



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7012

**Die *klumpfuss*-Mutante
P(9036) und *hugin*:
Neuroanatomische Analyse
einer am Fressverhalten
beteiligten Population von
Neuronen im Zentralnerven-
system von *Drosophila
melanogaster***

Ch. Melcher
Institut für Technische Chemie

November 2004

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7012

Die *klumpfuss*-Mutante P(9036) und *hugin* :
Neuroanatomische Analyse
einer am Fressverhalten beteiligten
Population von Neuronen im Zentralnervensystem
von *Drosophila melanogaster*

Christoph Melcher

Institut für Technische Chemie

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2004

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
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:0005-070128

Die *klumpfuss*-Mutante P(9036) und *hugin* :
Neuroanatomische Analyse
einer am Fressverhalten beteiligten
Population von Neuronen im Zentralnervensystem
von *Drosophila melanogaster*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

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

Dissertation

von

Dipl.-Biol. Christoph Melcher
aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. M. Kappes

Referent: PD Dr. M.J. Pankratz

Korreferent: Prof. Dr. R. Paulsen

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.04

Zusammenfassung

Das Zentralnervensystem (ZNS) von *Drosophila melanogaster*, dessen Rolle als übergeordnete Schaltstelle in der Regulation elementarer Vorgänge wie Nahrungsaufnahme, Wachstum und Entwicklung unbestritten ist, war bisher experimentell mehr oder weniger unzugänglich. Klassische neuroanatomische Experimente, wie sie von V. Dethier, V. Wigglesworth und anderen zur Regulation der Nahrungsaufnahme an Modellorganismen wie *Calliphora erythrocephala* oder *Rhodnius proxilus* durchgeführt worden waren, erwiesen sich im genetischen und molekularbiologischen Modellorganismus *Drosophila melanogaster* als technisch nicht realisierbar.

Im Kontext der Regulation von Nahrungsaufnahme, Wachstum und Entwicklung konnte in vorliegender Arbeit durch die Analyse der P(9036)-Linie dennoch ein Zugang zum Zentralnervensystem von *Drosophila melanogaster* geschaffen werden. Diese Mutante, die neben der P(6913)-*pumple*-Mutanten und der P(9373)-Linie in einem P-Element-Mutagenesecscreen auf Defekte in der Nahrungsaufnahme isoliert wurde, zeigt im ersten Larvalstadium einen Stopp der Nahrungsaufnahme und des Wachstums. Parallel dazu ist bei P(9036)-Mutanten ein Wanderverhalten zu beobachten, welches Wildtyp-Larven im 3. Instar kurz vor der Verpuppung zeigen. Auf molekularer Ebene konnte als Folge der P(9036)-Mutation ein Verlust des Neuroblasten-spezifischen Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *klumpfuss* (*klu*) nachgewiesen werden, der wildtypisch eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Identität von sekundären Vorläuferzellen innerhalb einer Neuroblasten-Linie spielt.

Bei der auf DNA-Microarrays und confokaler Fluoreszenz-Mikroskopie basierten Suche nach neuroanatomischen und physiologischen Defekten, welche den beschriebenen Phänotypen zugrunde liegen mögen, konnten generelle Einblicke in die Rolle des *Drosophila*-ZNS bei der Regulation der Nahrungsaufnahme erarbeitet werden. So konnte mit *hugin* ein bisher funktionell uncharakterisiertes Neuropeptid-Gen identifiziert werden, das sowohl wildtypisch in Abhängigkeit von Nahrungssignalen reguliert wird, als auch in den Fressmutanten P(9036) und P(6913) dereguliert ist.

Als Expressionsdomäne von *hugin* konnten exklusiv Neuronen im suboesophagealen Ganglion, einer bekanntermaßen an der Nahrungsaufnahme beteiligten Gehirnregion, aufgezeigt werden. Neuroanatomische Analyse der Konnektivität dieser *hugin*-Neuronen ergab die Ringdrüse (als wichtigstes neuroendokrines Organ der Larve), Muskulatur der Mundwerkzeuge (im cephalopharyngealen Komplex der Larve) sowie die Pilzkörper (als Hauptintegrationsstelle von olfaktorischen und gustatorischen Signalen) als *hugin*-Projektionsziele. Geschmackssensillen im antennomaxillären Komplex konnten als afferente, den *hugin*-Neuronen potenziell vorgeschaltete Sinnesorgane identifiziert werden, außerdem konnte eine Regulation der *hugin*-Expression in Abhängigkeit von sensorischem *Input* aufgezeigt werden.

Neben dieser detaillierten neuroanatomischen Charakterisierung der *hugin*-Neuronen wird eine modulatorische Rolle von *hugin* bei der Regulation der Nahrungsaufnahme von *Drosophila melanogaster* vorgeschlagen und vor dem Hintergrund der Fressmutanten P(9036) diskutiert.

Abstract

Feeding as a fundamental activity of all animals can be regulated by internal energy status or external sensory signals. We have characterized a zinc finger transcription factor, *klumpfuss (klu)*, which is required for food intake in *Drosophila*. As first instar larvae *klu* mutants stop feeding and display a wandering behavior reminiscent of third instar wildtype larvae prior to pupariation. Microarray analysis of *klu* mutants indicates that the expression level of the neuropeptide gene *hugin (hug)* is altered in *klu* mutants and that *hug* itself is regulated by food signals. Neuroanatomical analysis demonstrates that *hug* neurons project axons to pharyngeal muscles, to the ring gland and to the mushroom body region, whereas *hug* dendrites are innervated by external gustatory receptor neurons as well as by internal pharyngeal chemosensory organs. Use of tetanus toxin to block synaptic transmission in the *hug* neurons resulted in specific alterations in the initiation of food intake (1). Our results provide evidence that *hug* neurons function as interneurons which modulate taste mediated feeding behavior in *Drosophila*. Ongoing analysis of *hug* mediated gustatory signalling circuits by calcium imaging and related optical methods should increase our understanding of how taste sensory input is modulating feeding behavior.

(1) Melcher, C. & Pankratz, M.J. (under review, Cell) Connectivity map of candidate gustatory interneurons modulating feeding behavioral response in the *Drosophila* brain

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract.....	VII
Inhaltsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1. Regulation von Nahrungsaufnahme und Wachstum.....	1
1.2. Neuroanatomie von Geschmacks- und Geruchswahrnehmung.....	5
2. Material und Methoden	11
2.1. Material.....	11
2.1.1. Antikörper.....	11
2.1.2. Enzyme.....	11
2.1.3. Fliegenlinien.....	12
2.1.4. Geräte	13
2.1.5. Kits.....	14
2.1.6. Puffer und Medien	14
2.1.7. Vektoren und Plasmide	15
2.1.8. Verbrauchsmaterial.....	16
2.2. Methoden	20
2.2.1. Fliegenhaltung	20
2.2.2. Histochemische und Fluoreszenzfärbungen	20
2.2.3. Histochemische X-Gal-Färbungen	22
2.2.4. Markierung von <i>InSitu</i> -Sonden	22
2.2.5. Histochemische <i>InSitu</i> -Hybridisierung	23
2.2.6. Fluoreszenz- <i>InSitu</i> -Hybridisierungen	23
2.2.7. Fluoreszenz-Proteindetektion.....	24
2.2.8. Bakterien-Transformation	25
2.2.9. Präparation von Plasmid-DNA.....	25
2.2.10. Restriktionsverdau und Ligation	26
2.2.11. RNA-Isolation	27
2.2.12. PCR und RT-PCR.....	27
2.2.13. Generierung transgener Fliegen	28
2.2.14. Hitzeschock-Experimente für Microarrays.....	29
3. Ergebnisse	31
3.1. Molekulare Analyse der P(9036)-Mutanten.....	32
3.2. Morphologische Analyse des larvalen <i>Drosophila</i> -ZNS.....	34
3.2.1. Morphologische Analyse auf Proteinebene.....	34
3.2.2. Morphologische Analyse auf RNA-Ebene	34
3.2.3. Morphologische Analyse mittels Markergen-Expression	35

3.3.	Microarray-Analyse von <i>klumpfuss</i> -Mutanten	47
3.4.	Charakterisierung des Neuropeptid-Gens <i>hugin</i>	54
3.4.1.	Morphologische Charakterisierung von <i>hugin</i>	54
3.4.2.	Phänotypische Charakterisierung von <i>hugin</i>	57
3.4.3.	<i>hugin</i> -Neurone und sensorischer <i>Input</i>	59
3.4.4.	Geschmackspräferenz-Tests mit <i>hugin-knock out</i> -Larven	62
3.4.5.	<i>hugin</i> -Neurone als Projektions- oder modulatorische Neurone.....	63
4.	Diskussion.....	69
4.1.	Die Fressmutante P(9036) und das Neuropeptid-Gen <i>hugin</i>	69
4.2.	Optische und genetische Methoden.....	71
4.3.	Genomweite molekularbiologische Methoden.....	73
4.4.	Die Rolle von <i>hugin</i> in der Ecdysis-Modifikation.....	75
4.5.	Die Rolle von <i>hugin</i> -Neuronen in der Geschmacksverarbeitung	77
4.6.	<i>hugin</i> -Neurone als modulatorische Neurone.....	79
5.	Literatur.....	83
6.	Anhang	89
6.1.	Neuropeptid-Sequenzvergleiche	89
6.2.	Primer-Sequenzen für <i>InSitu</i> -Sonden.....	103
6.3.	Vergleiche der Expressionsprofile von P(9036) und P(6913).....	106
	Danksagungen	109
	Lebenslauf	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Das Zentralnervensystem als Relaisstation, welche in der <i>Drosophila</i> -Larve Nahrungsaufnahme, Wachstum und Entwicklung beeinflusst.	3
Abbildung 1.2 Externe und interne Geschmacks- und Geruchssinnesorgane und deren Konnektivitäten zum Zentralnervensystem (ZNS) von <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Abbildung 1.3 Neuropil-Regionen und Konnektivitäten im adulten <i>Drosophila</i> -ZNS mit Beteiligung an der Geschmacks- und Geruchsinformationsverarbeitung.	8
Abbildung 2.1 <i>Emission fingerprinting</i> zur Auftrennung von sich überlagernden Fluoreszenzsignalen mit dem Zeiss LSM 510 META.	21
Abbildung 3.1 Molekulare Analyse der P(9036)-Mutanten.	32
Abbildung 3.2 Expressionsanalyse verschiedener ZNS-spezifischer Markerproteine am Larvengehirn von <i>Drosophila melanogaster</i>	37
Abbildung 3.3 Expressionsanalyse verschiedener ZNS-spezifischer Neuropeptide mittels histochemischen und Fluoreszenz- <i>InSitu</i> -Hybridisierungen am Larvengehirn von <i>Drosophila melanogaster</i>	38
Abbildung 3.4 Neuroanatomische Analyse verschiedener Zellpopulationen und deren Konnektivität mittels zell-spezifischer Expression von Markergenen im <i>Drosophila</i> -Larvengehirn.	40
Abbildung 3.5 Kreuzungsschema zur Generierung einer dreifach transgenen Fliege, welche im <i>klu</i> -mutanten Hintergrund ein Markergen unter dem <i>enhancer trap</i> -Konstrukt <i>Okt30</i> exprimiert.	45
Abbildung 3.6 Neuroanatomischer Vergleich der Expressionsdomänen von artifiziellen und endogenen <i>dilp3</i> - bzw. <i>hugin</i> -Promotoren mittels Fluoreszenzfärbung.	46
Abbildung 3.7 Expression von Markergenen unter dem Promotor-Konstrukt <i>InsP3</i> im <i>klu</i> -mutanten Hintergrund.	48
Abbildung 3.8 Potenzielle Zielgene des Transkriptionsfaktors <i>klu</i>	51
Abbildung 3.9 Neuropeptide als Marker zur semiquantitativen Analyse von P(9036)-mutanten Larvengehirnen.	53
Abbildung 3.10 Regulation der <i>hugin</i> -Expression im Wildtyp als Antwort auf Hungern.	54
Abbildung 3.11 Charakterisierung des Neuropeptid-Gens <i>hugin</i>	55

Abbildung 3.12 Neuroanatomische Analyse der <i>hugin</i> -Zellen sowie deren Konnektivität in Larven und Adulten von <i>Drosophila melanogaster</i>	57
Abbildung 3.13 Phänotypische Analyse der <i>hugin</i> -Zell- <i>knock outs</i> und der <i>hugin</i> -mRNA- <i>knock downs</i>	58
Abbildung 3.14 Regulation der <i>hugin</i> -Expression in Antwort auf sensorischen <i>Input</i> (SI).	59
Abbildung 3.15 Neuroanatomische Analyse der Konnektivität von <i>hugin</i> -Neuronen und Geschmacks-/Geruchssinnesneuronen.	60
Abbildung 3.16 Neuroanatomische Analyse der Innervierung des SOG/Tritocerebrums durch Geschmackssinnesneurone sowie durch <i>hugin</i> -Neurone.....	62
Abbildung 3.17 Geschmackstests mit <i>hugin</i> -Zell- <i>knock outs</i> und <i>hugin</i> -mRNA- <i>knock down</i> -Individuen.....	63
Abbildung 3.18 Neuroanatomischer Vergleich von Projektionsneuronen mit <i>hugin</i> -Neuronen.....	64
Abbildung 3.19 Vergleich der Expressionsdomänen von <i>TH</i> (<i>tyrosine hydroxylase</i>) und <i>hugin</i> im ZNS von <i>Drosophila</i> -Larven und -Adulten.....	66
Abbildung 4.1 Zusammenfassung der <i>hugin</i> -Afferenzen und -Efferenzen.	70
Abbildung 4.2 Modellhafte Darstellung der Zusammenhänge von <i>hugin</i> und Nahrungsaufnahme in P(9036) und P(6913).....	75
Abbildung 4.3 Modellhafter Versuchsaufbau zum Ca^{2+} - <i>Imaging</i> in <i>hugin</i> -Neuronen.	78
Abbildung 4.4 Modell zur Korrelation des <i>hugin</i> -Expressionsniveaus mit dem Fressverhalten.....	80
Abbildung 6.1 Vergleich der Expressionsprofile von P(9036)- und P(6913)-Mutanten	107

1. Einleitung

1.1. Regulation von Nahrungsaufnahme und Wachstum

Elementare Vorgänge wie Nahrungsaufnahme, Wachstum und Entwicklung müssen in allen Organismen wohl koordiniert und auf äußere Bedingungen und Einflüsse abgestimmt werden. So ist die Verfügbarkeit adäquater Nahrung in postembryonalen Stadien aller höheren multizellulären Organismen die wichtigste Voraussetzung für Wachstum und Entwicklung auf Zell-, Organ- und Organismenebene. Dabei muss ein Organismus in der Lage sein, Nährstoffbedarf und –angebot zu evaluieren und entsprechende Signale in angebrachte Verhaltensweisen zu übersetzen. Die Rolle des Zentralnervensystems (ZNS) bei der Integration von Signalen aus der Peripherie des Organismus über den eigenen Ernährungsstatus mit sensorischen Signalen aus der Umwelt über Verfügbarkeit und Qualität von Nahrung ist, wenn auch nur ungenügend verstanden, so doch unbestritten.

