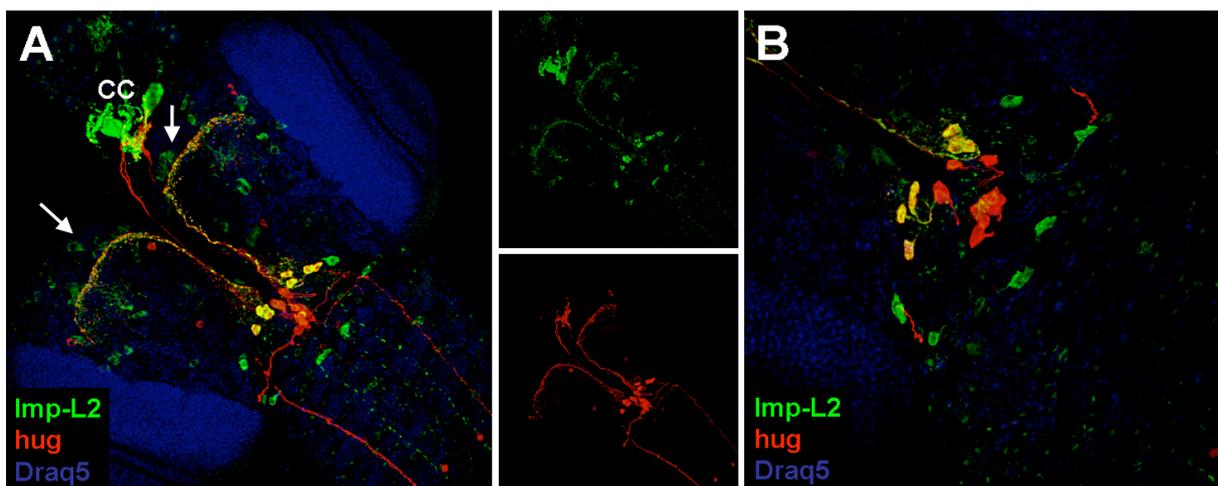


Abbildung 3.15: Co-Lokalisation von Hugin und IMP-L2. A,B: Zwei unterschiedliche Gehirne von *Drosophila*-Larven, die YFP unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors exprimieren. Immunfärbungen wurden gegen YFP (rot) und Imp-L2 (grün) durchgeführt. In den kleineren Bildern rechts neben A sind die Kanäle voneinander getrennt dargestellt. Auffällig ist, dass Imp-L2 ein ähnliches Projektionsmuster wie die das Protocerebrum innervierenden lateralen Hugin-Neurone, aufweist. Die IPZs (Pfeile) und die Zellen in den CC sind ebenfalls Imp-L2-positiv. B: Vergrößerung des SOGs. Co-Lokalisation von Hugin und Imp-L2 ist an der gelben Färbung zu sehen. Imp-L2 ist überwiegend in der lateral gelegenen Gruppe der Hugin-Neurone zu finden. Verwendete primäre Antikörper: α -Imp-L2 (A,B), α -hug-rb, (A,B).

3.6.4 Aktivität der Insulin-Signal-Kaskade in den Hugin-Neuronen

Um herauszufinden, ob sich die Aktivität des Insulin-Signal-Weges in den lateralen Hugin-Zellen, die durch den α -Dilp2-Antikörper angefärbt sind, von der Aktivität in den medianen Zellen, bei denen Dilp2 nicht nachgewiesen werden kann, unterscheidet, wurde das tGPH-Konstrukt benutzt. Dieses Fusionsprotein wurde als *in vivo* Reporter für die Aktivität der im Insulin-Signalweg vorkommenden phosphoinositide-3-kinase (PI3K) verwendet. Hierbei wurde die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) des *Drosophila*-Proteins Steppke an GFP fusioniert. Das kodierende Gen wurde zur ubiquitären Expression unter die Kontrolle des

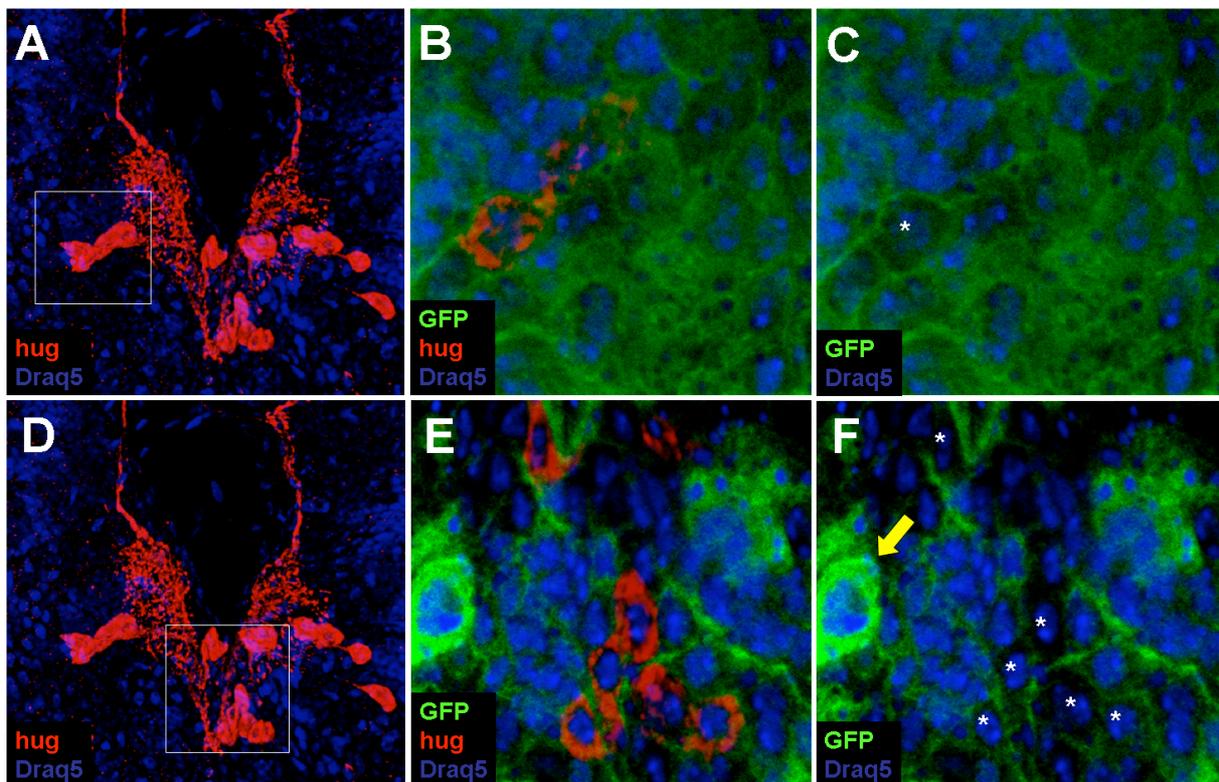


Abbildung 3.16: Aktivität des Insulin-Signal-Weges in den Hugin-Neuronen. Alle Bilder dieser Abbildung zeigen ein Gehirn einer *Drosophila*-Larve, die tGPH exprimiert. Hugin (rot) wurde mit einem Anti-PK-2-Antikörper sichtbar gemacht, GFP (grün) wurde mit einem Anti-GFP-Antikörper detektiert und die Zellkerne wurden durch Draaq5 sichtbar gemacht. **A,D:** Überblick über das untersuchte Gehirn, der Fokus liegt auf den Hugin-Zellen im SOG. Die durch Rechtecke markierten Regionen sind in den Bildern rechts daneben mit 3000facher Endvergrößerung dargestellt. **B,C:** Laterale Hugin-Zellen mit und ohne Markierung der Hugin-Zellen. **E,F:** Mediane Hugin-Zellen mit und ohne Markierung der Hugin-Zellen. Die Hugin-Zellen sind in C und F durch Sterne markiert, der Hugin-Kanal (rot) wird zur besseren Erkennung der GFP-Verteilung in den Hugin-positiven Zellen nicht dargestellt. Der gelbe Pfeil markiert eine Zelle, bei der die GFP-Verteilung gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt ist. Bei den Hugin-positiven Zellen ist das GFP eher membranständig. Verwendete primäre Antikörper: α -GFP-m (A-F), α -PK-2 (A-F).

Drosophila β -tubulin-Promotors gestellt. Die PH-Domäne bindet spezifisch an phosphatidylinositol-3,4,5-P₃ (PIP₃), ein sekundärer Botenstoff (second messenger), der durch PI3-Kinasen der Klasse I hergestellt wird (Gray et al., 1999; Lietzke et al., 2000). PIP₃ befindet sich ausschließlich an der Zellmembran und rekrutiert Proteine mit PH-Domäne, sobald die PIP₃-Konzentration durch die PI3K erhöht wird. Auf diese Weise dient das tGPH-Protein als Reporter für PI3K-Aktivität, die bei der Insulin-Signal-Kaskade eine entscheidende Rolle spielt. Die Funktionalität dieses Proteins wurde für einige Gewebe und Organe in *Drosophila* bereits beschrieben (Britton et al., 2002), für das ZNS liegen bisher noch keine Daten vor. Bei der Markierung der Hugin-positiven Neurone durch einen Antikörper gegen PK-2 wird deutlich, dass sowohl in den Dilp2-positiven lateralen Hugin-Zellen (Abb. 3.16 B,C), als auch in den medianen Hugin-Zellen (Abb. 3.16 E,F), in denen Dilp2 nicht nachgewiesen werden kann, eine ähnliche Verteilung des Reporter-Proteins vorliegt. Die Lokalisation von tGPH an der Membran zeigt an, dass die Insulin-Signal-Kaskade in beiden Zelltypen trotz der unterschiedlichen Menge an Dilp2 vergleichbare Aktivität aufweist (vgl. Abb. 3.16 C und F). Dass es im Gehirn auch eine cytoplasmatische Lokalisation des Reporters gibt, zeigt die mit einem gelben Pfeil markierte Zelle in Abb. 3.16 F, die als interne Kontrolle gesehen werden kann.