Zur Erforschung dieser Zusammenhänge stellt die Taufliege *Drosophila melanogaster* einen Modellorganismus erster Wahl dar. Im Anschluss an die Embryonalentwicklung findet hier während der viertägigen Larvalphase ein enormes Wachstum statt. Als kontinuierliche Fresser nehmen die *Drosophila*-Larven um das 200-fache an Gewicht zu, wobei in den endoreplikativen Larvalgeweben primär Energie und Baumaterial gespeichert wird, um während der stationären Puppenphase den Imaginalgewebe die Entwicklung zur Imago zu ermöglichen. Die Anlagen dieser Imaginalgewebe liegen als Imaginalscheiben bereits in der Larve vor, wo sie sich (im Gegensatz zu der Endoreplikation der Larvalgewebe) durch mitotische Teilung bereits entwickeln. Die Mitose der Imaginalgewebe wie auch die Endoreplikation der Larvalgewebe ist zunächst strikt abhängig von der Nahrungsaufnahme. So befinden sich beim Schlüpfen der Larve bis auf wenige Pilzkörper-Neuroblasten weder Larval- noch Imaginalgewebe in der Teilungsphase, erst nach Beginn der Nahrungsaufnahme wird Mitose bzw. Endoreplikation initiiert (Britton and Edgar, 1998). Nach dieser Initiation der Teilung durch Nahrungsaufnahme reagieren beide Gewebetypen unterschiedlich auf Nahrungsentzug. So wird auf einen Hungerreiz die Endoreplikation in den Larvalgeweben sofort gestoppt, während sich die Imaginalgewebe zunächst weiterentwickeln. Durch diese Umverteilung der Nährstoffe von Larval- zu Imaginalgewebe wird zumindest für gewisse Zeit die Integrität der für die Entwicklung der Adultfliege wichtigen Imaginalscheiben sichergestellt (Britton and Edgar, 1998).

Eine wichtige Rolle spielt dabei der Fettkörper der Larve, welcher funktionell als Homologes der Vertebraten-Leber gilt. Neben dem Speichern von Energie in Form von Lipiden und Kohlenhydraten ist die vornehmliche Aufgabe dieses Organs die Speicherung von Aminosäuren, die limitierend für die Entwicklung der Imaginal-Gewebe sind. Der Aminosäuren-Transporter *slimfast* (*slif*), der neben allen anderen Larval-Geweben hauptsächlich im Fettkörper exprimiert wird, scheint Teil eines Aminosäuren-Sensorsystems zu sein (Colombani et al., 2003), über das Wachstum und Entwicklung kontrolliert werden. Ein Fettkörper-spezifisches Ausschalten von *slif* induziert in der Larve dieselben physiologischen Reaktionen wie Aminosäuren-Entzug aus der Nahrung. So wird die Transkription verschiedener Hungermarker-Gene reguliert, in Fettkörper-Zellen gespeicherte Nährstoffe werden mobilisiert, die Entwicklung wird verzögert und das Wachstum gehemmt (Colombani et al., 2003).

Eine ähnliche Rolle in Aminosäuren-abhängigen Signalwegen, über welche Wachstum und Entwicklung reguliert und gesteuert werden, scheint *pumpless* (*ppl*) zu spielen. Dieses *Drosophila*-Homologe einer Enzym-Untereinheit des Glycinspaltsystems der Vertebraten wird ebenfalls und exklusiv im Fettkörper der Larve exprimiert (Zinke et al., 1999). Der Verlust von *ppl* führt in *Drosophila*-Larven des 1. Instar zu einem Stopp von Nahrungsaufnahme und Wachstum sowie zur Initiation eines Wanderverhaltens, welches typisch für wildtypische Larven des 3. Instar kurz vor der Verpuppung ist. Möglicherweise führt eine Akkumulation von freiem Glycin in der Hämolymphe zu den mutanten Verhaltensweisen, die interessanterweise auch in Wildtyp-Larven durch Füttern von einzelnen Aminosäuren in hoher Konzentration induziert werden können (Zinke et al., 1999). Wie auch im Falle von *slimfast*, ist bei den *ppl*-Mutanten ein Defekt am Anfang einer nahrungsabhängigen Signalkette bekannt. Die Art und Weise, wie die Peripherie (in diesen Fällen der larvale Fettkörper) entsprechende Signale an das ZNS vermittelt, ist unbekannt (siehe auch Abbildung 1.1).

Generell wurde jedoch die Existenz solcher humoraler Signale bewiesen, welche vom Fettkörper über die Hämolymphe in das ZNS gelangen. So können Neuroblasten in isolierten Gehirnen von 1. Instar-Larven (welche direkt nach dem Schlüpfen der Larve in der mitotischen G₀-Phase arretiert sind und erst nach der ersten Nahrungsaufnahme der Larve wieder in die Mitose eintreten) durch Cokultur mit Fettkörpern von gefütterten älteren Larven zur Initiation der Zellteilung stimuliert werden (Britton and Edgar, 1998). Weitere Komponenten und Mechanismen auf zellulärer Ebene, über welche Aminosäuren, der Fettkörper, *ppl* oder *slif* Wachstum und Entwicklung beeinflussen, sind bisher weitgehend unbekannt.

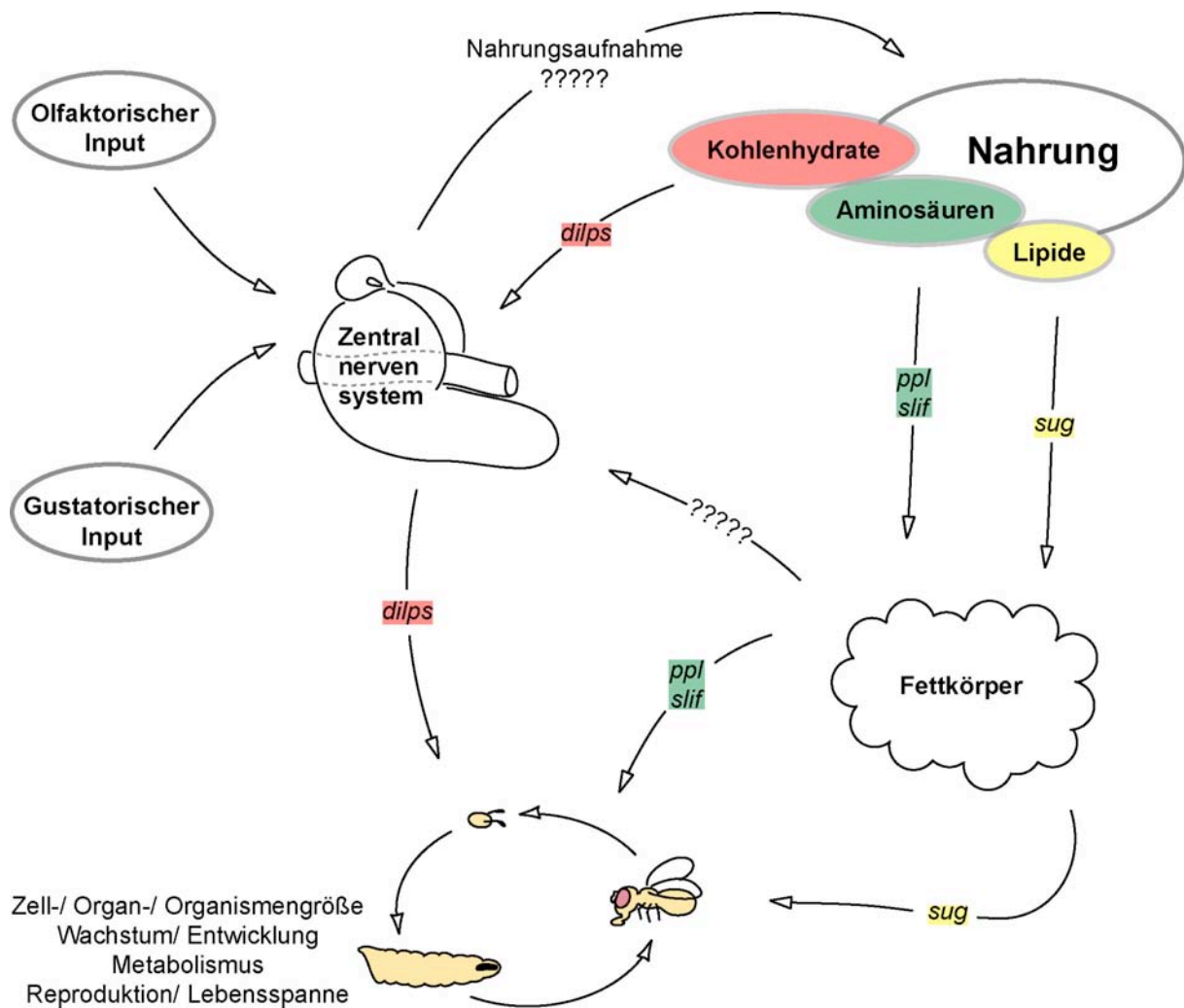


Abbildung 1.1 Das Zentralnervensystem als Relaisstation, welche in der *Drosophila*-Larve Nahrungsaufnahme, Wachstum und Entwicklung beeinflusst.

In Abhängigkeit von über die Nahrung aufgenommenen Kohlenhydraten, Aminosäuren und Fetten sind Proteine wie die dilps (*drosophila insulin like peptides*), ppl (*pumpless*), slif (*slimfast*) oder sug (*sugarbabe*) an der Vermittlung von Signalen beteiligt, welche über das Zentralnervensystem (ZNS) und den Fettkörper nicht nur das Wachstum auf Zell-, Organ- und Organismenebene beeinflussen, sondern auch den gesamten Metabolismus, Entwicklungsvorgänge wie die Metamorphose sowie die Reproduktion und die Lebensspanne von *Drosophila*. Wie das ZNS Informationen des Ernährungszustands des sich entwickelnden Organismus mit dessen Bedarf an Nährstoffen abgleicht und darüber hinaus nach Integration von sensorischen Informationen aus der Umgebung die Nahrungsaufnahme entsprechend reguliert, ist weitgehend unbekannt.

Im Falle der *InR/PI3K*-Signalkaskade (*Insulin-Rezeptor/Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase*), die in Modellorganismen wie dem Nematoden *C. elegans*, in *Drosophila* und in der Maus hoch konserviert ist (Garofalo, 2002), stellt sich die Situation anders dar. Neben vielen Details über intrazelluläre Komponenten und Mechanismen (wie dem

Insulin-Rezeptor *InR*, dem *InR*-Substrat *Chico* oder den Kinasen *PI3K* und *S6K*, welche letzten Endes die Translationskontrolle dieses Signalweges ausüben, zusammengefasst bei (Garofalo, 2002)), sind hier auch zentrale Stationen dieses hauptsächlich Zucker-abhängigen Signalweges bekannt. So werden drei der sieben potenziellen *Drosophila*-Insuline (*dilps*, drosophila insulin like peptides) spezifisch in neurosekretorischen Zellen im ZNS exprimiert und über Aorta und Ringdrüse (dem wichtigsten neuroendokrinen Organ der *Drosophila*-Larven) systemisch verbreitet (Brogiolo et al., 2001; Rulifson et al., 2002). Ein mutanter Phänotyp ist für keines der *Drosophila*-Insuline bekannt, jedoch wurde für *Drosophila*-Larven eine nahrungsabhängige Expression der *dilp*-Gene sowie Wachstums- und Entwicklungsstörungen bei genetischer Ablation der *dilp*-exprimierenden Neuronen gezeigt (Ikeya et al., 2002; Rulifson et al., 2002). Auf welche Art und Weise das Zentralnervensystem bzw. die *dilp*-positiven neurosekretorischen Zellen Informationen über den Ernährungszustand des Organismus erhalten, ist unbekannt (siehe auch Abbildung 1.1).

Genomweite Untersuchungen an wildtypischen *Drosophila*-Larven unter verschiedenen Nahrungsbedingungen lieferten auch Einblicke in die Regulation des Lipidmetabolismus. So erfolgt unter speziellen Hungerbedingungen (bei Aminosäuren-Entzug und mit Zucker als einziger Energiequelle) neben einem generellen Stopp von Wachstum und Entwicklung als erste und heftigste Antwort eine Regulation des Transkriptionsfaktors *sugarbabe* (*sug*) (Zinke et al., 2002). Anhand von Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass *sug* den Lipid-Katabolismus ausschaltet und gleichzeitig den Lipid-Anabolismus aktiviert. Für die Existenz eines „Lipid-abhängigen“ (den Aminosäuren-abhängigen vergleichbaren) Signalweges, welcher möglicherweise ebenfalls das ZNS beinhaltet, gibt es bisher in *Drosophila* keine Hinweise. Jedoch kann die Rolle von Lipiden als essentieller Bestandteil der Nahrung als gesichert angesehen werden, da z.B. *Drosophila* wie alle Insekten nicht zur *de novo*-Synthese von Steroiden fähig sind. Die Vorläufer-Moleküle der überaus wichtigen Steroidhormone wie dem Ecdyson müssen daher über die Nahrung aufgenommen werden (Nijhout, 1994). Aber auch hier ist über *feed back*-Mechanismen, welche Ecdyson-Signalkaskaden mit der Regulation von Nahrungsaufnahme oder Wachstum koppeln, nichts bekannt (siehe auch Abbildung 1.1).

1.2. Neuroanatomie von Geschmacks- und Geruchswahrnehmung

Dass nicht nur interne Signale zur Regulation der Nahrungsaufnahme nötig sind, sondern auch externe Stimuli wie Geschmack und Geruch die Nahrungsaufnahme beeinflussen, ist lange bekannt (zusammengefasst z.B. bei (Singh, 1997)). Die Geschmacks- und Geruchssinnesorgane sind bei *Drosophila melanogaster* über den ganzen Körper verteilt. Geruchssensillen zur Detektion flüchtiger Moleküle finden sich im Adultstadium vornehmlich in den Antennen, den Maxillarpalpen und an den Flügelvorderkanten. Externe kontaktchemosensorische Geschmackssensillen sind in Adulten an Labellum, Flügelkanten, Beinen und weiblichen Genitalplatten lokalisiert, während der Pharynx interne Geschmackssinnesorgane beherbergt (Singh, 1997; Stocker, 1994). Die Anatomie der wichtigsten olfaktorischen und gustatorischen Sensillen von *Drosophila*-Larven und -Adulten sowie deren Verbindungen zum ZNS sind in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Ein an die Adultsituation angelehntes Modell für die larvalen Sinnesorgane sowie deren ZNS-Konnektivität scheint gerechtfertigt, da für die internen Geschmackssensillen eine Integration der larvalen Strukturen in das Sinnessystem der Adulten gezeigt wurde (Gendre et al., 2003).