3.6.5 Dilp2-Aufnahme kann durch Überexpression des *Drosophila*-Insulin-Rezeptors (dInR) verstärkt werden

Um herauszufinden, ob die Dilp2-Aufnahme durch Hugin-Zellen beeinflusst werden kann, wurde zunächst der dInR durch eine UAS-Insulin-Rezeptor-Linie in den Hugin-Zellen überexprimiert. Zur Kontrolle der Überexpression wurde eine Färbung des dInR mit einem Antikörper gegen den homologen menschlichen Insulin-Rezeptor durchgeführt (Abb. 3.17 A). Bei der Färbung gegen Dilp2 wird deutlich, dass die Überexpression des dInR zur Folge hat, dass man auch in den medianen Hugin-Zellen, die man unter Wildtyp-Bedingungen nicht detektieren kann, ein Signal für Dilp2 bekommt (Abb. 3.17 B,C). Außerdem kann man die Hugin-Neuriten, welche das Protocerebrum innervieren, mit dem α -Dilp2-Antikörper sichtbar machen (Abb. 3.17 B, weiße Pfeile). Dies könnte ein Indikator dafür sein, dass die Menge an Dilp2 in den lateralen Hugin-Zellen, welche im Wildtyp Dilp2-positiv sind, ebenfalls erhöht ist.

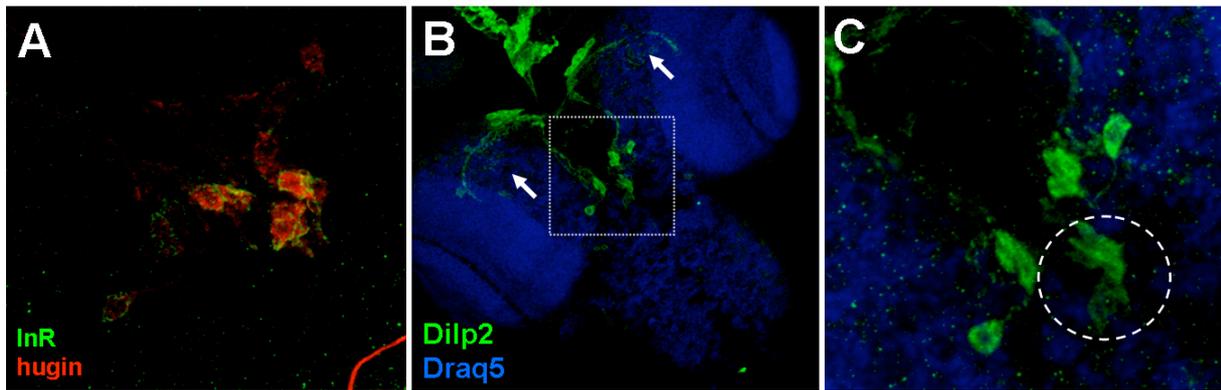


Abbildung 3.17: Überexpression des *Drosophila*-Insulin-Rezeptors (dInR) in den Hugin-Zellen. Die Abbildung zeigt die Gehirne zweier *Drosophila*-Larven, die den *Drosophila* InR unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors exprimieren. **A:** Vergrößerung des SOGs. Die Hugin-positiven Zellen (rot) wurden mit einem Antikörper gegen PK-2 angefärbt. Für die Färbung des dInR wurde ein Antikörper verwendet, der gegen den menschlichen Insulin-Rezeptor generiert wurde. **B:** Übersicht über das ZNS. Dilp2-positive Neurone wurden mit einem α -Dilp2-Antikörper angefärbt, Zellkerne wurden mit Draq5 sichtbar gemacht. Die vermehrte Aufnahme von Dilp2 in die lateralen Hugin-Zellen ist daran zu erkennen, dass Dilp2 -im Gegensatz zum Wildtyp- auch in den das Protocerebrum innervierenden Neuriten der Hugin-Zellen nachweisbar ist (weiße Pfeile). **C:** Vergrößerung des in B mit einem weißen Rechteck gekennzeichneten Ausschnitts. Man kann deutlich erkennen, dass Dilp2-im Gegensatz zum Wildtyp- auch in den medianen Hugin-Zellen (gestrichelte Linie) zu finden ist. Verwendete primäre Antikörper: α -InR (A), α -PK-2-gp (A), α -dilp2 (RU).

3.6.6 Die Internalisierung von Dilp2 in die Hugin-Zellen findet nicht über Rab5-positive Endosomen statt

Als nächstes stellt sich die Frage, auf welchem Weg Dilp2 in die Hugin-Zellen internalisiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings nur einige vorläufige Experimente durchgeführt werden. Einer der bekanntesten Marker für frühe Endosomen ist das Rab5-Protein. Rab5 ist eine kleine monomere GTPase, die bei der Verschmelzung von endocytotischen Vesikeln mit frühen Endosomen gebraucht wird. Es existiert neben dem Rab5-GFP-Fusionsprotein auch eine dominant negative Form von Rab5 (Rab5-DN), die ebenfalls mit GFP fusioniert wurde. Diese Proteine wurden benutzt, um die Rolle der Endocytose in zellulären Signalwegen zu erforschen (Seto und Bellen, 2006). Bei der Expression von dem Fusionsprotein Rab5-GFP in den Hugin-Neuronen und anschließender Färbung gegen GFP und gegen Dilp2 kann überprüft werden, ob Dilp2 in den Rab5-positiven Vesikeln co-lokalisiert ist. Dies ist jedoch nicht der Fall (Abb. 3.18 A). Die Rab5-positiven Vesikel können nicht durch den α -Dilp2-Antikörper detektiert werden. Dilp2 befindet sich also nicht in diesen Vesikeln.

Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurde im darauf folgenden Experiment die dominant-negative Mutation des Rab5-GFP-Fusionsproteins in den Hugin-Zellen exprimiert (Abb. 3.18 B). Neben der Fragmentierung der Rab5-positiven Vesikel kann auch die Anwesenheit von Dilp2 in diesen Zellen beobachtet werden. Trotz der in ihrer Funktion eingeschränkten Rab5-positiven Vesikel findet die Aufnahme von Dilp2 in diese Zellen statt. Es müssen also andere Mechanismen und Wege für die Aufnahme von Dilp2 verantwortlich sein.