Sinnesneurone in den jeweiligen gustatorischen und olfaktorischen Sensillen exprimieren Geruchs- bzw. Geschmacksrezeptoren, die zur Klasse der G-Proteingekoppelten 7-Transmembran-Rezeptoren gehören. Nach Binden eines adäquaten Liganden werden über bisher unbekannte sekundäre Botenstoffe vermittelte Signalkaskaden in Gang gesetzt (Singh, 1997). Nach der Sequenzierung des kompletten Genoms von *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) wurden basierend auf Sequenzvergleichen zwei divergente Familien von Geschmacks- bzw. Geruchsrezeptoren identifiziert. Die Familie der möglichen olfaktorischen Rezeptoren (DORs, *Drosophila olfactory receptors*) umfasst 56 Mitglieder (Vosshall et al., 2000), während als putative gustatorische Rezeptoren (GRs, *gustatory receptors*) 57 Kandidaten publiziert wurden (Scott et al., 2001). Für die DORs konnte gezeigt werden, dass jedes Sinnesneuron in Antennen und Maxillarpalpen genau zwei Rezeptor-Gene exprimiert, nämlich OR83b sowie ein weiteres Mitglied der DOR-Familie. Eine molekulare Funktion sowie mögliche Liganden sind weder für OR83B noch für die anderen Mitglieder der DOR- und GR-Familien bekannt (Scott et al., 2001; Vosshall et al., 2000). Einziger bisher auf molekularer Ebene näher untersuchter Kandidat ist der potenzielle Geschmacksrezeptor GR21D1, der sensitiv für sub-anästhetische CO₂-Level zu sein scheint (de Bruyne et al., 2003).

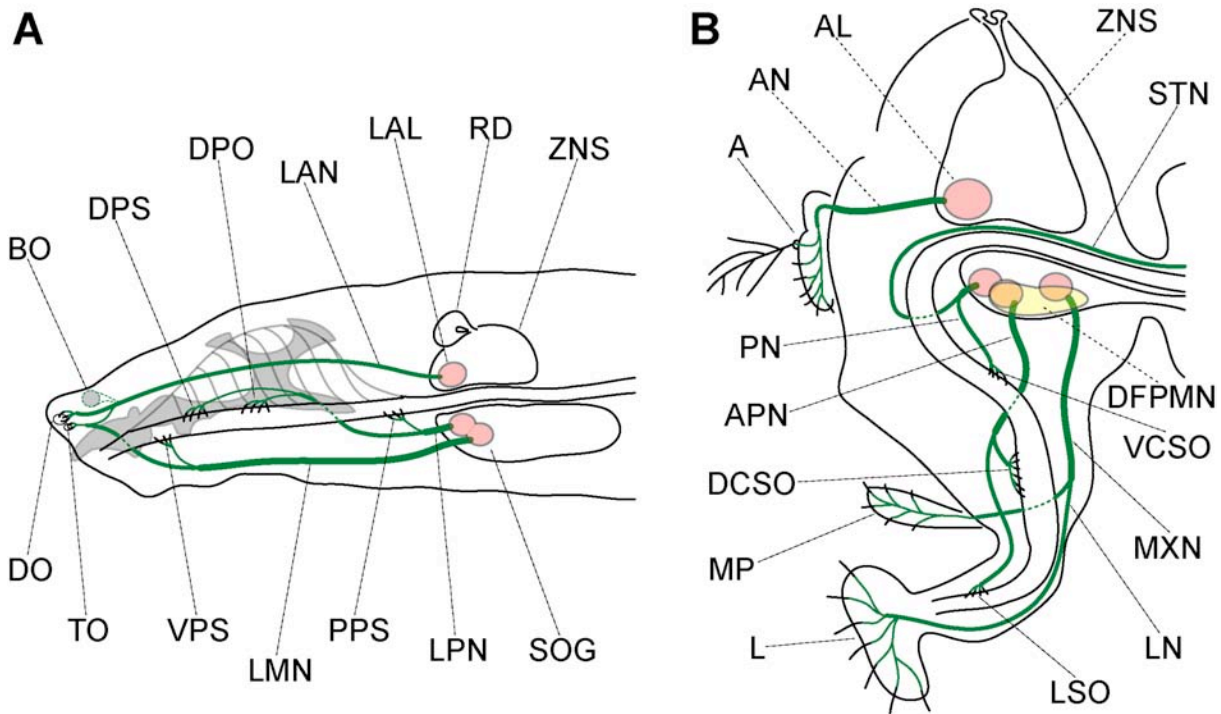


Abbildung 1.2 Externe und interne Geschmacks- und Geruchssinnesorgane und deren Konnektivitäten zum Zentralnervensystem (ZNS) von *Drosophila melanogaster*.

(A) Schematische Sagittalanalyse des antennenmaxillären Komplexes sowie des Zentralnervensystems einer *Drosophila*-Larve. Geruchssinnesneurone, welche hauptsächlich im Dorsalorgan (DO) lokalisiert sind, projizieren über den larvalen Antennennerv (LAN) ins ZNS in die larvalen Antennenloben (LAL). Über den Antennennerv gelangen auch visuelle Informationen aus den larvalen Lichtsinnes-Organen, den Bolwig-Organen (BO) ins ZNS. Externe Geschmackssinnesneurone, welche hauptsächlich im Terminalorgan (TO) lokalisiert sind, projizieren größtenteils über den larvalen Maxillarnerv (LMN) in das suboesophageale Ganglion (SOG). Die internen chemo- und mechanosensorischen Sinnesneurone im ventralen Pharynx-Sinnesorgan (VPS), dorsalen Pharynx-Sinnesorgan (DPS), dorsalen Pharynxorgan (DPO) und posterioren Pharynx-Sinnesorgan (PPS) projizieren über den LMN und den larvalen Pharyngealnerv (LPN) in das SOG. RD, Ringdrüse. (B) Schematische Sagittalanalyse der Kopfregion einer adulten *Drosophila*. Geruchssinnesneurone, welche hauptsächlich in den Antennen (A) lokalisiert sind, projizieren über den Antennennerv (AN) zu den Antennalloben (AL) ins ZNS. Externe Geschmackssinnesneurone in den Labialpalpen (L) und Maxillarpalpen (MP) projizieren über Labialnerv (LN) bzw. Maxillarnerv (MXN) in das SOG. Interne chemo- und mechanosensorische Sinnesneurone im Labialsinnesorgan (LSO) sowie dorsalem und ventralem cibarialen Sinnesorgan (DCSO bzw. VCSO) projizieren über Pharyngealnerv (PN) bzw. accessorischen Pharyngealnerv (APN) ins SOG. Das SOG erhält zusätzlich über den stomatogastrischen Nerv (STN) Informationen aus dem stomatogastrischen Nervensystem (Frontalganglion, Hypocerebralganglion und Ventricularganglion), des weiteren liegen dendritische Felder von pharyngealen Motorneuronen (DFPMN) im SOG. Nach (Demerec, 1994; Gendre et al., 2003; Hertweck, 1932; Mitchell et al., 1999; Singh, 1997), verändert.

Die Sinnesneurone 1. Ordnung in den Geschmacks- und Geruchssensillen innervieren olfaktorische und gustatorische Zentren im ZNS von *Drosophila*, welche bereits detailliert beschrieben sind (Mitchell et al., 1999; Singh, 1997; Stocker, 1994) (siehe auch Abbildung 1.2). So gelten die Antennalloben als erste Station der Verarbeitung von Geruchsinformation, während das suboesophagiale Ganglion (SOG) als erstes Verarbeitungszentrum für Geschmacksinformation gilt. Die Antennalloben sind sowohl in Larven als auch in Adulten in jeweils 43 Glomeruli organisiert, die stereotypisch von genau definierten Rezeptorneuronen innerviert werden. Diese Ortsauflösung mag bereits Teil der Kodierung der Geruchsinformation sein, da sie auch auf der folgenden Stufe der Reizweiterleitung beibehalten wird. Neurone 2. Ordnung, die dorsoanterior, lateral und ventral der Antennenloben lokalisierten Projektionsneurone, senden Dendriten immer nur zu einem gegebenen Glomerulus. Die dort abgegriffene Geruchsinformation wird vertikal zu Neuronen 3. Ordnung, den als eigentliche Verarbeitungszentren von Geruchsinformation angesehenen Pilzkörper-Neuronen, projiziert. Dabei innervieren die Projektionsneurone neben den Lateral-Hörnern des ZNS wiederum stereotypisierte Dendritenfelder in den Pilzkörper-Calyces (Marin et al., 2002; Wong et al., 2002).

Für das olfaktorische System ist somit die Reizweiterleitung in vertikaler Richtung bereits in sehr vielen morphologischen und neuroanatomischen Details ausgearbeitet, auch eine horizontale Verschaltung der Antennenloben durch lokale Interneurone ist bekannt (Wong et al., 2002). Selbst auf neurophysiologischer Ebene ist man dabei, die Verarbeitung von Geruchsinformation zu verstehen. So lassen sich z.B. in Projektionsneuronen Calcium-sensitive Fluorochrome wie das *Cameleon 2.1*, einer Fusion von CFP (*cyan fluorescent protein*), YFP (*yellow fluorescent protein*) und der Ca^{2+} -Bindedomäne des Calmodulin, exprimieren (Miyawaki et al., 1999). Mit zeitlich und örtlich hochauflösender Fluoreszenz-Mikroskopie lässt sich so die neuronale Aktivität in entsprechenden Neuronen sichtbar machen. Stimuliert man nun Geruchsrezeptor-Neurone mit adäquaten Gerüchen, so lassen sich über die aktiven Projektionsneurone die Glomeruli in den Antennalloben bzw. die Regionen der Pilzkörper-Calyces, welche die entsprechende Geruchsinformation empfangen, *in vivo* darstellen. Auf diese Weise wurde bereits begonnen, die Geruchszentren des adulten *Drosophila*-ZNS funktionell zu kartieren (Fiala et al., 2002).

Tritocerebrum und SOG innerviert werden (Singh, 1997) (siehe auch Abbildung 1.2). So gilt das Tritocerebrum, das von manchen Autoren als der am weitesten dorsoanterior gelegene Teil des SOG und von anderen als ventraler Teil des Deutocerebrums bezeichnet wird, als mechanosensorisches Zentrum. Neben gustatorischen Informationen werden hier wohl hauptsächlich Informationen von mechanorezeptorischen Neuronen, welche in den gustatorischen Sensillen mit Kontaktchemorezeptor-Neuronen kolokalisieren, empfangen und verarbeitet (Mitchell et al., 1999). Das SOG, das prinzipiell eine Fusion der drei Mund-Neuromere (mandibuläres, maxilläres und labiales Neuomer) darstellt, scheint vergleichbar mit den Antennalloben ebenfalls glomerulär organisiert zu sein. So sind neben einem unpaaren medianen zwei dorsoantere, zwei ventrolaterale und zwei ventromediane SOG-Glomeruli beschrieben (Singh, 1997). Weitere aufsteigende Nervenbahnen oder gustatorische Neurone 2. Ordnung, welche Geschmacksinformation vertikal zu höheren Gehirnregionen wie den Pilzkörpern weiterleiten (vergleichbar mit den olfaktorischen Projektionsneuronen), sind bei *Drosophila* bisher nicht bekannt. Jedoch gilt es als gesichert, dass neben olfaktorischen auch gustatorische Informationen in den Pilzkörpern verarbeitet werden (Heimbeck et al., 1999). Die Organisation dieser Gehirnzentren, die nicht nur als Hauptrelaisstation für Geruchs- und Geschmacksinformation gelten, sondern auch als Sitz des Gedächtnisses von *Drosophila* angesehen werden (Heisenberg et al., 1985), ist schematisch in Abbildung 1.3 dargestellt (Zusammenfassung siehe auch (Ito et al., 1998)).

Interessanterweise ist eine absteigende Verbindung von neurosekretorischen Zellen in der *Pars intercerebralis* (der protocerebralen Gehirnregion, welche u.a. die *dilp*-positiven Neurone beherbergt, s.o.) zum Tritocerebrum bzw. SOG beschrieben (Singh, 1997). Somit könnte durchaus das Insulin-/Glukagon-System im Protocerebrum mit den Geschmackszentren im SOG verschaltet und dadurch eine Verbindung zwischen Wachstumsregulation und Geschmacksverarbeitung gegeben sein. Des weiteren geht man davon aus, dass Tritocerebrum und SOG auch dendritische Felder von pharyngealen bzw. labialen Motorneuronen beherbergen. „Fress“-spezifische Bewegungen wie der PER (*proboscis extension reflex*) scheinen unter Umgehung höherer Gehirnzentren (wie der Pilzkörper) über lokale neurale Schaltkreise gesteuert zu werden. Dabei scheint Geschmacks-*Input* über bisher uncharakterisierte lokale Interneurone direkt zu spezifischem Motor-*Output* zu führen (Mitchell et al., 1999). Die Identität solcher Neurone ist bisher nicht bekannt.

In vorliegender Arbeit sollte durch die phänotypische Analyse der Fressmutante P(9036), die neben dem Stopp der Nahrungsaufnahme und Wachstumsdefekten im 1. Larvalstadium auch ein Wanderverhalten typisch dem von 3. Instar-Larven kurz vor deren Verpuppung zeigt, eine Rolle des Zentralnervensystems bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Wachstum aufgezeigt werden. Zielsetzung war dabei vor allem die neuroanatomische Analyse des P(9036)-mutanten Gehirns, welches als primär betroffenes Organ der in der P(9036)-Linie auftretenden Mutation bereits feststand (Melcher, 2001). Im Laufe dieser auf optischen und genomweiten molekularbiologischen Methoden basierenden Analyse sollten auch weitere Einblicke in die wildtypische Situation der neuronalen Regulation der Nahrungsaufnahme bei *Drosophila melanogaster* erarbeitet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Antikörper

Bezeichnung	Antigen	W.-Organismus	Verdünnung	Bezugsquelle / Referenz
22C1	unbekannt, neuropil-spez.	Maus	1:300	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
α - β Gal	β -Galaktosidase	Kaninchen	1:1000	Cappel
α -Bio	Biotin	Schaf	1:1000	Roche, Mannheim
α -Bio-AP	Biotin	Schaf	1:1000	Roche, Mannheim
α -Bio-POD	Biotin	Schaf	1:500	Roche, Mannheim
BP102	unbekannt, neuropil-spez.	Maus	1:200	DSHB
BP104	unbekannt, neuropil-spez.	Maus	1:200	DSHB
α -Dig	Digoxygenin	Schaf	1:1000	Roche, Mannheim
α -Dig-AP	Digoxygenin	Schaf	1:1000	Roche, Mannheim
α -Dig-POD	Digoxygenin	Schaf	1:500	Roche, Mannheim
α -elav		Ratte	1:300	DSHB,
α -Fluo	Fluorescein	Schaf	1:1000	Roche, Mannheim
α -Fluo-AP	Fluorescein	Schaf	1:1000	Roche, Mannheim
α -Fluo-POD	Fluorescein	Schaf	1:500	Roche, Mannheim
α -GFP	rek. GFP	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
α -klu	rek. klu	Hase	1:300	T. Klein, Köln
α -repo	rek. repo	Kaninchen	1:1000	DSHB
alpha-Bungarotoxin	(nAcChR)	<i>Bungarus multicinctus</i>	1:500	Molecular Probes, Eugene/Oregon, USA
Alexa488	Maus/Ratte/Hase	Schaf/Ziege	1:300	Molecular Probes, Eugene/Oregon, USA
Cyanine2/3/5	Maus/Ratte/Hase/Ziege	Schaf/Ziege	1:200	JacksonLab, USA Dianova, Hamburg

2.1.2. Enzyme

Name	Abkürzung	Bezugsquelle
Calf Intestine Phosphatase	CIP	NEB, Frankfurt
Desoxyribonuklease	DNaseI	Promega, Mannheim
Lysozym		Roche, Mannheim
Proteinase K		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Restriktionsendonucleasen		Gibco BRL - Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe NEB, Frankfurt
Ribonuklease	RNase	Promega, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase	SAP	Promega, Mannheim
SuperScript™II RNase H ⁻ Reverse	RT	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland),

Transcriptase		Karlsruhe
T4 DNA-Ligase		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Taq-Polymerase	Taq	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe

2.1.3. Fliegenlinien

Linienbezeichnung	Genotyp	Liniennummer / Bezugsquelle
Feb211	w;P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}T2; P{GawB}63E1-2	Feb211-GFP / T. Siegmond
D/TM3	w/y; ; D/TM3,Sb,Ser	eigene Linie
elav-gal4	P{w[+mW.hs]=GawB}elav ^{C155}	458 / Bloomington
GH146	w; ;GH146/TM3	GH146 / R. Stocker
GH146.Cam2.1	w; ; {GH146+Cameleon2.1}	B. Gerber
GR2B1	w;Bl/CyO;GR2B1/Tm6b	GR2B1 / K. Scott
GR21D1	Gr21D1;Bl/CyO;Tm2/Tm6b	GR21D1 / K. Scott
GR66C1	w;GR66C1/CyO;Tm2/Tm6b	GR66C1 / K. Scott
hs-gal4	P{ry[+t7.2]=GAL4-Hsp70.sev}2/CyO;ry*	2023 / Bloomington
hug-RNAi	w; P{w[+mC]=UAS-hugRNAi+UAS-eGFP}	eigene Linie
hugS3	w; ; pCaSpeR{w[+mC]=GAL4-hugS}	eigene Linie
hug-YFP	w; pCaSpeR {w[+mC]=YFP-hugS} (nicht lokalisiert)	eigene Linie
InsP3	w; ; pCaSpeR {w[+mC]=GAL4-InsP3}	eigene Linie
Kurs21	w; ;P{GawB}98F11-99A1	Kurs21 / T. Siegmond
lacZ	w;P{w[+mC]=UAS-lacZ.NZ}J312	3956 / Bloomington
Mai369	w;P{GawB}25B1-2	Mai369 / T. Siegmond
nSyb-GFP	w;P{w[+mC]=UAS-nSyb.eGFP}3	6922 / Bloomington
Okt30	y ^{P{GawB}okt301B3-4} ; ;	Okt30 / T. Siegmond
tripleM	Okt30;τ-GFP;P(9036)/TM3	eigene Linie
P(6913)	I(3)78Cb ⁰⁶⁹¹³	A.T.C. Carpenter
P(9036)	P{ry[+t7.2]=PZ}klu[09036]ry[506]/TM3; ry[RK]Sb[1]Ser[1]	11733 / Bloomington
R11/R12/R13	{P(9036)+InsP3}/TM3	eigene Linien
τ-GFP-R11/R13	T-GFP; {P(9036)+InsP3}/TM3	eigene Linien
sal/CyO	w;sal/CyO	eigene Linie
Sp/CyO; Dr/TM3	w/y;Sp/CyO;Dr/TM3,Sb	eigene Linie
τ-GFP	w; ;P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}T2	Bloomington
τ-lacZ	w;P{w[+mC]=UAS-tau-lacZ.B}2	5829 /Bloomington
TH	w; ; P{ w[+mC]=GAL4-TH}	TH-Gal4 / B. Gerber
TM3-GFP	w; ;P{w[+mC]=GAL4-Kr.C}DC3,P{w[+mC]=UAS- GFP.S65T}DC7	5194 / Bloomington
UAS-klu	w;If/CyO;UAS-HA-klu ⁰⁰¹⁻⁰¹²	T. Klein, Köln

UAS-reaper	w;P{UAS-rpr.C}14;	5824 / Bloomington
Wildtyp	Oregon RS	4269 / Bloomington
W1118	w ¹¹¹⁸	3605 / Bloomington

2.1.4. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Binokular	Leica MS5	Leica, Göttingen
Brutschränke mit Schüttler	HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Digital-Kamera	AxioCam	C. Zeiss, Jena
Durchlicht-Mikroskop	Axioskop	C. Zeiss, Jena
Entwicklungskassetten	Suprema	Dr. Goos, Heidelberg
Filmentwickler	M35 X-OMAT Processor	Kodak, Stuttgart
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
Hybridisierungsöfen		Biometra, Göttingen
Netzgerät für Elektrophorese	200/2.0	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Netzgerät für Elektrophorese	E844	Consort
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Pipetman	Gilson (Deutschland), Langenfeld
Schwenktisch	Polymax 2040	Heidolph, Nürnberg
Sequenziermaschine	Vistra DNA Sequencer 725	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Szintillationsmessgerät	BETAmatic	Kontron, Gonsheim
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
UV-Ofen	UV Stratalinker 2400	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
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

<i>Name</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Dig (Fluo/Bio) RNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
Dig (Fluo/Bio) Detection Kit	Roche, Mannheim
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
NucleoSpin [®] Extract 2 in 1 Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin [®] RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin [®] RNA L Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAamp Tissue Kit	Qiagen, Hilden
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
Rapid Gel XL 6%	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
rediprime™ II	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Thermo Sequenase core sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Tyramide [®] Signal Amplification Kit	PerkinElmer, Boston, USA

2.1.6. Puffer und Medien

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
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
Apfelsaftagar	2,1 % (w/v) Agar, 25 % (v/v) Apfelsaft, 2,5 % (w/v) Sucrose, 10 mM Nipagin, 1 % (v/v) Ethanol
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
Chip-Hybridisierungspuffer	6 x SSC, 1 mg/ml Poly(A) DNS, 0,4 % (w/v) SDS
Coomassie-Brilliant-Blau-Entfärbelösung	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R250, 50 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure
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
Einfriermedium	RPMI mit 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO

Fix1-Lösung	100 mM HEPES, 2 mM MgSO ₄ , 1 mM EGTA, pH 6,9
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
Lämmli-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 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
MOPS-Puffer (20 x)	400 mM MOPS, 100 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7,0
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
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
Phagenpuffer	10 mM Tris-Base, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, pH 7,5
Polyacrylamid-Sammelgel	4 % (v/v) Acrylamid, 0,1 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Polyacrylamid-Trenngel	6 bis 12 % (v/v) Acrylamid, 0,16 - 0,32 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Ringer	182 mM KCl, 46mM NaCl, 3 mM CaCl ₂ , 10mM Tris
Rote Hefesuspension	0,4 g Karminsäure in 40 g Frischhefe
SDS-Probenpuffer (2 x)	25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0,01 (w/v) % Bromphenolblau, 2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
SSC (20 x)	3 M NaCl, 300 mM Na ₃ Citrat, pH 7,0
Strip-Puffer	0,05 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS
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
Western-Transferpuffer	48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol
X-Gal Färbelösung	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 3.1 mM K ₄ (Fe ^{II} (CN) ₆), 3.1 mM K ₃ (Fe ^{III} (CN) ₆), 0.3 % Triton X-100 10%

2.1.7. Vektoren und Plasmide

Name	Zusammensetzung
pCR II-TOPO	pCR II-TOPO-Vektor aus dem TOPO TM TA Cloning®Kit

<i>hugS</i> -pCR II-TOPO	1.5 kb PCR-Produkt genomischer DNA in pCR II-TOPO
pCaSpeR AUG-Gal4	P-Element-Vektor, L.B. Vosshall, New York
<i>hugS</i> -pCaSpeR-Gal4	1.5 kb NotI/BamHI-Fragment aus <i>hugS</i> -pCR II-TOPO in pCaSpeR AUG-Gal4
pUds-eGFP	Klonierungsvektor, A. Preiss, Stuttgart
pHIPS	Klonierungsvektor, A. Preiss, Stuttgart
<i>hug</i> -cDNA-pHIPS	420 bp <i>hugin</i> -cDNA aus pCR II-TOPO
<i>hug</i> -cDNA-pUds-eGFP	478 bp KpnI/SalI-Fragment aus <i>hug</i> -cDNA-pHIPS in pUds-eGFP (XhoI/KpnI-geschnitten) und 412 bp EcoRI/BamHI-Fragment aus <i>hug</i> -cDNA-pHIPS (über EcoRI/BglII)
<i>hug</i> -RNAi	RNA- <i>interference</i> -Konstrukt für <i>hugin</i> (= <i>hug</i> -cDNA-pUds-eGFP), eGFP als Expressionsmarker
<i>InsP3</i> -pCR II-TOPO	800 bp PCR-Produkt genomischer DNA in pCR II-TOPO
<i>InsP3</i> -pCaSpeR-Gal4	855 bp EcoRI-Fragment aus <i>InsP3</i> -pCR II-TOPO in pCaSpeR-Gal4
<i>hugS</i> -CFP	<i>Gal4</i> des pCaSpeR AUG-Gal4 über BamHI/XbaI durch 722 bp CFP-Fragment (BamHI/XbaI) ersetzt
<i>hugS</i> -YFP	<i>Gal4</i> des pCaSpeR AUG-Gal4 über BamHI/XbaI durch 722 bp YFP-Fragment (BamHI/XbaI) ersetzt
CFP	cytopl. CFP in pCS2+
YFP	cytopl. YFP in pCS2+
pCS2+	Expressions- und Klonierungsvektor, Clontech, Palo Alto, CA

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
Apfelsaft		Bitterfelder, Bittenfeld
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
Borsäure	H ₃ BO ₃	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau		Serva, Heidelberg

Calciumchlorid	CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroform	CHCl ₃	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250		Serva, Heidelberg
Desoxyadenosintriphosphat	dATP	Promega, Mannheim
Desoxycytosintriphosphat	dCTP	Promega, Mannheim
Desoxyguanosintriphosphat	dGTP	Promega, Mannheim
Desoxythymidintriphosphat	dTTP	Promega, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol; 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
Glutathion red.		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Glutathion-Agarose-Beads		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Glycerol, Glycerin		Roth, Karlsruhe
Glycin		Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat		Roth, Karlsruhe
Halocarbonöl		Voltalef, Hamburg
Hefe-Extrakt		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Heparin		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
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
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	TEMED	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylen-bis-acrylamid		Roth, Karlsruhe
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
Nylonmembranen (<i>Hybond</i>)		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Nylonmembranen (<i>porablot NY amp</i>)		Macherey-Nagel, Düren
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
Poly(A) DNA		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Polyethylenglykol	PEG	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Prolin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Protein G Agarose		Dianova, Hamburg
PS-Röhrchen mit Ceaprenstopfen		Greiner, Frickenhausen
Random Hexamers		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Rinderserum-Albumin	BSA	NEB, Frankfurt
RNA-Längenmarker		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
RNA-Ladepuffer		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Röntgenfilme (<i>HyperfilmTMMP + ECL</i>)		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
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
Whatman 3MM-Filterpapier		Schleicher&Schuell, Dassel
Zellkulturartikel		Greiner, Frickenhausen
Ziegenserum	ZS	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Zinksulfat	ZnSO ₄	Roth, Karlsruhe

Zuckerrübensirup		Grafshafter, 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. Zum Ansetzen von Embryo- oder Larvensammlungen wurden die Adulten in Populationskäfige auf Apfelsaft-Agarplatten mit Frischhefe als Futterquelle umgesetzt. Fütterungsexperimente wurden in der Regel mit Larven einer 0–4 h Embryosammlung durchgeführt. Die Larven wurden zu Beginn eines Experiments aus der Frischhefe ausgewaschen und auf Petrischalen umgesetzt. Je nach Futterbedingung enthielten die Petrischalen (soweit nicht anders dargestellt) Filterpapiere getränkt mit PBS (Hungerreiz), PBS plus 20% Zucker (Hungerreiz+Zucker) oder PBS plus Frischhefe (als normale Futterbedingung). Für die Geschmackspräferenz-Experimente wurde Wasseragar verwendet, dem für die Inserts 20% Zucker bzw. 2 M NaCl zugesetzt wurde.

2.2.2. 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. Parallele Detektion der Eigenfluoreszenzen von GFP (*green fluorescent protein*) und YFP (*yellow fluorescent protein*) erfolgte mit dem META-Detektor des Zeiss LSM 510 im *lambda*-Modus. Dabei wurde die gesamte emittierte Fluoreszenz über einen wählbaren Wellenlängenbereich gesammelt und spektral aufgetrennt einem Multikanal-Detektor zugeführt. Als Referenz-Spektren für das anschließende *emission fingerprinting* (das Entmischen der sich überlagernden Einzelspektren, siehe Abbildung 2.1) wurden die getrennten Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome (in diesem Falle GFP und YFP) verwendet, welche für jedes Experiment neu aufgenommen wurden.