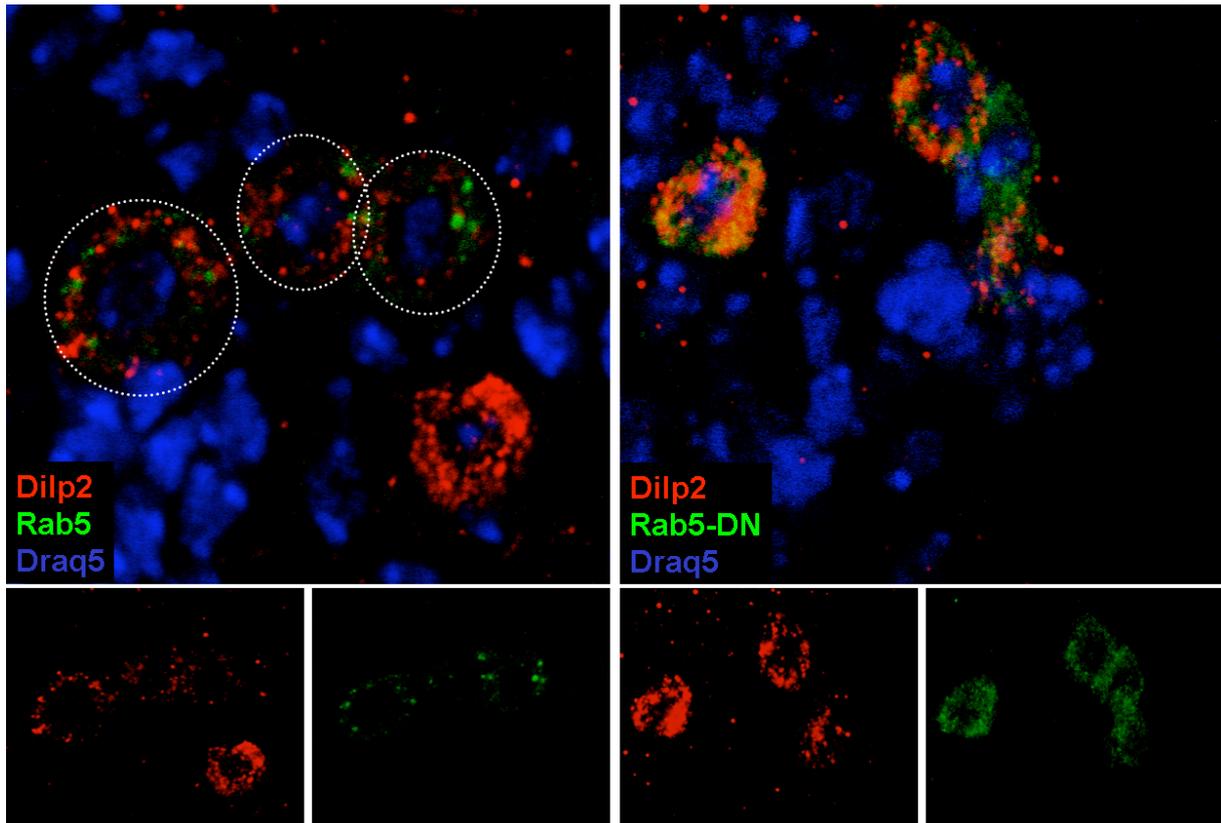


Abbildung 3.18: Expression von Rab5 und Rab5-DN in den Hugin-Zellen. Die Bilder zeigen Dilp2-positive Hugin-Zellen, in denen entweder das Fusionsprotein Rab5-GFP (Rab5), oder die dominant-negative Mutation Rab5-DN exprimiert wird. Die Zellen wurden mit 3000facher Vergrößerung gescannt. Nucleoli wurden mit Draq5 markiert. Die kleineren Bilder stellen Dilp2 und Rab5 getrennt voneinander dar. **A:** Die Dilp2-positiven Vesikel (rot) überlappen nicht mit den Rab5-positiven Vesikeln (grün). Die gestrichelten Linien markieren drei Zellen, die sowohl Rab5-GFP exprimieren, als auch positiv für Dilp2 sind. **B:** Expression der dominant-negativen Mutante von Rab5-GFP in den Dilp2-positiven Hugin-Zellen. Trotz der Fragmentierung der Rab5-DN-positiven Vesikel, findet eine Aufnahme von Dilp2 in diese Zellen statt. Verwendete primäre Antikörper: α -GFP-m (A,B), α -dilp2 (HA) (A,B).

4 Diskussion

4.1 Einzelne Hugin-Neurone innervieren nur eine der vier übergeordneten Zielregionen

Wenn man verstehen will, wie das Gehirn das Verhalten bestimmt, muss man sich zunächst mit der Morphologie der dafür verantwortlichen neuronalen Schaltkreise befassen. Es wurden bisher viele Verhaltenweisen studiert und viele Gene, welche dabei eine wichtige Rolle spielen, jedoch gibt es bisher relativ wenig Informationen über die neuronalen Schaltkreise, die Verhalten steuern. Der neuronale Hugin-Schaltkreis bietet die Möglichkeit, das Konnektivitätsmuster einer Gruppe von Neuronen, die an der Steuerung des Fressverhaltens beteiligt sind, auf dem Niveau einer einzelnen Zelle zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die 20 Hugin-Zellen aus vier Gruppen bestehen, deren Zellkörper sich relativ symmetrisch auf beiden Seiten der Mittellinie befinden: Acht dieser Zellen haben Neuriten, die das Protocerebrum innervieren, je vier Zellen projizieren in die Ringdrüse, den Pharynx und das ventrale Nervensystem (Abb. 4.1). Innerhalb einer neuronalen Klasse ist es möglich, dass einzelne Zellen unterschiedliche ipsi- und contralaterale Neuriten besitzen.

4.1.1 Einzelne Hugin-Neurone besitzen sich überlappende Neuriten an der Grenze des Foramens zum SOG

Zusätzlich zu ihren Neuriten, die eine der vier Hauptziele innervieren, besitzen einige Hugin-Zellen sich überlappende Nervenfasern in einer Region ventrolateral des Foramens. Diese Entdeckung verdeutlicht die Notwendigkeit der Untersuchung einzelner Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein neuronales Muster entdeckt werden, welches normalerweise aufgrund der sich überschneidenden Neuriten anderer Zellen nicht zu erkennen gewesen wäre. Die Gruppe der Hugin-Neurone, die in das Protocerebrum projiziert, hat beträchtliche Verästelungen in den seitlichen Bereichen des SOGs. Das ist eine Region, die von den Axonen der externen chemosensorischen Rezeptorneurone innerviert wird (Colomb et al., 2007). Diese Verästelungen überlappen mit den Axon-Enden der gustatorischen Rezeptorneurone. Ob es synaptische Kontakte gibt, ist jedoch nicht bekannt. Es könnte sich ebenfalls um eine Region handeln, in denen Neuropeptide sezerniert werden. Die Freisetzung der durch *hugin* kodierten Neuropeptide könnte die Weiterleitung von eingehenden gustatorischen

Signalen beeinflussen. Auf jeden Fall geht die Tatsache, dass die Verästelungen zu den in das Protocerebrum projizierenden Zellen gehören, mit der Überlegung einher, dass *hugin* die Weiterleitung gustatorischer Signale in höhere Gehirnzentren vermittelt (Melcher und Pankratz, 2005).

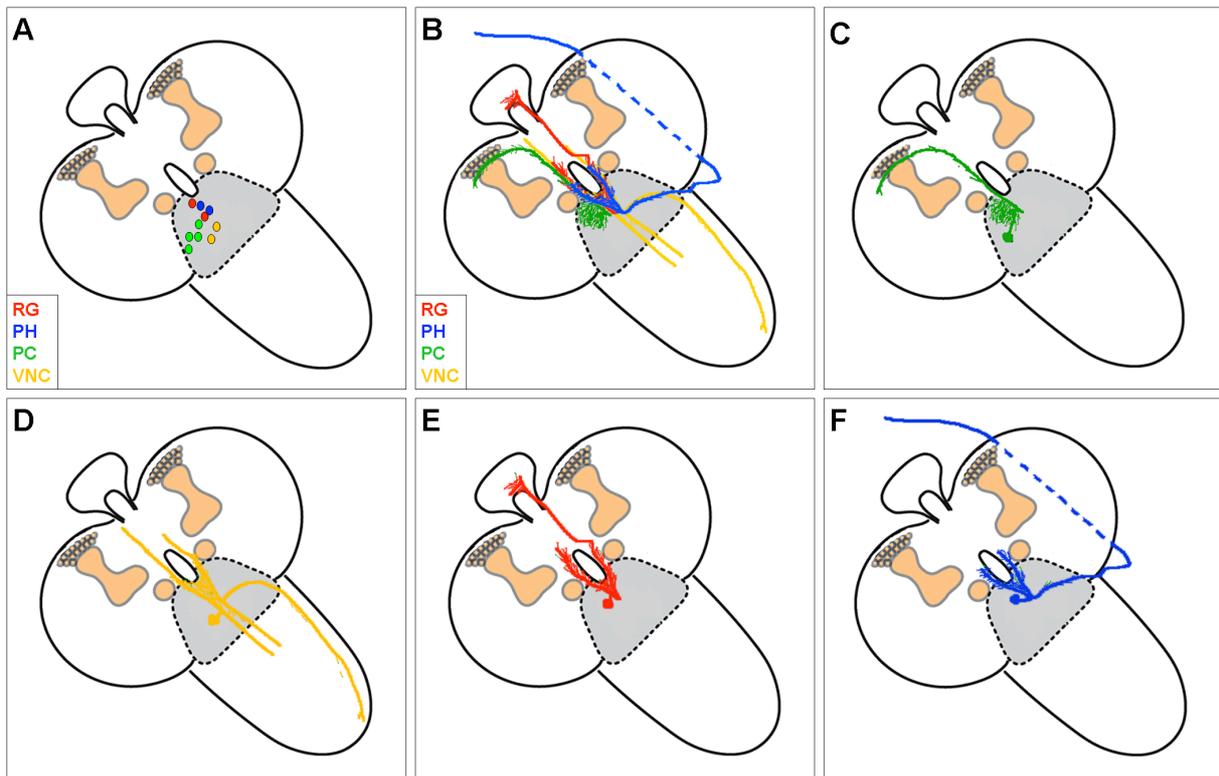


Abbildung 4.1: Zusammenfassung der verschiedenen Gruppen der Hugin-Neurone. **A:** Schematische Darstellung der Lage der Hugin-Zellkörper; nur die Zellkörper einer Hemisphäre sind dargestellt. **B:** Zusammenfassung der verschiedenen Gruppen von Hugin-Neuronen. **C:** Schematische Darstellung einer einzelnen Zelle, die das Protocerebrum innerviert. **D:** Schematische Darstellung einer einzelnen Zelle, die das ventrale Nervensystem innerviert. **E:** Schematische Darstellung einer einzelnen Zelle, die die Ringdrüse innerviert. **F:** Schematische Darstellung einer einzelnen Zelle, die den Pharynx innerviert. Die graue Fläche stellt das SOG dar. Bemerkenswert sind die zusätzlichen Neuriten jeder einzelnen Klasse, die die Region ventrolateral des Foramins in der Nähe des SOGs innervieren.