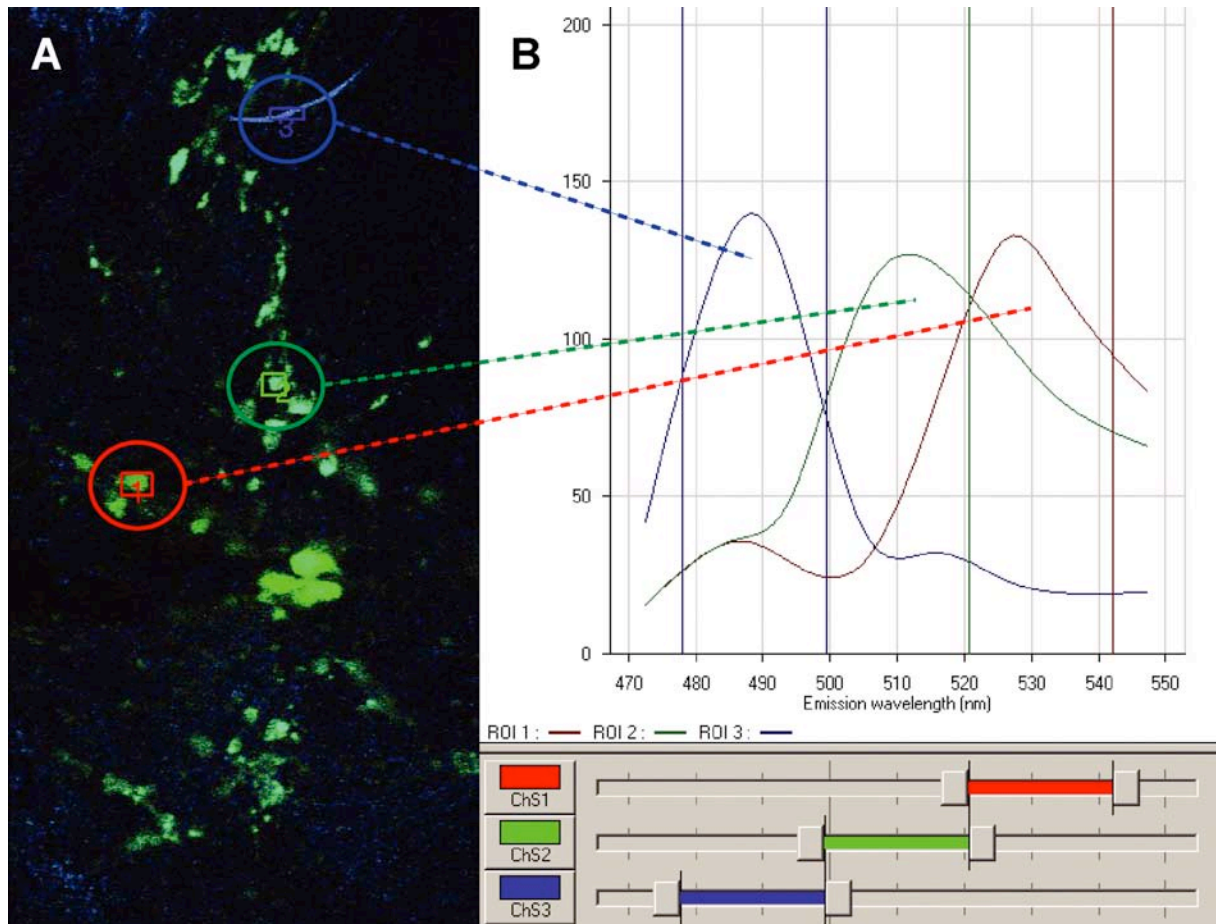


Abbildung 2.1 *Emission fingerprinting* zur Auftrennung von sich überlagernden Fluoreszenzsignalen mit dem Zeiss LSM 510 META.

(A) In der Echtlicht-Fluoreszenzaufnahme der SOG-Region eines *Drosophila*-Larvengehirns (Genotyp *hug-YFP;GR21D1>nSyb-GFP*, siehe 3. Ergebnisse für Details) sind die Emissionen von GFP (bläulicheres Grün) und YFP (gelblicheres Grün) nicht zu unterscheiden. Daher wurde im *lambda*-Modus über den Wellenlängenbereich von 470 nm bis 550 nm detektiert und das gesamte Signal spektral auf acht Einzeldetektoren aufgeteilt. Sind Domänen mit Einzel-Fluoreszenzen bekannt, so lassen sich in genau definierten Bereichen (blaue, grüne und rote Quadrate in A) über die acht Stützpunkte (die an den acht Einzel-Dektoren gemessenen Intensitäten) Emissionsspektren der Einzel-Fluoreszenzen darstellen (siehe B). Den in B dargestellten Fluoreszenz-Fingerabdrücken lassen sich Falschfarben (Rot, Grün und Blau) zuteilen und aus der über das gesamte Bild bzw. Volumen detektierten Gesamt-Fluoreszenz können anhand der Referenz-Spektren die drei Kanäle (YFP in Rot, GFP in Grün und Autofluoreszenz des Gewebes in Blau) extrahiert werden. Eine Trennung des YFP-Signals von dem des GFP mittels herkömmlicher Bandpass-Filter wäre nicht bzw. nur unter extremen Signalverlust und Über-Kreuz-Detektion möglich, da über den gesamten Bereich der YFP-Emission immer auch erhebliche GFP-Signale mitdetektiert werden (vergleiche rotes YFP-Spektrum mit grünem GFP-Spektrum in B).

Zur direkten Detektion von Eigenfluoreszenzen solcher Proteine wurden die Larven- oder Adulten-Gehirne auf Eis in *Drosophila*-Ringer präpariert, ohne Fixierung in PBS

eingedeckelt (unter Verwendung entsprechender Platzhalter zwischen Objektträger und Deckglas) und sofort mikroskopisch ausgewertet.

2.2.3. Histochemische X-Gal-Färbungen

Hierfür wurden Gehirne von Fliegenlinien, welche *lacZ* in entsprechenden Domänen exprimieren, auf Eis in Ringer präpariert und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) in 0,1 PBT+1% Formaldehyd (FA) fixiert. Danach wurde für 10 min in 0,1 PBT gewaschen und die Gehirne dann in X-Gal Färbelösung überführt. Darin erfolgte eine Präinkubation für 10 min, die eigentliche Färbung erfolgte bei 37°C in X-Gal Färbelösung mit 10 µl/ml X-Gal. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Färbereaktion durch Waschen in 0,1 PBT abgestoppt. Zum Eindeckeln und mikroskopischen Auswerten wurden die Gehirne über eine Ethanol-Reihe (je 5 min in 30% / 70% / 100% EtOH) entwässert und in Canada-Balsam eingedeckelt. Sollte zur X-Gal-Färbung noch eine histochemische *InSitu*-Hybridisierung erfolgen, so wurden die Gehirne für 1-2 Stunden in 0,5 PBT+4% FA nachfixiert und anschließend schrittweise (je 5 min 30% / 70% / 100%) in Methanol überführt. Trotz der für X-Gal-Färbungen schonenderen Fixierung mit Glutaraldehyd (GA) wurde vor allem bei Doppelfärbungen (X-Gal plus *InSitu*) immer mit FA fixiert, da GA-Fixierung zu starker Braunfärbung des Gewebes führte.

2.2.4. Markierung von *InSitu*-Sonden

Die Markierung von *InSitu*-Sonden wurde prinzipiell nach Hersteller-Angaben (*Dig/Fluo/Bio RNA labeling Kit, Roche*) durchgeführt. Nach Klonierung der cDNA des Gens von Interesse 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 PCRs 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. Nach Abstoppen der Reaktion durch Annehmen 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-*InSitu*-Hybridisierungen

Zunächst wurde hier vorgegangen wie bei histochemischen *InSitu*-Hybridisierungen. Je nach geplanter Färbung wurde jedoch mit zwei oder drei Antisense-Sonden parallel hybridisiert. Dabei war zu beachten, die unterschiedlichen Sonden mit verschiedenen Antigenen zu markieren, um getrennte Detektion zu ermöglichen. Nach erfolgter Hybridisierung, Posthybridisierung und Überführung in 0,5 PBT wurde mehrstündig in 0,5 PBT gewaschen. Nach einem einstündigen Blockierungsschritt in

0,5 PBT+5% ZS erfolgte die erste Antikörper-Inkubation bei 4°C über Nacht. Da meistens zwei Fluoreszenz-*InSitu*'s mit einer Protein-Detektion kombiniert wurden, wurden in 0,5 PBT+5% ZS mit einem POD- (Peroxydase)-gekoppelten Antikörper die erste *Antisense*-Sonde sowie mit einem entsprechenden Primär-Antikörper das Protein von Interesse detektiert. Anschließend wurde ausgiebig mit 0,1 PBT gewaschen (für 15/15/30/30/60 min) sowie vor der Färbereaktion für 10 min bei RT mit der Tyramid®-Verdünnungslösung präinkubiert. Ab der nun folgenden Einführung des ersten Fluorochroms erfolgten alle weiteren Schritte im Dunkeln (z.B. in mit Alufolie umwickelten Reaktionsgefäßen). Bei RT wurde der Peroxidase (POD) für 10 min ein 1:150 verdünntes Substrat (Tyramid® gekoppelt mit gewünschtem Fluorochrom FITC, Cy3 oder Cy5) angeboten. Dieses wird zu einem reaktiven, sehr kurzlebigen Produkt verstoffwechselt und bindet unspezifisch an alle Proteine (aufgrund der extremen Kurzlebigkeit aber doch nur dort, wo POD bzw. *Antisense*-Sonde bzw. mRNA von Interesse vorhanden ist). Diese „Färbereaktion“ wurde durch Waschen mit 0,1 PBT abgestoppt, es wurde dann für weitere 15/15/30 min in 0,1 PBT gewaschen. Da auch die zweite *Antisense*-Sonde mit einem POD-gekoppelten Antikörper (sowie einem anders-fluoreszierenden Tyramid®) detektiert werden sollte, musste die bereits eingeführte POD durch 10-minütiges Inkubieren in HCl (10 mM in *Drosophila*-Ringer) inaktiviert werden. Anschließend erfolgten weitere Waschschrte für 15/15/30 min in 0,1 PBT sowie ein 60-minütiger Blockierungsschritt in 0,1 PBT+5% ZS. Über Nacht erfolgte dann bei 4°C in 0,1 PBT+5% ZS die Detektion der zweiten *Antisense*-Sonde (mit einem POD-gekoppelten Antikörper gegen entsprechendes Antigen) sowie die Detektion des primären Protein-Antikörpers mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörper (gegen Primär-Antikörper). Die anschließend zweite Tyramid®-„Färbung“ erfolgte genau wie die erste, jedoch mit entsprechend anders-fluoreszierendem Tyramid. Auf Deaktivierung der zweiten POD konnte verzichtet werden, nach weiteren Waschschrten erfolgte Eindeckeln in Mowiol.

2.2.7. Fluoreszenz-Proteindetektion

Auch hier wurden *Drosophila*-Gehirne in Ringer präpariert und anschließend in 0,5 PBT+4% FA für 1-2 Std fixiert. Nach einigen Waschschrten 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. 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.

2.2.8. 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 $OD_{600}=0,5$ 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/ μ l) 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*).

2.2.9. 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*).

2.2.10. 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 dann 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.

2.2.11. 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 wurden 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.

2.2.12. 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 MgCl₂, 1 x PCR-Puffer, 1 U *Taq*-Polymerase, 10-100 ng

Template-DNA und je 1 μ M 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 (H₂O-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 *SuperScript™II RNase H Reverse Transcriptase* (RT). Pro Reaktion wurde 1 μ g 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 μ l 500 ng/ μ l Oligo(dT)₁₂₋₁₈ in 11,75 μ l Volumen (12,75 μ l Volumen in –RT-Kontrollen) gegeben und 10 min bei 72°C und 5 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden pro Ansatz 4 μ l 5 x *First-Strand Buffer* (mitgeliefert zur *SuperScript™II*), 2 μ l 0,1 M DTT (mitgeliefert zur *SuperScript™II*), 1 μ l 10 mM dNTP-Mix, 0,25 μ l RNasin (40 U/ μ l) und 1 μ l RT (200 U/ μ l) zugegeben. Die Reaktion erfolgte 50 min bei 42°C mit anschließender RT-Inaktivierung (15 min, 75°C). Die gewonnene cDNA wurde in einem Endvolumen von 100 μ l aufgenommen. Von dieser cDNA-Lösung konnten jeweils 5 μ l als *Template*-DNA für PCRs verwendet werden. Diese PCRs wurden in 25 μ l 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.

2.2.13. Generierung transgener Fliegen

Die Generierung transgener Fliegen durch Embryonen-Injektion erfolgte prinzipiell nach dem Protokoll von A.-M. Voie (Voie and Cohen, 1998). Dabei wurden ca. 60 min alte Embryonen (*white*[–]-Genotyp) mit geringen Mengen des p-Element-basierten Transgen-Konstruktes zusammen mit einem Δ 2,3-Helferplasmid injiziert. Die Injektion erfolgte am Hinterende der Embryonen in der Region der Poolzellen, den zukünftigen Keimbahnzellen. Adulte mit potenziell transgenen Keimbahnzellen

wurden mit *white*⁻-Fliegen in Einzelkreuzungen rückgekreuzt. Die potenziell transgenen Nachkommen dieser Kreuzungen wurden anhand der Augenfarbe auf Vorhandensein des Transgens (*white*⁺-markiert) gescreent, und transgene Fliegen wurden zur Etablierung transgener Linien wiederum in Einzelkreuzungen mit *white*⁻-Fliegen verpaart.

2.2.14. Hitzeschock-Experimente für Microarrays

Zur Bestimmung potenzieller Zielgene des Transkriptionsfaktors *klu* sollten Expressionsprofile von *klu*-Nullmutanten mit *klu*-Überexpressionsmutanten verglichen werden. Dazu wurden zum einen bei Raumtemperatur (RT) für 0–4 Stunden Embryosammlungen der P(9036)/TM3-Linie (Genotyp P(9036)/TM3-GFP) angesetzt. Nach weiteren 22 Stunden bei 25°C wurden unter GFP-Licht homozygote P(9036)-Larven (identifizierbar aufgrund fehlender TM3-GFP-*balancer*-Fluoreszenz) gesammelt. Isolierte und gereinigte Gesamt-RNA wurde Affymetrix® zur Verfügung gestellt für entsprechende Microarray-Hybridisierungen. Als Kontrolle dienten hier Wildtyp-Larven aus Parallel-Sammlungen, welche möglichst vergleichbar behandelt wurden.