Das bedeutet jedoch nicht, dass nur die Neurone, die in das Protocerebrum projizieren, an der Vermittlung von gustatorischen Informationen beteiligt sind. Die anderen Gruppen der Hugin-Neurone zeigen eine weitgefächerte Innervierung des SOGs. Die Untersuchung der Morphologie der gustatorischen Rezeptorneurone in der *Drosophila*-Larve (Colomb et al., 2007) zeigt, dass die Axone dieser Zellen verschiedene Regionen des SOGs innervieren.

Daher kann vermutet werden, dass Hugin-Neurone Geschmacksinformationen in verschiedene Teile des zentralen Nervensystems - wie Protocerebrum, SOG und ventrales Nervensystem - vermitteln.

Die Gruppen der Hugin-Neurone, die in den Pharynx, das ventrale Nervensystem und die Ringdrüse projizieren, haben zusätzliche, sich überlappende Neuriten, die seitlich des Foramens verlaufen. Die Neurone, die das ventrale Nervensystem innervieren, besitzen Neurite beiderseits des Foramens, die in der Nähe des Protocerebrums enden. Die Neuronen, die die Ringdrüse innervieren, haben kurze Neurite auf der ipsilateralen Seite, wohingegen die Neurone, welche in den Pharynx, projizieren, kurze Fortsätze beidseitig des Foramens besitzen. Die Neurone, die in das ventrale Nervensystem projizieren, und die Neurone, die den Pharynx, innervieren haben außerdem Fortsätze, welche in dorsaler und ventraler Richtung beiderseits des Foramens verlaufen (Abb. 3.4 G und L). Demzufolge haben alle vier Neuron-Klassen Neuriten, die an oder in der Nähe der Grenze zwischen dem SOG und dem Foramen enden. Diese Region könnte daher eine Rolle bei der Koordination der Signale spielen, die von den verschiedenartigen Hugin-Neuronen kommen. Weil sich diese Region sehr nahe am Foramen befindet, welches die Öffnung darstellt, durch die der Ösophagus durch das Gehirn geht, ist es denkbar, dass die Neuropeptide der Hugin-Neurone an dieser Stelle direkt auf den Ösophagus ausgeschüttet werden. In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass eine Klasse der Hugin-Neurone die Ringdrüse innerviert, welche das wichtigste neuroendokrine Organ bei *Drosophila* ist. Dies trifft auch auf die Insulinproduzierenden Zellen zu (Brogiolo et al., 2001; Rulifson et al., 2002). Wie schon an früherer Stelle erwähnt, könnte die Region, an der sich die seitlichen Verästelungen mit den eintreffenden Axon-Enden gustatorischer Neurone vermischen, ebenfalls eine Region sein, in der Neuropeptide ausgeschüttet werden. Es ist denkbar, dass die durch *hugin* kodierten Neuropeptide an verschiedenen Stellen im zentralen Nervensystem ausgeschüttet werden:

- Die Ringdrüse ist für die übergeordnete Kontrolle von Wachstum und Stoffwechsel Verantwortlich.
- Die seitlichen Verästelungen könnten für die Weiterleitung von gustatorischen Informationen in höhere Gehirnzentren - wie das Protocerebrum - zuständig sein, wo sie dann entsprechend verarbeitet werden können.
- Die neu definierte Region an der Grenze zwischen SOG und Foramen, an der sich Neurite verschiedener Hugin-Neurone überschneiden, könnte für die örtliche Kontrolle des Fressverhaltens zuständig sein.

Die Tatsache, dass Neuriten der Insulin-produzierenden Zellen diese Region ebenfalls innervieren und Dilp2 in die Hugin-Zellen aufgenommen wird, spricht für eine solche Funktion. Diese Region könnte das sogenannte Tritocerebrum darstellen. Das Tritocerebrum wurde für die *Drosophila*-Larve anatomisch noch nicht präzise beschrieben, aber auf embryonalen Studien basierend (Hirth et al., 2001) könnte es sich bei der Larve um eine Region ventrolateral des Foramens handeln.

4.2 Prozessierung der Prä-Propeptide von *hugin* und PBAN aus evolutionärer Sicht

In der Ordnung Lepidoptera spielt das pheromone-biosynthesis-activating-neuropeptide (PBAN) verschiedene Rollen, wie zum Beispiel die Aktivierung der Biosynthese von Pheromonen in der weiblichen Motte, Stimulation der Muskeln, oder das Einleiten der Diapause (Raina, 1993). Abbildung 3.10 zeigt einen Vergleich der Prä-Propeptide von *hugin* und PBAN. Der Sequenzvergleich lässt vermuten, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der eher ursprünglichen Honigbiene (Hymenoptera) und *Tribolium castaneum* (Coleoptera) ein PBAN/*hugin* Vorläufer-Gen besaß, das für vier verschiedene PRLamide kodiert. Der letzte gemeinsame Vorfahre der evolutionär eher jüngeren Motte (Lepidoptera), der Fruchtfliege und des Moskitos (Diptera) hatte wahrscheinlich fünf verschiedene Pyrokinine. Das neu erworbene Pyrokinin ist *hugin*- γ/β -SGNP/PGN-18. Die Motten behielten alle fünf Neuropeptide, während Moskitos vier behielten und in den unterschiedlichen *Drosophila*-Arten nur noch PK-2 übrig blieb. Dies lässt sich aus den in Kapitel 3.5.2 erwähnten massenspektroskopischen Ergebnissen und der Analyse der Peptidsequenzen, sowie ihrer Prozessierung schließen. Warum also hat *Drosophila* im Gegensatz zu Motten nur noch ein funktionelles Neuropeptid? Eine Erklärung hierfür liegt sicher in der unterschiedlichen Lebensweise von *Drosophila* und Motte. Zum Beispiel benötigt *Drosophila* zum Aufspüren der Geschlechtspartner ein weit weniger ausgeklügeltes System als Motten. Weibliche Motten scheiden Pheromone aus, die dazu beitragen, dass männliche Motten die Weibchen durch sehr sensible olfaktorische Rezeptoren über eine Distanz von mehreren Kilometern aufspüren können (Riddiford und Williams, 1971). Außerdem gibt es bei *Drosophila* - anders als bei der Motte - keine Diapause. Gemeinsam haben Motte und *Drosophila* das C-terminale Neuropeptid, welches Fressverhalten und eventuell eher ursprünglichere Eigenschaften des Pheromon-abhängigen Paarungsverhaltens moduliert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Neuromedin S, das strukturelle Verwandtschaft zu dem in Kapitel 3.5.1

beschriebenen Neuromedin U aufweist, nicht nur Nahrungsaufnahme, sondern auch circadianen Rhythmus und Reproduktion reguliert (Mori et al., 2005; Vigo et al., 2007). Daher ist es möglich, dass die *hugin*/PBAN/Neuromedin Peptide eine während der Evolution konservierte Rolle sowohl bei der Nahrungsaufnahme, als auch beim Paarungsverhalten spielen. Dies wird von der Tatsache unterstützt, dass *hugin* und PBAN nicht nur in der Larve, sondern auch in den erwachsenen Tieren exprimiert werden. Von diesem Standpunkt aus betrachtet ist es durchaus möglich, dass *hugin* Teil eines neuronalen Schaltkreises ist, der nicht nur die Entscheidung zwischen Fressen und Nicht Fressen reguliert, sondern auch eine Rolle bei einer vielleicht noch wichtigeren Entscheidung spielt: nämlich zwischen Nahrungsaufnahme und Paarung.

4.3 Geschmack, Nahrungsaufnahme und Paarung

„Von dem breiten Verhaltensrepertoire, das Tiere besitzen, sind zwei Verhaltensweisen von besonderer Bedeutung: Fressen und Paarung. Fressen ist für das Überleben des einzelnen Individuums nötig, während Paarung für die Reproduktion und Fortpflanzung der Art wichtig ist. Ein großer Anteil der anderen Verhaltensweisen, wie beispielsweise Jagd und Flug oder Putzen und Balz haben ihre Bedeutung als Vorspiel oder als Folge dieser beiden fundamentalen Verhaltensweisen“ (Gordon Shepherd, Neurobiology).“

Der Geschmacksinn beeinflusst in *Drosophila* sowohl Fress- als auch Paarungsverhalten. Geschmack ist die letzte Kontrollinstanz vor dem eigentlichen Schlucken der Nahrung. Beim Balzverhalten von *Drosophila* sind gustatorische Signale der letzte Input, bevor es tatsächlich zur Paarung kommt.

Die Mechanismen der Perzeption von gustatorischen Reizen durch die gustatorischen Rezeptoren in den chemosensorischen Organen wurden bereits intensiv studiert (Scott, 2005; Thorne et al., 2004). Weniger ist über die sich anschließenden Schritte bekannt, bei denen die ursprünglichen Signale durch höhere Zentren im ZNS verarbeitet und verknüpft werden. Zum Beispiel ist im Gegensatz zum olfaktorischen System nichts über vermeintliche gustatorische Projektions-Neurone bekannt, die die gustatorischen Signale mit den verschiedenen Teilen des Gehirns verbinden (Vosshall und Stocker, 2007). Jedoch kann es sein, dass die Regulierung von Fress- und Balzverhalten als Antwort auf gustatorische Signalstoffe oder Pheromone durch dieselben Moleküle und Schaltkreise gesteuert wird. Auf der sensorischen Ebene ist bereits bekannt, dass inhibitorische Pheromone, die von männlichen Fliegen

abgesondert werden, von anderen Männchen über das gustatorische System als bitter klassifiziert werden (Lacaille et al., 2007).

So könnte es also sein, dass Pheromone und gustatorische Signale durch ein und denselben neuronalen Schaltkreis verarbeitet werden. Aus morphologischer Sicht ist der Hugin-Schaltkreis durchaus dazu in der Lage. Axon-Enden von verschiedenen gustatorischen Rezeptor-Neuronen innervieren die dendritischen Verästelungen der Hugin-Neurone (siehe Kapitel 3.4.1). Einer dieser gustatorischen Rezeptoren -Gr32b- wurde bereits als vermeintlicher Pheromon-Rezeptor beschrieben.

Ein weiteres, für das männliche Paarungsverhalten wichtiges Molekül, ist das Fruitless-Protein. Dieses wird im *Drosophila* ZNS exprimiert. Vorübergehende Inaktivierung der Fruitless-positiven Neurone bewirkt eine Aufhebung des männlichen Balzverhaltens (Manoli et al., 2005). In Abbildung 4.2 wird deutlich, dass sich das Fruitless-Protein auch in den Hugin-Neuronen adulter Männchen befindet, was für eine Beteiligung der Hugin-Neurone am männlichen Balzverhalten spricht.

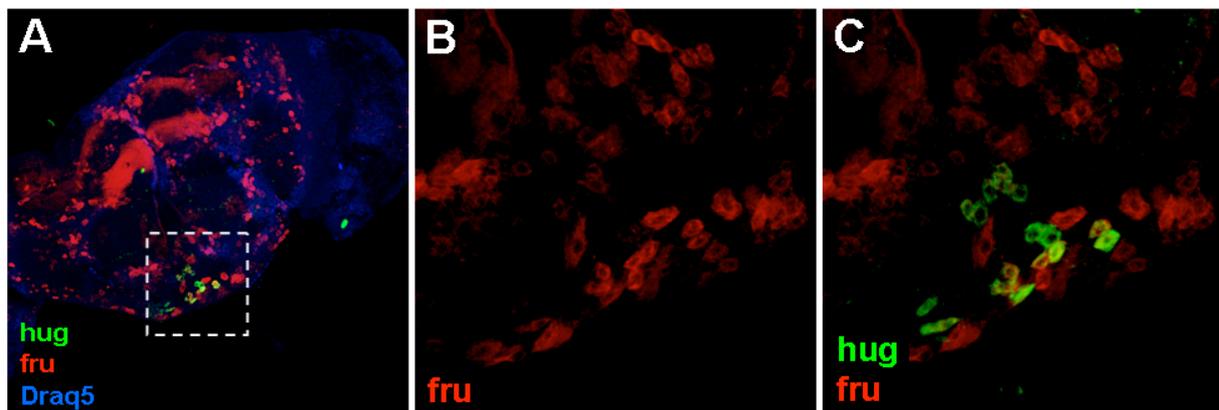


Abbildung 4.2: Fruitless (fru) in den Hugin-Neuronen. A-C: Gehirn einer männlichen adulten Fruchtfliege, welche GFP unter der Kontrolle des *fruitless*-Promotors exprimiert. Hugin (grün) wurde mit dem α -hug-rb Antikörper detektiert, die Fruitless-positiven Neurone wurden mit einem Antikörper gegen GFP markiert (rot). B,C: Vergrößerung des in A durch eine gestrichelte Linie markierten Bereiches des SOGs. Fruitless und Hugin sind in denselben Neuronen co-lokalisiert. Verwendete primäre Antikörper: α -hug-rb, α -GFP-m.

Einen endgültigen Beweis können jedoch nur Verhaltensexperimente erbringen, bei denen das Balzverhalten männlicher Fliegen, die einen Defekt im Hugin-Schaltkreis aufweisen, untersucht wird.

4.4 Neuromodulation neuronaler Schaltkreise im ZNS

Wie könnten neuronale Schaltkreise - wie der Hugin- oder der Insulin-Schaltkreis - im ZNS funktionieren? Wahrscheinlich agieren sie nicht über synaptische Punkt-zu-Punkt Kontakte, wie die schnellen synaptischen Verbindungen der klassischen Neurotransmitter. Wahrscheinlicher ist, dass sie sich „volumetrischer Synapsen“ bedienen, bei denen die Neurotransmitter oder Neuropeptide über eine weitgefächerte Zielregion ausgeschüttet werden (Bunin und Wightman, 1998). Das Hugin Neuropeptid könnte zum Beispiel breit gestreut im SOG oder im Tritocerebrum ausgeschüttet werden, um dort die Informationsweiterleitung zwischen den efferenten sensorischen Neuronen, wie zum Beispiel die der GRNs, oder den Neuriten der IPZs und den gustatorischen Interneuronen zu beeinflussen. Dass Neuropeptide über die Dendriten ausgeschüttet werden können wurde bereits im Säugetier nachgewiesen (Ludwig et al., 2002). Außerdem erinnert die Brausen-artige (engl.: sprinkler) Erscheinung der Hugin-Axone, die das Protocerebrum innervieren, an folgende Beschreibung für Säugetiere (Hille, 1992):

„What is the microanatomy of synapses that use modulatory neurotransmitters? Unfortunately not many are fully studied. In the autonomic nervous system, the junctions and receptors are often diffuse. For example, post-ganglionic parasympathetic nerve fibers of the heart have no tight synaptic connections with cardiac cells. Rather, nerve fibers course through the tissue, rarely coming as close as $0.1\mu\text{m}$ to muscle cells, and release Acetyl Choline into the interstitial fluid from vesicle-containing varicosities strung out on the nerve fiber like beads on a string. This may be likened to a sprinkler system with no point-to-point synapses.“

So oder ähnlich könnten die neuropeptidergen Schaltkreise in der Fliege funktionieren und auf diese Weise den Pfad des Informationsflusses durch Umlagerung der Aktivität der neuronalen Schaltkreise verändern. Zum Beispiel könnte eine Entscheidung zwischen Fressen oder Paarung/Bewegung als Reaktion auf die sich verändernden gustatorischen Reize oder Pheromon-Verfügbarkeit getroffen werden. Die gustatorischen oder Pheromon-abhängigen neuronalen Schaltkreise, die von Neuropeptiden wie Hugin beeinflusst werden könnten, sind noch nicht sehr gut beschrieben. Wie die Modulation verschiedener Verhaltensweisen durch die Hugin-Neurone aussehen könnte, wird in Abbildung 4.3 gezeigt.