Für die Überexpressionsexperimente wurden 0-4 Stunden Embryosammlungen der Kreuzung *hs-Gal4* X *UAS-klu* angesetzt, welche nach 72 Stunden bei 18°C (zur Verringerung der Basalexpression bei RT) einem 40-minütigen Hitzeschock bei 37°C unterzogen wurden. Nach weiteren 8 Stunden Regenerationszeit bei 18°C wurde Gesamt-RNA isoliert und Affymetrix® zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle dienten hier *hs-Gal4*-Larven aus Parallel-Sammlungen, welche ebenfalls hitzegeschockt wurden. Isolierung der mRNA, Hybridisierung der GeneChips® und erste statistische Auswertung der Microarrays wurde von Affymetrix® realisiert.

3. Ergebnisse

In einem P-Element-Mutagenesecscreen, bei welchem auf Defekte in der Nahrungsaufnahme hin getestet wurde, konnte neben der P(6913)-*pumpless*-Mutante und der P(9373)-Linie auch P(9036) isoliert werden. Neben einem Stopp der Nahrungsaufnahme und Wachstumsdefiziten zeigen diese Mutanten auch ein Wanderverhalten, das eigentlich bei Wildtyp-Larven kurz vor der Verpuppung zu beobachten ist. P(9036)-homozygote Larven sterben im ersten oder frühen zweiten larvalen Stadium (Instar). Auf DNA-Ebene konnte eine Insertion des P(9036)-Vektors direkt oberhalb (5'-) des ersten Exons von *klumpfuss* (*klu*), eines spezifisch im zentralen und peripheren Nervensystem exprimierten Transkriptionsfaktors, nachgewiesen werden. Die durch P(9036) hervorgerufene Mutation lässt sich auch mit den bekannten *klu*-Allelen P(1741), *klu*²¹² und *R51C* (Klein and Campos-Ortega, 1997; Yang et al., 1997) nicht komplementieren. Alle Transheterozygoten zeigen nach wie vor den beschriebenen Fressdefekt (Melcher, 2001).

Nachdem somit sehr wahrscheinlich der Verlust des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *klumpfuss* zu beschriebenen Fressdefekt führt (Melcher, 2001), sollte neben einer weiteren molekularen Analyse der P(9036)-Linie vor allem das larvale Zentralnervensystem (ZNS) dieser Mutanten auf morphologische Defekte hin untersucht werden, welche dem Fress-Phänotypen zugrunde liegen. Dabei stützt sich die Annahme, solche morphologischen Defekte im ZNS von homozygoten P(9036)-Mutanten zu finden, auf die Ergebnisse von Klein und Yang, die eine Rolle des Transkriptionsfaktors *klu* in der Differenzierung der Identität von sekundären Vorläuferzellen innerhalb einer Neuroblastenlinie aufgezeigt haben. Verlust des *klu*-Proteins führt im Ventralen Nervensystem (VNS) zur Duplikation bestimmter Vorläufer-Zelllinien und zum Verlust der entsprechenden Schwesterlinie. Ektopische Überexpression von *klu* bringt den gegenteiligen Phänotypen hervor (Klein and Campos-Ortega, 1997; Yang et al., 1997). Da eine Regulation der Nahrungsaufnahme nicht im peripheren oder ventralen Nervensystem, sondern im zentralen Teil des Zentralnervensystems, den beiden Gehirnhemisphären, stattfinden sollte, könnte durchaus ein entsprechender morphologischer Defekt zu Duplikation bzw. Verlust von „Fress“-Neuronen und somit zum beschriebenen Fress-Phänotypen führen.

3.1. Molekulare Analyse der P(9036)-Mutanten

Nachdem auf DNA-Ebene noch kein direkter Effekt von P(9036) auf das *klu*-Gen gezeigt werden konnte (Melcher, 2001), sollten die P(9036)-Mutanten zunächst auf mRNA-Ebene weiter analysiert werden. Dazu wurden PCR-Vorwärts-Primer entworfen, mit denen die *klu*-mRNA (bzw. cDNA) vom 5'-Ende kommend in 50 Basenpaar-Schritten in Kombination mit einem gemeinsamen Rückwärts-Primer kartiert werden sollte. Abbildung 3.1A zeigt die Ergebnisse dieser Kartierungs-PCR, wobei mit wildtypischer cDNA als Vorlage (*Template*) alle *Primer*-Kombinationen ein Produkt ergaben, während mit P(9036)-mutanten cDNA als *Template* und mit der *Primer*-Kombination mit dem am weitesten 5' gelegenen Vorwärts-Primer kein Produkt amplifiziert werden konnte.

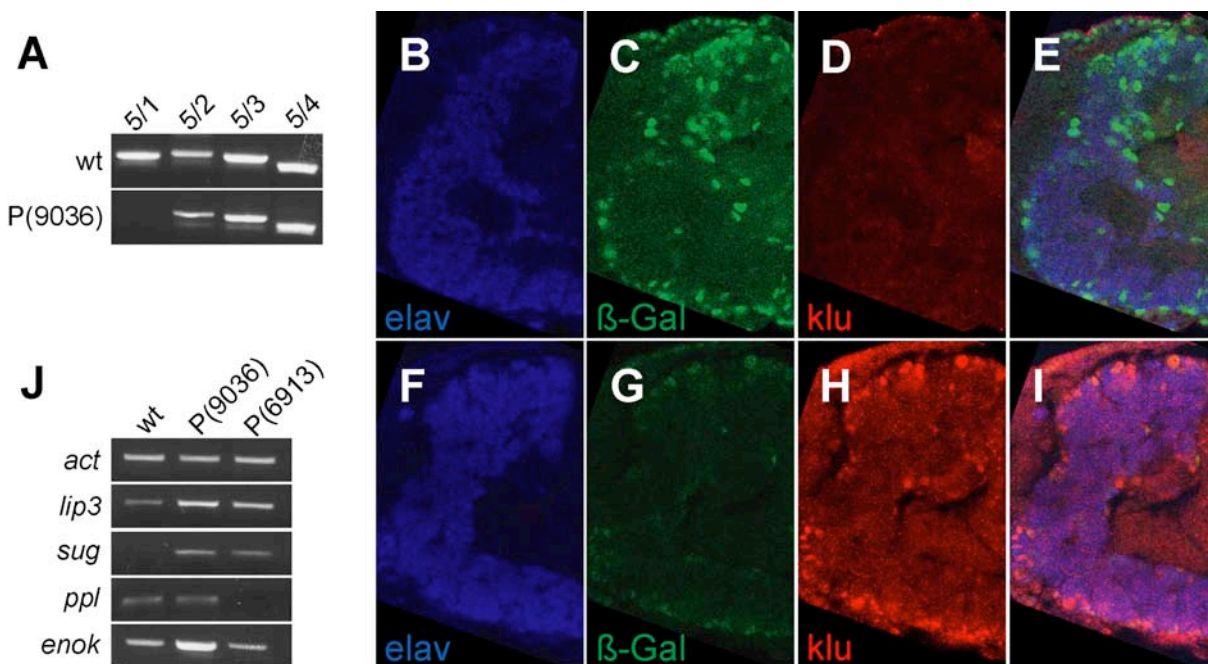


Abbildung 3.1 Molekulare Analyse der P(9036)-Mutanten.

(A) zeigt die Ergebnisse einer Kartierungs-PCR mit wildtypischer (wt) und P(9036)-mutanter cDNA als Vorlage (*Template*). In Kombination mit dem Rückwärts-Primer 5 wurde die *klu*-mRNA bzw. cDNA von 5' (in 50 bp-Schritten) mit den Vorwärts-Primern 1-4 auf Integrität getestet. Der am weitesten 5' gelegene Vorwärts-Primer 1 ergibt in Kombination mit dem Rückwärts-Primer 5 nur mit wildtypischer *klu*-cDNA als *Template* ein Produkt. (B)-(I) zeigen immunhistochemische Fluoreszenz-Aufnahmen eines P(9036)-homozygoten Embryos (B-E) sowie eines *klu*-wildtypischen heterozygoten Embryos (F-I, Genotyp P(9036)/TM3) in Lateralsicht, anterior zeigt nach links oben. Dargestellt sind jeweils optische Schnitte des anterioren Bereichs des Zentralnervensystems (siehe zur Orientierung Blaufärbung in B und F für α -*elav*, einem Marker für postmitotische Neurone). Die

Intensitätsunterschiede der α - β -Gal-Färbung (für das auf dem P(9036)-Vektor vorhandene Markergen *lacZ*, siehe Grünfärbung in C und G) ermöglichen ein Unterscheiden von P(9036)-Homozygoten (C) und P(9036)-Heterozygoten (G). α -*klu*-Färbung, welche hauptsächlich in sich entwickelnden Neuroblasten im zentralen Nervensystem auftritt (Rotfärbung in D und H), zeigt die P(9036)-Homozygoten als *klu*-negativ auf. Überlagerung aller Kanäle (E und I) zeigt zudem die Expression des P(9036)-Markergens *lacZ* unter dem *klu*-Promotor in den eigentlichen *klu*-Expressionsdomänen (Neuroblasten in den äußeren Schichten des ZNS sowie PNS). (J) Expressionsanalyse verschiedener Hungermarker in den Fressmutanten P(9036) und P(6913) mittels RT-PCR. Im Vergleich zu normal gefütterten Wildtyp-Larven (wt) sind in P(9036)-Mutanten die Hungermarker *lip3*, *sug* und *enok* wildtypisch hochreguliert, während die *ppl*-Expression nicht wie erwartet erniedrigt wird. In den P(6913)-Mutanten entspricht lediglich die Induktion der *sug*-Expression einer wildtypischen Hungerantwort.

Nachdem somit der Schluss nahelag, dass die Insertion des P(9036)-Vektors zu einer 5'-Deletion der *klu*-mRNA führt, sollten die P(9036)-Mutanten auf Vorhandensein des *klu*-Proteins getestet werden. Mit einem von T. Klein zur Verfügung gestellten α -*klu*-Antikörper wurden Embryonen der P(9036)-Linie (Genotyp P(9036)/TM3) immunhistochemisch gefärbt, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1B-I dargestellt. Da nur ein Viertel der P(9036)/TM3-Embryonen homozygot mutant sind, musste mittels α - β -Gal-Färbung zwischen wildtypischen und P(9036)-Homozygoten unterschieden werden. Dazu wurde das Markergen *lacZ*, welches den P(9036)-Vektor markiert, genutzt. Die in Abbildung 3.1 grün dargestellte α - β -Gal-Färbung tritt nur in P(9036)-Mutanten und nicht in *klu*-wildtypischen Embryonen auf (vergleiche C und G in Abbildung 3.1, Intensitätsunterschiede der α - β -Gal-Färbung ermöglichen die Unterscheidung von *klu*-wildtypischen P(9036)-Heterozygoten und mutanten P(9036)-Homozygoten). Im Gegensatz zur α - β -Gal-Färbung ist die in Abbildung 3.1 rot dargestellte α -*klu*-Färbung nur in wildtypischen Embryonen detektierbar, die P(9036)-Homozygoten erwiesen sich somit als *klu*-Protein-negativ (vergleiche D und H).

Zur weiteren Analyse der P(9036)-Mutanten wurden in RT-PCR-Experimenten verschiedene Hungermarker herangezogen, um die Fressmutanten P(9036) auf wildtypische oder veränderte Hungerantwort zu testen. Wie in Abbildung 3.1J dargestellt, werden in den P(9036)-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (und relativ zu *actin* als Ladekontrolle) die Hungermarker *lipase3* (*lip3*), *sugarbabe* (*sug*) und *enoki mushroom* (*enok*) hochreguliert, während die *pumpless* (*ppl*)-Expression unverändert bleibt. In den als Kontrolle mitgeführten Fressmutanten P(6913) (Zinke et al., 1999) konnte als wildtypische Hungerantwort nur die Induktion der *sug*-

Expression detektiert werden, alle anderen Hungermarker sprachen für eine deregulierte Hungerantwort (siehe hierzu auch Anhang 6.3).

3.2. Morphologische Analyse des larvalen *Drosophila*-ZNS

3.2.1. Morphologische Analyse auf Proteinebene

Zu Beginn einer systematischen morphologischen Analyse des *Drosophila*-Larven-ZNS musste neben verschiedenen Färbemethoden auch die Auswertung dieser Färbungen mittels confokaler Fluoreszenz-Mikroskopie und 3D-Modellierung etabliert werden. Dabei sollte zunächst die immunhistochemische Detektion von ZNS-spezifischen Proteinen einen Vergleich von wildtypischen und P(9036)-homozygoten Gehirnen ermöglichen. Abbildung 3.2 zeigt die wildtypischen Expressionsdomänen solcher ZNS-spezifischer Proteine wie z.B. *elav* (einem Marker für postmitotische Neurone im zentralen und peripheren Nervensystem von *Drosophila*, siehe Abb. 3.2C, (Robinow, 1988) oder *repo* (einem Marker für Gliazellen, siehe Abb. 3.2F, (Xiong et al., 1994). Das Neuropilem, der vom zellulären Kortex umgebene Teil des ZNS, welcher alle Dendriten und Axone beinhaltet, ließ sich mit dem Antikörper 22C10 anfärben. Hierbei werden unbekannte axonale und Dendriten-spezifische Proteine detektiert (siehe Abb. 3.2C+E). Als weiterer Marker diente α -Bungarotoxin, welches zumindest bei Säugetieren an nicotinsche Acetylcholin-Rezeptoren (nAcChR) bindet (Gan et al., 1999). Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die nAcChR beinhalten, scheinen über den ganzen Neuropil-Bereich des larvalen *Drosophila*-ZNS verteilt zu sein, da α -Bungarotoxin den Kernbereich des gesamten Neuropilems mit unterschiedlicher Intensität anfärbt (siehe Abb. 3.2B). Weitere axonspezifische Färbungen konnten mit den Antikörpern BP102 und BP104 erzielt werden (nicht gezeigt). Vergleichende Färbungen von P(9036)-Homozygoten und Wildtypen mit den hier genannten Markern führten jedoch bisher nicht zu dem gewünschten Erfolg, morphologische Defekte im *klu*-mutanten Gehirn aufzuzeigen.