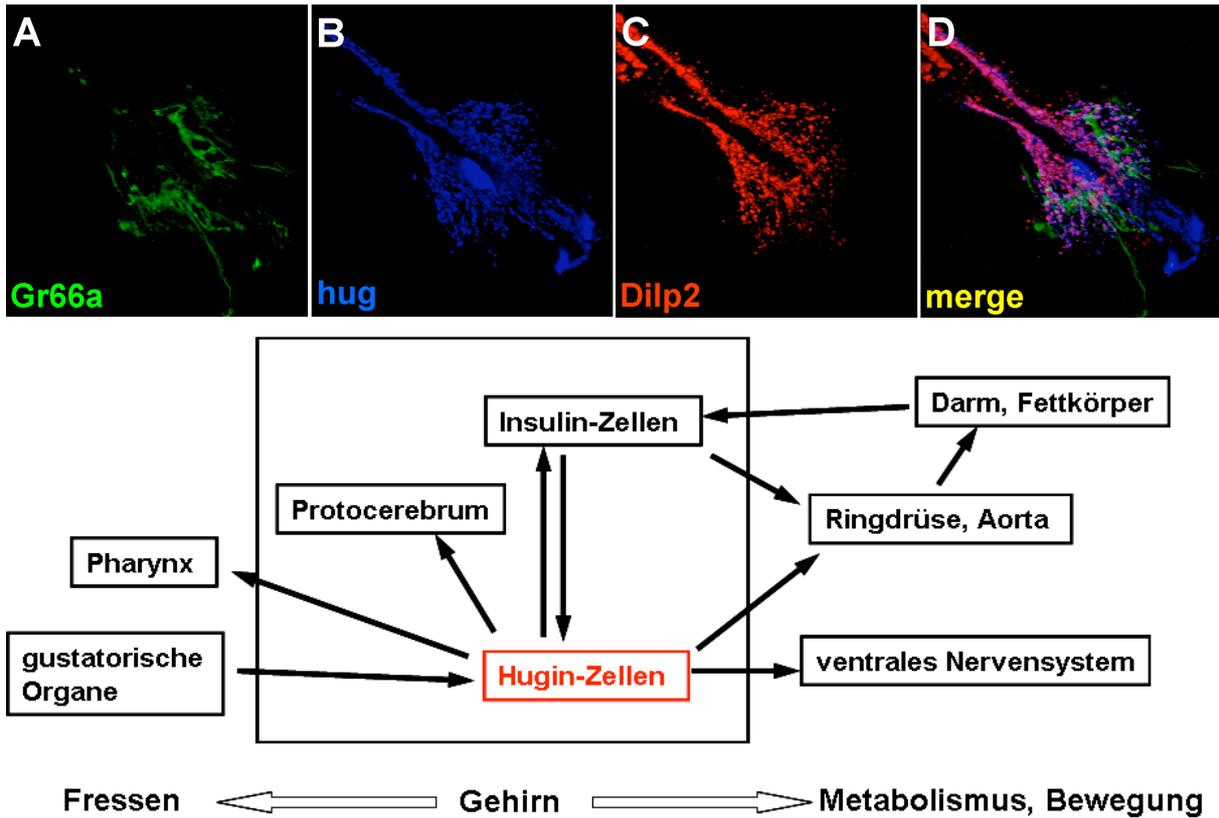


Abbildung 4.3: Modulation verschiedener Verhaltensweisen durch die Hugin-Zellen. A-D: Ausschnitt eines ZNS einer *Drosophila*-Larve, die GFP unter der Kontrolle des *Gr66a*-Promotors exprimiert. Hugin und Dilp2 wurden mit Antikörpern gefärbt. Die Kanäle sind getrennt voneinander dargestellt (A-C), die Überlagerung der Kanäle wird in D gezeigt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Axon-Enden des gustatorischen Rezeptors und die Neuriten der Insulin-produzierenden Zellen sich mit den Verästelungen der Hugin-Neurone überlagern. Der untere Teil der Abbildung befasst sich mit der Hypothese, dass die Hugin-Zellen ein Umschalten zwischen verschiedenen Verhaltensweisen bewirken könnten. Im dargestellten Fall könnte es eine Umlagerung von Fressverhalten zu Bewegung oder Metabolismus hin vermitteln.

4.5 Aufnahme von Insulin in die Hugin-Zellen

In Kapitel 3.6.1 wird beschrieben, dass sich die Neurite der Insulin-Zellen mit denen der Hugin-Neurone nicht nur überschneiden, sondern, dass Insulin auch von den Hugin-Zellen aufgenommen wird. Doch was ist die Funktion von Insulin in den Hugin-Zellen? In den vorangehenden Kapiteln wird erklärt, wie der Hugin-Schaltkreis bei der Bewertung und Weiterleitung verschiedener nahrungsabhängiger interner und externer Signale beteiligt sein könnte und das Verhalten der Fliege moduliert. Doch warum sollten die Hugin-Zellen selbst ein anderes modulatorisches Neuropeptid wie Dilp2 aufnehmen? Hat es neben der Regulierung des Wachstums und der Ernährung auf zellulärem Niveau noch andere

Funktionen? Der tGPH-Reporter zeigt keine großen Veränderungen in der Aktivität des Insulin-Signal-Weges an (Abb. 3.16). Daher stellt sich die Frage, ob es eventuell neben der Insulin-Rezeptor vermittelten Aufnahme noch einen anderen Mechanismus gibt Insulin aufzunehmen, ohne den Insulin-Signal-Weg zu aktivieren. Eventuell wird Insulin in den Hugin-Zellen nur gespeichert um von der Synthese durch die IPZs unabhängig zu sein und somit schneller reagieren zu können. Für die Stabilisierung des Dilp2-Proteins in den Hugin-Zellen könnte Imp-L2 verantwortlich sein, welches als IGFBP-7 Homolog mit Insulin eine Bindung eingeht und auf Liganden-Ebene verhindert, dass Insulin an den Insulin-Rezeptor binden kann.

4.5.1 Metabolische und physiologische Funktion von Dilp2 in den Hugin-Neuronen

Die Experimente, die zur Aufklärung der Aufgabe von Insulin in den Hugin-Zellen beitragen könnten, basieren auf der Veränderung der Komponenten, die bei der Insulin-Signal-Kaskade beteiligt sind. Hierfür kann man das Gal4-UAS-System verwenden, um verschiedene Stufen des Insulin-Signalwegs in den Hugin-Zellen zu manipulieren. Zum Beispiel kann der Insulin-Rezeptor mit einer dominant-negativen Mutation in den Hugin-Zellen exprimiert werden, um herauszufinden, ob die Aufnahme von Insulin allein durch den Insulin-Rezeptor vermittelt wird. Des Weiteren kann man Komponenten verändern, die nach der Aktivierung des Insulin-Rezeptors wichtig werden. Hierzu gehören unter anderem die PI3-Kinase, das Insulin-Rezeptor-Substrat und der Transkriptionsfaktor dFOXO. Außerdem kann dFOXO durch die UAS-FOXO-TM-Mutante konstitutiv in den Hugin-Zellen aktiviert werden (Hwangbo et al., 2004) um somit die Synthese des Insulin-Rezeptors von äußeren Signalen zu entkoppeln. Nach der Manipulation der Komponenten könnte man das Wanderverhalten der Larven untersuchen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Fressmutanten eine Veränderung in ihrem Wanderverhalten zeigen (Melcher und Pankratz, 2005; Zinke et al., 1999). Durch die Manipulation des Insulin-Signal-Wegs kann das Wanderverhalten der Larven ebenfalls verändert sein (Britton et al., 2002; Kramer et al., 2003). Daher erscheint es sinnvoll, *Drosophila*-Larven mit verändertem Insulin-Signal-Weg in den Hugin-Zellen auf Veränderungen ihres Wanderverhaltens zu untersuchen.

4.5.2 Beobachtung des Insulin-Transportes und der Internalisierung des Insulin-Rezeptors

Eine optische Methode, die Dynamik des Transportes von Insulin oder die Internalisierung des Insulin-Rezeptors zu zeigen, beruht auf einem Insulin-Rezeptor-GFP Fusionsprotein. Dies könnte zur Beantwortung der Frage, wie Informationen in Form von Neuropeptiden innerhalb des zentralen Nervensystems gespeichert und transportiert werden, von Nutzen sein. Hierzu müsste ein Fluoreszenz-markierter Insulin-Rezeptor generiert werden, der von den Hugin-Zellen oder den AKH-Zellen unverändert aufgenommen werden kann. Dieses Projekt wurde in Säugetieren bereits experimentell durchgeführt. Es wurde eine GFP-Markierung an das C-terminale Ende des Insulin-Rezeptors fusioniert (Kabayama et al., 2007). Das auf dieser Studie basierende Konstrukt könnte in einen fliegenspezifischen UAS-Expressionsvektor kloniert werden und unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors in den Hugin-Zellen exprimieren. Zudem kann man GFP direkt an Dilp2 fusionieren und in den Insulin-produzierenden Zellen exprimieren, um anschließend mit geeigneten optischen Methoden den Transport in die Zielzellen zu beobachten.

4.6 Der Hugin-Schaltkreis ist in der Biene konserviert

In Kapitel 3.5.4 konnte gezeigt werden, dass das neuronale Netzwerk, das die Hugin-Zellen im ZNS von *Drosophila* bilden, in der Biene konserviert ist. Nicht zuletzt wegen ihrer sozialen Lebensweise ist die Honigbiene ein interessanter biologischer Modellorganismus und wird gerne herangezogen, wenn es um die Erforschung des Lernens und der Erinnerung geht. Von vorrangigem Interesse ist dabei, wie es der Biene gelingt, zu einer Futterquelle zurückzufinden, nachdem sie in den Bienenstock zurückgekehrt ist. Weitgehend unerforscht ist die Biologie der Nahrungsaufnahme. Erst durch die Sequenzierung des Genoms konnten über Computer gestützte Analysen gustatorische Rezeptoren in der Biene identifiziert werden. Während in *Drosophila* 68 gustatorische Rezeptoren bekannt sind, besitzt die Biene wahrscheinlich nur zehn. Von zweien dieser GRs nimmt man an, dass sie ortholog zu der in *Drosophila* vorkommenden Gr28a/b-Gruppe sind (Robertson und Wanner, 2006), die in dieser Arbeit ebenfalls beschrieben wird (vgl. Kap. 3.4.1 und 3.4.2). Was die Nahrungsauswahl betrifft, ist die Biene demnach wahrscheinlich einfacher organisiert als die Fruchtfliege. Im Gegensatz zur *Drosophila*-Larve, welche sich aktiv durch das Futtersubstrat arbeiten und gegebenenfalls die Futterquelle wechseln muss, befindet sich die Bienen-Larve

während ihrer gesamten Entwicklung in der Wabe und wird von den Arbeiterinnen gefüttert. Diese Lebensweise und die Tatsache, dass die Biene ein Vertreter einer evolutionär älteren Insekten-Gruppe als *Drosophila* ist, machen sie für vergleichende neuromorphologische Analysen interessant. Ob neben der Morphologie des Hugin-Schaltkreises auch der Insulin-Schaltkreis konserviert ist und ob es ähnlich wie in *Drosophila* eine Interaktion zwischen diesen beiden Neuronen-Gruppen gibt, lässt sich mit Hilfe von histochemischen Färbungen und Immunfluoreszenz mit geeigneten Antikörpern ermitteln. Im Rahmen dieser Grundlagen orientierten Forschung ist es jedenfalls von großer Wichtigkeit, verschiedene Organismen miteinander zu vergleichen, um herauszufinden, welche peptidergen Systeme sich im Laufe der Evolution durchsetzen konnten und somit möglicherweise wichtige Hinweise geben, wie die neuronalen Grundlagen der Nahrungsaufnahme beim Menschen organisiert sein könnten.

5 Literatur

Amrein, H. und Thorne, N. (2005). Gustatory perception and behavior in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 15, R673-684.

Andersen, L., Jorgensen, P.N., Jensen, L.B. und Walsh, D. (2000). A new insulin immunoassay specific for the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, suitable for bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Clin Biochem* 33, 627-633.

Aubele, E. und Klemm, N. (1977). Origin, destination and mapping of tritocerebral neurons of locust. *Cell Tissue Res* 178, 199-219.

Austin, C., Lo, G., Nandha, K.A., Meleagros, L. und Bloom, S.R. (1995). Cloning and characterization of the cDNA encoding the human neuromedin U (NmU) precursor: NmU expression in the human gastrointestinal tract. *J Mol Endocrinol* 14, 157-169.

Bader, R., Colomb, J., Pankratz, B., Schrock, A., Stocker, R.F. und Pankratz, M.J. (2007a). Genetic dissection of neural circuit anatomy underlying feeding behavior in *Drosophila*: distinct classes of hugin-expressing neurons. *J Comp Neurol* 502, 848-856.

Bader, R., Wegener, C. und Pankratz, M.J. (2007b). Comparative neuroanatomy and genomics of hugin and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN). *Fly (Austin)* 1, 228-231.

Benton, R., Sachse, S., Michnick, S.W. und Vosshall, L.B. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol* 4, e20.

Bray, S. und Amrein, H. (2003). A putative *Drosophila* pheromone receptor expressed in male-specific taste neurons is required for efficient courtship. *Neuron* 39, 1019-1029.

Brighton, P.J., Szekeres, P.G. und Willars, G.B. (2004). Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. *Pharmacol Rev* 56, 231-248.

Britton, J.S. und Edgar, B.A. (1998). Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* *125*, 2149-2158.

Britton, J.S., Lockwood, W.K., Li, L., Cohen, S.M. und Edgar, B.A. (2002). *Drosophila*'s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Dev Cell* *2*, 239-249.

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R. und Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* *11*, 213-221.

Broughton, S.J., Piper, M.D., Ikeya, T., Bass, T.M., Jacobson, J., Drieger, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D.J., Leivers, S.J., *et al.* (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 3105-3110.

Buch, S., Melcher, C., Bauer, M., Katzenberger, J. und Pankratz, M.J. (2008). Opposing effects of dietary protein and sugar regulate a transcriptional target of *Drosophila* insulin-like peptide signaling. *Cell Metab* *7*, 321-332.

Bunin, M.A. und Wightman, R.M. (1998). Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J Neurosci* *18*, 4854-4860.

Cao, C. und Brown, M.R. (2001). Localization of an insulin-like peptide in brains of two flies. *Cell Tissue Res* *304*, 317-321.

Choi, M.Y., Fuerst, E.J., Rafaeli, A. und Jurenka, R. (2003). Identification of a G protein-coupled receptor for pheromone biosynthesis activating neuropeptide from pheromone glands of the moth *Helicoverpa zea*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9721-9726.

Choi, M.Y., Rafaeli, A. und Jurenka, R.A. (2001). Pyrokinin/PBAN-like peptides in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* *306*, 459-465.

- Chu-Wang, I.W. und Axtell, R.C. (1972). Fine structure of the terminal organ of the house fly larva, *Musca domestica* L. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 127, 287-305.
- Chu, I.W. und Axtell, R.C. (1971). Fine structure of the dorsal organ of the house fly larva, *Musca domestica* L. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 117, 17-34.
- Cobb, M. und Domain, I. (2000). Olfactory coding in a simple system: adaptation in *Drosophila* larvae. *Proc Biol Sci* 267, 2119-2125.
- Colomb, J., Grillenzoni, N., Ramaekers, A. und Stocker, R.F. (2007). Architecture of the primary taste center of *Drosophila melanogaster* larvae. *J Comp Neurol* 502, 834-847.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J. und Leopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114, 739-749.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C. und Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312, 927-930.
- Dahanukar, A., Foster, K., van der Goes van Naters, W.M. und Carlson, J.R. (2001). A Gr receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of *Drosophila*. *Nat Neurosci* 4, 1182-1186.
- Davis, N.T., Homberg, U., Teal, P.E., Altstein, M., Agricola, H.J. und Hildebrand, J.G. (1996). Neuroanatomy and immunocytochemistry of the median neuroendocrine cells of the subesophageal ganglion of the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*: immunoreactivities to PBAN and other neuropeptides. *Microsc Res Tech* 35, 201-229.
- Dunipace, L., Meister, S., McNealy, C. und Amrein, H. (2001). Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system. *Curr Biol* 11, 822-835.
- Ebbs, M.L. und Amrein, H. (2007). Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Pflugers Arch* 454, 735-747.

Faucher, C., Forstreuter, M., Hilker, M. und de Bruyne, M. (2006). Behavioral responses of *Drosophila* to biogenic levels of carbon dioxide depend on life-stage, sex and olfactory context. *J Exp Biol* 209, 2739-2748.

Fishilevich, E., Domingos, A.I., Asahina, K., Naef, F., Vosshall, L.B. und Louis, M. (2005). Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*. *Curr Biol* 15, 2086-2096.

Gendre, N., Luer, K., Friche, S., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Technau, G.M. und Stocker, R.F. (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development* 131, 83-92.

Gray, A., Van Der Kaay, J. und Downes, C.P. (1999). The pleckstrin homology domains of protein kinase B and GRP1 (general receptor for phosphoinositides-1) are sensitive and selective probes for the cellular detection of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and/or phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in vivo. *Biochem J* 344 Pt 3, 929-936.

Hanada, R., Teranishi, H., Pearson, J.T., Kurokawa, M., Hosoda, H., Fukushima, N., Fukue, Y., Serino, R., Fujihara, H., Ueta, Y., *et al.* (2004). Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med* 10, 1067-1073.

Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Haberlin, C. und Stocker, R.F. (1999). Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: toxin expression studies in chemosensory neurons. *J Neurosci* 19, 6599-6609.

Hille B. (1992) Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Sunderland.

Hirth, F., Loop, T., Egger, B., Miller, D.F., Kaufman, T.C. und Reichert, H. (2001). Functional equivalence of Hox gene products in the specification of the tritocerebrum during embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 128, 4781-4788.

Honegger, B., Galic, M., Kohler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E. und Stocker, H. (2008). Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. *J Biol* 7, 10.

Howard, A.D., Wang, R., Pong, S.S., Mellin, T.N., Strack, A., Guan, X.M., Zeng, Z., Williams, D.L., Jr., Feighner, S.D., Nunes, C.N., *et al.* (2000). Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature* *406*, 70-74.

Hull, J.J., Ohnishi, A., Moto, K., Kawasaki, Y., Kurata, R., Suzuki, M.G. und Matsumoto, S. (2004). Cloning and characterization of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor from the silkworm, *Bombyx mori*. Significance of the carboxyl terminus in receptor internalization. *J Biol Chem* *279*, 51500-51507.

Hummon, A.B., Richmond, T.A., Verleyen, P., Baggerman, G., Huybrechts, J., Ewing, M.A., Vierstraete, E., Rodriguez-Zas, S.L., Schoofs, L., Robinson, G.E., *et al.* (2006). From the genome to the proteome: uncovering peptides in the *Apis* brain. *Science* *314*, 647-649.

Hwangbo, D.S., Gershman, B., Tu, M.P., Palmer, M. und Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* *429*, 562-566.

Ignell, R., Dekker, T., Ghaninia, M. und Hansson, B.S. (2005). Neuronal architecture of the mosquito deutocerebrum. *J Comp Neurol* *493*, 207-240.

Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K. und Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr Biol* *12*, 1293-1300.

Jallon, J.M. (1984). A few chemical words exchanged by *Drosophila* during courtship and mating. *Behav Genet* *14*, 441-478.

Jones, W.D., Cayirlioglu, P., Kadow, I.G. und Vosshall, L.B. (2007). Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* *445*, 86-90.

Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y. und Inokuchi, J. (2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 13678-13683.

Kim, S.K. und Rulifson, E.J. (2004). Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells. *Nature* 431, 316-320.

Kramer, J.M., Davidge, J.T., Lockyer, J.M. und Staveley, B.E. (2003). Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation. *BMC Dev Biol* 3, 5.

Kreher, S.A., Kwon, J.Y. und Carlson, J.R. (2005). The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* larva. *Neuron* 46, 445-456.

Kwon, J.Y., Dahanukar, A., Weiss, L.A. und Carlson, J.R. (2007). The molecular basis of CO₂ reception in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3574-3578.

Lacaille, F., Hiroi, M., Twele, R., Inoshita, T., Umemoto, D., Maniere, G., Marion-Poll, F., Ozaki, M., Francke, W., Cobb, M., *et al.* (2007). An inhibitory sex pheromone tastes bitter for *Drosophila* males. *PLoS ONE* 2, e661.

Larsson, M.C., Domingos, A.I., Jones, W.D., Chiappe, M.E., Amrein, H. und Vosshall, L.B. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43, 703-714.

Lee, G. und Park, J.H. (2004). Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311-323.