3.2.2. Morphologische Analyse auf RNA-Ebene

Eine im Vergleich zu den beschriebenen Protein-Antikörper-Färbungen spezifischere Methode, einzelne Neurone oder Neuronen-Populationen im *Drosophila*-ZNS anzufärben, ist die *InSitu*-Hybridisierung mit RNA-spezifischen Sonden. Markierung dieser Sonden mit Antigenen wie Fluorescein, Digoxigenin oder Biotin ermöglicht eine entsprechende Detektion mit z.B. fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Nach erfolgreicher Klonierung von cDNA-Fragmenten verschiedener bereits bekannter Neuropeptid-Gene (siehe Tabelle 3.1) konnten solche Antigen-markierten RNA-

Sonden hergestellt und für histochemische und Fluoreszenz-Färbungen an *Drosophila*-Larvengehirnen verwendet werden. In Abbildung 3.3 sind Expressionsmuster verschiedener Neuropeptide bzw. Neurohormone dargestellt, weitere Details über Expression bzw. Funktion finden sich auch in Tabelle 3.1. Im Vergleich zu den in Abbildung 3.2 dargestellten Protein-Antikörper-Färbungen ist die deutlich höhere Spezifität dieser Färbemethode erkennbar. Es lassen sich hier einzelne Neurone oder Gruppen von Neuronen markieren. Für alle untersuchten Neuropeptide konnte im P(9036)-homozygoten Larvengehirn das dem Wildtyp entsprechende Expressionsmuster aufgezeigt werden. Auch hier konnte also bisher kein morphologischer Defekt wie fehlende oder überzählige Neurone in den *klu*-Mutanten gefunden werden.

In einer Datenbank-Suche wurden neben den bekannten Neuropeptid-Genen auch Kandidaten für bisher unbekannte *Drosophila*-Neuropeptide aussortiert. Für diese auf Sequenzvergleichen basierte Suche wurden die Sequenzen verschiedener Neuropeptide, Neurohormone und Peptidhormone aus unterschiedlichsten Spezies (von Hydra bis Mensch) als Such-Vorlage benutzt (siehe Anhang für Sequenz-Vorlagen und Vergleiche). Für viele dieser potenziellen Neuropeptid-Gene konnten auch schon cDNA-Fragmente kloniert werden (siehe Anhang für *Primer*-Sequenzen), die Markierung entsprechender RNA-Sonden sowie vergleichende *InSitu*-Hybridisierungen an wildtypischen und *klu*-mutanten Gehirnen stehen noch aus.

3.2.3. Morphologische Analyse mittels Markergen-Expression

Eine dritte Methode zur spezifischen Anfärbung von Neuronen und Populationen von Neuronen ist die Expression von Markergenen unter Promotoren bzw. regulatorischen Elementen (*enhancern*), welche die endogene Expression bekannter oder unbekannter Gene in diesen Zellen von Interesse regulieren. Dafür macht man sich das modulare Gal4-UAS-System aus der Hefe *S. cerevisiae* zu Nutze, bei welchem der Transkriptionsfaktor Gal4 eine starke Aktivierung des UAS-Promotors hervorruft. Exprimiert man nun Gal4 unter dem zu untersuchenden Promotor, so lässt sich ein Markergen nach Wunsch unter der Kontrolle des UAS-Promotors in derselben Domäne exprimieren. Da inzwischen axongängige Markergene verfügbar sind, lassen sich so auch Konnektivitätsmuster entsprechender Zellpopulationen anfärben.

Das zufällige (und unkontrollierbare) Integrieren von P-Element-basierten Gal4-Expressionskonstrukten ins Genom von *Drosophila* macht man sich bei sog. *enhancer trap screens* zu Nutze. Ein entsprechender *read out* (Auslese-Kriterium) erlaubt das

Abbildung 3.2 Expressionsanalyse verschiedener ZNS-spezifischer Markerproteine am Larvengehirn von *Drosophila melanogaster*.

In allen Fällen wurden wandernde Wildtyp-Larven des 3. Instar gefärbt. Anterior zeigt nach links oben, die Umrisse von Zentralnervensystem (ZNS) und oesophagialen Foramen sind eingezeichnet. (A) zeigt die Expressionsdomäne von β -Galaktosidase in der P(9036)-Linie, welche *lacZ* unter dem *klu*-Promotor exprimiert. Gefärbt sind somit indirekt mitotische Neuroblasten im ZNS und Ventralnervensystem (VNS). Die extrem dicht gepackten Neuroblasten im lateralen Protocerebrum stellen die nach H. Hertweck (Hertweck, 1932) als äußerer Bildungsherd (äB) beschriebenen Vorläufer der optischen Zentren dar. (B) zeigt indirekt die Lokalisation von Ionenkanälen an, welche über nicotinsche Acetylcholin-Rezeptoren gesteuert werden. Diese scheinen ausschließlich in Großteilen des faserigen Neuropilems vorzukommen. Gefärbt wurde hier mit fluoreszenzmarkiertem α -Bungarotoxin, welches affin an nicotinsche Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) bindet. Eine Anhäufung von nAChR lässt sich in den dorsalen Protocerebrum detektieren (siehe Sterne, siehe auch E). (C) stellt einen Ausschnitt des Ventralnervensystems mit den fusionierten Thorax- und Abdominalsegmenten dar. Pro Segment verlässt ein paariges Axonbündel (gefärbt mit 22C10 in Grün, siehe auch E) das VNS nach lateral. Der Pfeil markiert Axonbündel, die das VNS median nach dorsal verlassen. Diese könnten die von H. Hertweck beschriebenen paarigen Dorsalnerven sein, welche zum sympathischen Nervensystem gehörend vielleicht den Mitteldarm innervieren (Hertweck, 1932). Zellkerne der ebenfalls segmentiert angeordneten postmitotischen Neurone sind mit α -elav (in Rot) angefärbt. In der Z-Achse wurde hier nur das dorsale Drittel des VNS ausgewertet, dadurch wird auch die Organisation des ZNS in zellulären Kortex und faseriges Neuropil deutlich. Die median nahe der Mittellinie gelegenen Zellsomata sind dorsal außerhalb des Neuropils gelegen. (D) zeigt die gleichmäßig über das ZNS verteilten Gliazellen, welche wie auch die Neuroblasten und postmitotischen Neurone im zellulären Kortex lokalisiert sind. Eine Anhäufung von Glia ist in den lateralen Gehirnhemisphären in den Anlagen der optischen Zentren zu beobachten (iGZ, möglicherweise von H. Hertweck als imaginale Gliazellen bezeichnet). (E) Hier wurde der gesamte Neuropil-Bereich mit dem axonspezifischen Antikörper 22C10 angefärbt. In den Protocerebrum sind mit dieser 22C10-Färbung ebenfalls verdichtete Strukturen detektierbar (siehe Sterne in E und B). Die Axonbündel, welche die Gehirnhemisphären nach lateral verlassen (siehe Pfeilspitze), stellen die Vorläufer der optischen Stiele der Adulten dar, über welche visuelle Information das laterale Protocerebrum erreicht. Die Pfeile markieren die Ansätze der *Nervi corporis cardiaci* (nach (Hertweck, 1932), über welche neurosekretorische Zellen im ZNS die Ringdrüse innervieren. (F) zeigt die Überlagerung der Neuropil-spezifischen 22C10-Färbung (in Grün, siehe E) mit der Glia-spezifischen α -repo-Färbung (in Rot, siehe D).

Aussortieren von Fliegenlinien, in welchen das Expressionskonstrukt unter den Einfluss eines Promotors bzw. *enhancers* geraten ist, welcher Expression in den gewünschten Domänen reguliert. Ein solcher *enhancer trap screen* wurde in Berlin bei G. Korge durchgeführt, als Auslese-Kriterium wurde hier eine axonale Verbindung von ZNS-Neuronen zur Ringdrüse angesetzt (Siegmond and Korge, 2001).

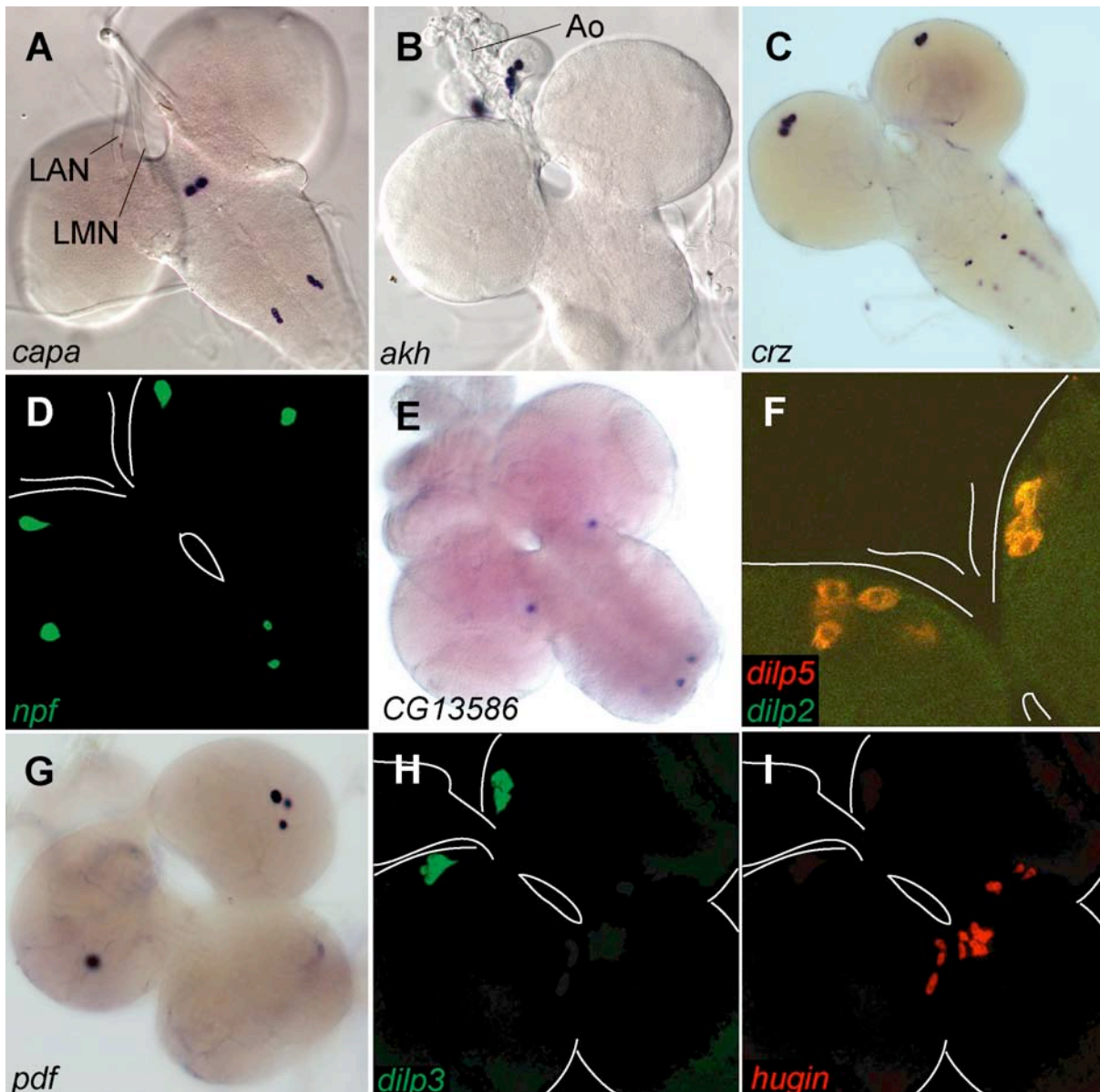


Abbildung 3.3 Expressionsanalyse verschiedener ZNS-spezifischer Neuropeptide mittels histochemischen und Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierungen am Larvengehirn von *Drosophila melanogaster*.

In allen Fällen wurden wandernde 3. Instar Wildtyp-Larven gefärbt. Anterior zeigt nach links oben, die Umrisse von Zentralnervensystem (ZNS), Ringdrüse und oesophagialem Foramen sind eingezeichnet. (A) zeigt die Expressionsdomäne von *capa* (*capability*), einem Neuropeptid, welches für zwei nitriderge Peptide codiert. Histochemisch gefärbt sind hier zwei prominente Zellen im subesophagealen Ganglion (SOG) sowie jeweils ein median gelegenes Neuronenpaar in den anterioren Abdominalsegmenten des VNS. Zu sehen sind auch die paarigen larvalen Maxillarnerven (LMN), welche vom Terminalorgan kommend Tritocerebrum und SOG innervieren. Die larvalen Antennalnerven (LAN) innervieren vom Dorsal- und Terminalorgan kommend die larvalen Antennenloben im medianen Deutocerebrum. (B) zeigt eine histochemische *InSitu*-Hybridisierung für *akh* (*adipokinetic hormone*), welches in neurosekretorischen Zellen in den paarigen *Corpora*

cardiaca in der Ringdrüse exprimiert wird. Die Ringdrüse als Fusion von *Corpora cardiaca*, Prothoraxdrüsen und *Corpora allata* stellt das wichtigste neuroendokrine Organ der Insektenlarven dar. Zu sehen sind auch Reste der Aorta (Ao), die nahe der Ringdrüse mündet. (C) Expressionsdomäne von *crz* (*corazonin*), einem Neuropeptid, das in anderen Insektenpezies (z.B. *Schistocerca gregaria*) die Pigmentierung der Kutikula reguliert. Die Funktion des *Drosophila*-Homologen, welches in jeweils drei lateralen neurosekretorischen Zellen pro Gehirnhemisphäre sowie paarig in allen Abdominalsegmenten des VNS exprimiert wird, ist unbekannt. (D) Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung für *npf* (*neuropeptide F*), einem Homologen des Neuropeptid Y (NPY) der Säugetiere. Prominente Expression von *npf* ist in paarigen Zellen im dorsalen und ventrolateralen Protocerebrum sowie in einem Zellpaar im ventralen SOG zu sehen. Für diese letztgenannte Expression von *npf* im SOG wurde eine Zuckerabhängigkeit gezeigt. *npf* wird auch in neuroendokrinen Zellen im Mitteldarm exprimiert (nicht gezeigt). (E) zeigt das Expressionsmuster von CG13586 mittels histochemischer *InSitu*-Hybridisierung. Jeweils eine prominente Zelle im Übergang von Tritocerebrum zum SOG sowie ein Neuronenpaar im abdominalen VNS sind zu sehen, weitere CG13586-positive Zellen finden sich im Mitteldarm (nicht gezeigt). CG13586 codiert für ein bisher nicht charakterisiertes Homologes eines „hyperglycemischen“ Hormones aus Crustaceen. (F) zeigt eine Doppel-Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung für *dilp2* und *dilp5* (*drosophila insulin like peptides*), welche in jeweils sieben medianen neurosekretorischen Zellen (mNSZ) pro Gehirnhemisphäre exprimiert werden. Überlagerung der Expressionsdomänen von *dilp2* (in Grün) und *dilp5* (in Rot) resultiert in Gelbfärbung dieser mNSZ. (G) Expressionsmuster von *pdf* (*pigment dispersing factor*), einem circadianen Zeitgeber-Neuropeptid von *Drosophila*. Die Expression von *pdf* in jeweils drei lateralen Neuronen pro Gehirnhemisphäre sowie in mehreren Zellpaaren im VNS (außerhalb des Fokus) fluktuiert im Verlauf eines Tages. (H) Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung für *dilp3* (*drosophila insulin like peptide3*), das in sieben medianen neurosekretorischen Zellen pro Gehirnhemisphäre exprimiert wird (siehe auch F). (I) zeigt eine Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung für das Neuropeptid-Gen *hug* (*hugin*), welches für mindestens zwei aktive Neuropeptide codiert (siehe auch 3.10). Expression von *hugin* findet sich in ca. 20 Zellen im SOG.