Leopold, P. und Perrimon, N. (2007). *Drosophila* and the genetics of the internal milieu. *Nature* 450, 186-188.

Li, B., Predel, R., Neupert, S., Hauser, F., Tanaka, Y., Cazzamali, G., Williamson, M., Arakane, Y., Verleyen, P., Schoofs, L., *et al.* (2008). Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Res* 18, 113-122.

Lietzke, S.E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M.P. und Lambright, D.G. (2000). Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 6, 385-394.

- Liu, L., Yermolaieva, O., Johnson, W.A., Abboud, F.M. und Welsh, M.J. (2003). Identification and function of thermosensory neurons in *Drosophila* larvae. *Nat Neurosci* 6, 267-273.
- Ludwig, M., Sabatier, N., Bull, P.M., Landgraf, R., Dayanithi, G. und Leng, G. (2002). Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature* 418, 85-89.
- Ma, P.W., Garden, R.W., Niermann, J.T., M, O.C., Sweedler, J.V. und Roelofs, W.L. (2000). Characterizing the Hez-PBAN gene products in neuronal clusters with immunocytochemistry and MALDI MS. *J Insect Physiol* 46, 221-230.
- Manoli, D.S., Foss, M., Villella, A., Taylor, B.J., Hall, J.C. und Baker, B.S. (2005). Male-specific fruitless specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature* 436, 395-400.
- Masuda-Nakagawa, L.M., Tanaka, N.K. und O'Kane, C.J. (2005). Stereotypic and random patterns of connectivity in the larval mushroom body calyx of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19027-19032.
- Matsunami, H. und Amrein, H. (2003). Taste and pheromone perception in mammals and flies. *Genome Biol* 4, 220.
- Melcher, C., Bader, R. und Pankratz, M.J. (2007). Amino acids, taste circuits, and feeding behavior in *Drosophila*: towards understanding the psychology of feeding in flies and man. *J Endocrinol* 192, 467-472.
- Melcher, C., Bader, R., Walther, S., Simakov, O. und Pankratz, M.J. (2006). Neuromedin U and its putative *Drosophila* homolog hugin. *PLoS Biol* 4, e68.
- Melcher, C. und Pankratz, M.J. (2005). Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain. *PLoS Biol* 3, e305.

- Meng, X., Wahlstrom, G., Immonen, T., Kolmer, M., Tirronen, M., Predel, R., Kalkkinen, N., Heino, T.I., Sariola, H. und Roos, C. (2002). The *Drosophila* *hugin* gene codes for myostimulatory and ecdysis-modifying neuropeptides. *Mech Dev* 117, 5-13.
- Mori, K., Miyazato, M., Ida, T., Murakami, N., Serino, R., Ueta, Y., Kojima, M. und Kangawa, K. (2005). Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J* 24, 325-335.
- Neupert, S., Johard, H.A., Nassel, D.R. und Predel, R. (2007). Single-cell peptidomics of *Drosophila melanogaster* neurons identified by Gal4-driven fluorescence. *Anal Chem* 79, 3690-3694.
- Oppliger, F.Y., P, M.G. und Vlimant, M. (2000). Neurophysiological and behavioural evidence for an olfactory function for the dorsal organ and a gustatory one for the terminal organ in *Drosophila melanogaster* larvae. *J Insect Physiol* 46, 135-144.
- Park, Y., Kim, Y.J. und Adams, M.E. (2002). Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11423-11428.
- Predel, R., Kellner, R., Nachman, R.J., Holman, G.M., Rapus, J. und Gade, G. (1999). Differential distribution of pyrokinin-isoforms in cerebral and abdominal neurohemal organs of the American cockroach. *Insect Biochem Mol Biol* 29, 139-144.
- Predel, R., Wegener, C., Russell, W.K., Tichy, S.E., Russell, D.H. und Nachman, R.J. (2004). Peptidomics of CNS-associated neurohemal systems of adult *Drosophila melanogaster*: a mass spectrometric survey of peptides from individual flies. *J Comp Neurol* 474, 379-392.
- Python, F. und Stocker, R.F. (2002). Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *J Comp Neurol* 445, 374-387.
- Raina, A.K. (1993). Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 38, 329-349.

Ramaekers, A., Magnenat, E., Marin, E.C., Gendre, N., Jefferis, G.S., Luo, L. und Stocker, R.F. (2005). Glomerular maps without cellular redundancy at successive levels of the *Drosophila* larval olfactory circuit. *Curr Biol* *15*, 982-992.

Riddiford, L.M. und Williams, C.M. (1971). Role of the corpora cardiaca in the behavior of saturniid moths. I. Release of sex pheromone. *Biol Bull* *140*, 1-7.

Robertson, H.M. und Wanner, K.W. (2006). The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Res* *16*, 1395-1403.

Robertson, H.M., Warr, C.G. und Carlson, J.R. (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100 Suppl 2*, 14537-14542.

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

Rosenkilde, C., Cazzamali, G., Williamson, M., Hauser, F., Sondergaard, L., DeLotto, R. und Grimmelikhuijzen, C.J. (2003). Molecular cloning, functional expression, and gene silencing of two *Drosophila* receptors for the *Drosophila* neuropeptide pyrokinin-2. *Biochem Biophys Res Commun* *309*, 485-494.

Rulifson, E.J., Kim, S.K. und Nusse, R. (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* *296*, 1118-1120.

Saper, C.B., Chou, T.C. und Elmquist, J.K. (2002). The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* *36*, 199-211.

Scott, K. (2005). Taste recognition: food for thought. *Neuron* *48*, 455-464.

Seto, E.S. und Bellen, H.J. (2006). Internalization is required for proper Wingless signaling in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* *173*, 95-106.

Shepherd G. (1988) *Neurobiology*. Oxford University Press, Oxford.

- Siegmund, T. und Korge, G. (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 431, 481-491.
- Stocker, R.F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275, 3-26.
- Suh, G.S., Wong, A.M., Hergarden, A.C., Wang, J.W., Simon, A.F., Benzer, S., Axel, R. und Anderson, D.J. (2004). A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature* 431, 854-859.
- Thorne, N. und Amrein, H. (2008). Atypical expression of *Drosophila* gustatory receptor genes in sensory and central neurons. *J Comp Neurol* 506, 548-568.
- Thorne, N., Chromey, C., Bray, S. und Amrein, H. (2004). Taste perception and coding in *Drosophila*. *Curr Biol* 14, 1065-1079.
- Ueno, K., Ohta, M., Morita, H., Mikuni, Y., Nakajima, S., Yamamoto, K. und Isono, K. (2001). Trehalose sensitivity in *Drosophila* correlates with mutations in and expression of the gustatory receptor gene *Gr5a*. *Curr Biol* 11, 1451-1455.
- Vigo, E., Roa, J., Lopez, M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Navarro, V.M., Pineda, R., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., *et al.* (2007). Neuromedin s as novel putative regulator of luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 148, 813-823.
- Vosshall, L.B. und Stocker, R.F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci* 30, 505-533.
- Wang, J., Ma, X., Yang, J.S., Zheng, X., Zugates, C.T., Lee, C.H. und Lee, T. (2004a). Transmembrane/juxtamembrane domain-dependent *Dscam* distribution and function during mushroom body neuronal morphogenesis. *Neuron* 43, 663-672.
- Wang, Z., Singhvi, A., Kong, P. und Scott, K. (2004b). Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell* 117, 981-991.

Literatur

Wegener, C., Reinl, T., Jansch, L. und Predel, R. (2006). Direct mass spectrometric peptide profiling and fragmentation of larval peptide hormone release sites in *Drosophila melanogaster* reveals tagma-specific peptide expression and differential processing. *J Neurochem* *96*, 1362-1374.

Wong, A.M., Wang, J.W. und Axel, R. (2002). Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell* *109*, 229-241.

Wu, Q., Zhang, Y., Xu, J. und Shen, P. (2005). Regulation of hunger-driven behaviors by neural ribosomal S6 kinase in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13289-13294.

Zinke, I., Kirchner, C., Chao, L.C., Tetzlaff, M.T. und Pankratz, M.J. (1999). Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of *pumpless*, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development* *126*, 5275-5284.

Veröffentlichungen

Bader, R., Colomb, J., Pankratz, B., Schrock, A., Stocker, R.F. und Pankratz, M.J. (2007a). Genetic dissection of neural circuit anatomy underlying feeding behavior in *Drosophila*: distinct classes of hugin-expressing neurons. *J Comp Neurol* 502, 848-856.

Bader, R., Wegener, C. und Pankratz, M.J. (2007b). Comparative neuroanatomy and genomics of hugin and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN). *Fly (Austin)* 1, 228-231.

Konig, H., Matter, N., Bader, R., Thiele, W. und Muller, F. (2007). Splicing segregation: the minor spliceosome acts outside the nucleus and controls cell proliferation. *Cell* 131, 718-729.

Melcher, C., Bader, R. und Pankratz, M.J. (2007). Amino acids, taste circuits, and feeding behavior in *Drosophila*: towards understanding the psychology of feeding in flies and man. *J Endocrinol* 192, 467-472.

Melcher, C., Bader, R., Walther, S., Simakov, O. und Pankratz, M.J. (2006). Neuromedin U and its putative *Drosophila* homolog hugin. *PLoS Biol* 4, e68.