Abbildung 3.4 zeigt die Expressionsmuster einiger dieser *Berlin*-Linien; hier wurde als Marker τ -GFP (*tau-green fluorescent protein*) exprimiert. Dieses Fusionsprotein aus dem Fluorochrom GFP und dem Mikrotubuli-assoziierten Tau ermöglicht das Anfärben von Zellsoma sowie von Axonen und Dendriten (Hidalgo et al., 1995). Durch Kombination dieser Färbemethode mit *InSitu*-Hybridisierungen für bekannte Neuropeptide konnte z.B. gezeigt werden, dass die *corazonin*-positiven Neuronen im lateralen Protocerebrum zur Ringdrüse projizieren (siehe Doppelfärbung für *crz* und *Mai369* in Abb. 3.4C+D). Auch für einen Teil der von *Okt30* markierten Zellen konnte ein endogen exprimiertes Neuropeptid gefunden werden. Ein Teil der im suboesophagialen Ganglion (SOG) gelegenen *hugin*-positiven Neurone projiziert ebenfalls zur Ringdrüse (siehe Abb. 3.4E).

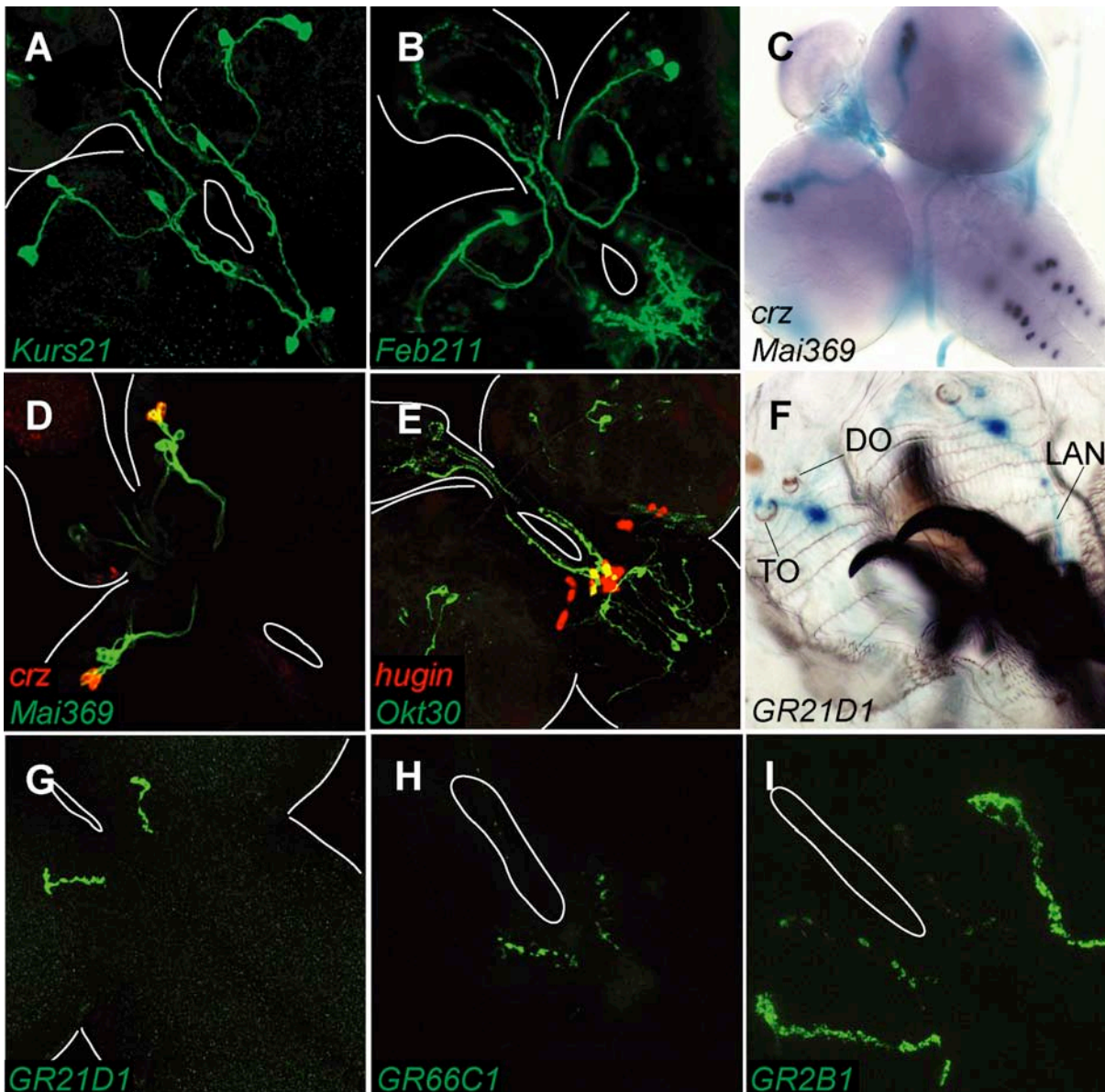


Abbildung 3.4 Neuroanatomische Analyse verschiedener Zellpopulationen und deren Konnektivität mittels zell-spezifischer Expression von Markergenen im *Drosophila*-Larvengehirn.

In allen Fällen wurden wandernde 3. Instar Larven des jeweiligen Genotyps gefärbt. Anterior zeigt nach links oben, die Umrisse von Zentralnervensystem (ZNS), Ringdrüse und oesophagialen Foramen sind eingezeichnet. (A) Das *enhancer trap*-Konstrukt *Kurs21* markiert drei Neurone pro Gehirnhemisphäre sowie ein Paar SOG-Neurone. Die im lateralen Protocerebrum gelegenen Zellen innervieren über charakteristische Axonbahnen die *Corpora allata* der Ringdrüse. (B) zeigt das Projektionsmuster der von *Feb211* markierten Neurone, welche vom lateralen Protocerebrum aus die Prothoraxdrüsen der Ringdrüse innervieren. Dabei verlaufen die Axone vor dem Eintritt in die Ringdrüse in charakteristischen Schleifen in der contralateralen Gehirnhemisphäre. (C) stellt eine histochemische Doppelfärbung für das *enhancer trap*-Konstrukt *Mai369* (X-Gal-Färbung in Türkisblau) sowie für das Neuropeptid *corazonin* (*crz-InSitu*-Hybridisierung in Dunkelviolett) dar. *Mai369* markiert

je sieben neurosekretorische Zellen im lateralen Protocerebrum, deren Axone eine ähnliche Morphologie wie die der von *Kurs21* markierten Neuronen aufweisen. *Mai369*-Neurone innervieren jedoch die *Corpora cardiaca* der Ringdrüse. Jeweils drei Neurone dieser Zellgruppen koexprimieren *corazonin*, welches somit über die Ringdrüse als neurohemales Organ in die Hämolymphe gelangen kann. (D) Fluoreszenz-Doppelfärbung für *Mai369* (in Grün) sowie *crz* (in Rot). Die drei jeweils am weitesten lateral gelegenen *Mai369*-positiven neurosekretorischen Zellen sind auch *crz*-positiv (Gelbfärbung durch Überlagerung von *crz* in Rot und *Mai369* in Grün). (E) zeigt eine Fluoreszenz-Doppelfärbung für das *enhancer trap*-Konstrukt *Okt30* (in Grün) sowie für das Neuropeptid *hugin* (in Rot). Neben vielen anderen Zellen im ZNS markiert *Okt30* auch vier neurosekretorische Zellen im SOG nahe der ventralen Mittellinie. Deren Axone verlaufen erst nach dorsal, um dann nach anterior am Foramen vorbei die *Corpora cardiaca* zu innervieren. Colokalisation dieser *Okt30*-Färbung (in Grün) mit einer Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung spezifisch für *hugin* (in Rot) zeigt eine Innervierung der Ringdrüse durch *hugin*-positive SOG-Neurone auf. (F) zeigt den cephalopharyngealen Komplex einer *Drosophila*-Larve mit Mundhaken sowie Dorsalorgan (DO, dem Haupt-Geruchssinnesorgan der Larve) und Terminalorgan (TO, dem Haupt-Geschmackssinnes- und Geruchssinnesorgan der Larve). Das Promotor-Konstrukt *GR21D1* markiert gustatorische bzw. olfaktorische Sinnesneurone im Terminalorgan, welche Axone über den larvalen Antennennerv (LAN) zum ZNS senden (X-Gal-Färbung in Türkisblau). (G)-(I) Projektionsmuster verschiedener GR-/OR-positiver Sinnesneurone. (G) *GR21D1*-positive Neurone im Terminalorgan innervieren über den LAN die larvalen Antennenloben im Deutocerebrum. Sinnesneurone im TO, welche von *GR66C1* markiert werden, projizieren über den larvalen Maxillarnerv zum Tritocerebrum/SOG (H). *GR2B1* markiert Sinnesneurone im TO und DO, welche über den LAN das Deutocerebrum sowie die Antennenloben innervieren (I). Für die *enhancer trap*-Fliegen in A-E siehe (Siegmund and Korge, 2001), für die Promotor-Linien in F-I siehe (Scott et al., 2001).

Solche Doppelfärbungen (und die dadurch ermöglichte Kombination von Gen-spezifischen *InSitu*-Hybridisierungen mit „Axon-spezifischen“ *enhancer trap*-Färbungen) lassen sich verlässlich und mit entsprechender Ortsauflösung nur mit confokaler Fluoreszenz-Mikroskopie realisieren (vergleiche Abb. 3.4C+D)

Eine Abwandlung der *enhancer trap*-Methode stellt das Klonieren 5'-regulatorischer Elemente (Promotoren) und das Erzeugen transgener Fliegen mit entsprechenden Gal4-Expressionskonstrukten dar. Im Gegensatz zur *enhancer trap*-Methode, bei der die Expressionskonstrukte zufällig unter den Einfluss von Promotoren oder *enhancern* geraten, nutzt man hier gezielt die Orts- und Zeitspezifität der Aktivierung entsprechender Promotoren. Im Labor von R. Axel wurden transgene Fliegenlinien generiert, welche den Transkriptionsfaktor *Gal4* unter den Promotoren potenzieller gustatorischer bzw. olfaktorischer Rezeptoren exprimieren (Scott et al., 2001). In diesen Fliegenlinien lassen sich Geschmacks- und Geruchsrezeptor-Neurone im peripheren Nervensystem (PNS) sowie deren Axone und Dendriten anfärben. Unter

Tabelle 3.1 Klonierte Neuropeptid-Gene von *Drosophila melanogaster*

Probe	Name / Funktion	Lokalisation	Referenz
pdf	pigment dispersing factor / Regulation des circadianen Rhythmus	drei ventrolaterale Neurone pro Gehirnhemisphäre sowie VNS-Neurone	Park et.al., 1998
crz	corazonin / Neuropeptid, möglicherweise funktionelles akh-Homologes	drei laterale neurosekretorische Zellen pro Gehirnhemisphäre sowie je ein Zellpaar in abdominalen VNS-Segmenten, außerdem neuroendokrine Darmzellen	Veenstra, 1994
CG13586	CG13586 / möglicherweise hyperglycemisches Neurohormon	je ein Neuron im Übergang von Deutero- zu Tritocerebrum sowie VNS-Neurone	-----
dilp2 dilp3 dilp5	drosophila insulin like peptides / Insulin-Homologe, nahrungsabhängige Expression	sieben mediane neurosekretorische Zellen pro Gehirnhemisphäre	Brogiolo et.al., 2001
akh	adipokinetic hormone / möglicherweise funktionelles Glukagon-Homologes	Corpora cardiaca-Zellen der Ringdrüse	Noyes et.al., 1995
npf	neuropeptide F / soziales Fressverhalten, nahrungsabhängige Expression	je ein Neuron pro dorsalem und ventrolateralem Protocerebrum sowie zwei SOG-Neurone, außerdem neuroendokrine Darmzellen	Brown et.al., 1999
hug	hugin / möglicherweise Pyrokinin- und ETH-Homologe	ca. zwanzig Neurone im ventralen SOG	Meng et.al., 2002
capa	capability / NO-Produktion, Diapause etc.	zwei Neurone im posterioren SOG sowie je ein Zellpaar pro anteriorem Abdominalsegment	Kean et.al., 2002

Verwendung des Markers nSyb-GFP, einer Fusion des Fluorochroms GFP mit einer neuronalen Form des Vesikel-assoziierten Synaptobrevins, lassen sich in diesen Zellen Vesikel fluoreszenzmarkieren. Da diese zu den synaptischen Endigungen der entsprechenden Neuronen transportiert werden, lassen sich so Axone aus dem peripheren Nervensystem bis ins ZNS verfolgen (Ito et al., 1998). Abbildung 3.4 zeigt die Endigungen verschiedener Geschmacks- bzw. Geruchsneurone im larvalen ZNS. Alle in Abbildung 3.4 gezeigten Färbungen stellen die *klu*-wildtypische Situation dar.

Um die in Abb. 3.4 dargestellten Färbungen in *klu*-mutanten Gehirnen zu ermöglichen, müssen die jeweiligen Expressionskonstrukte in den genetischen Hintergrund der P(9036)-Linie eingekreuzt werden. Für das *enhancer trap*-Konstrukt *Okt30* sowie für das Expressionskonstrukt *GR21D1* wurde dies realisiert, für *Okt30* ist ein entsprechendes Kreuzungsschema in Abbildung 3.5 dargestellt. Ausgehend von den Einzellinien *Okt30*;+;+ (dem Expressionskonstrukt), +;τ-GFP;+ (dem Markergen) und +;+;9036/TM3 (der *klu*-Mutante) mussten jeweils die Wildtyp (+)-Chromosomen durch entsprechende *balancer*- bzw. markierte Chromosomen ersetzt

werden. Anschließend konnten Expressionskonstrukt, Markergen und P-Element-Mutation zusammengekreuzt werden. Ebenfalls in Abbildung 3.5 dargestellt ist eine Fluoreszenzfärbung für einen Embryo aus der dreifach transgenen Linie *Okt30;τ-GFP;9036/TM3* mit entsprechenden Färbungen für das Expressionskonstrukt *Okt30* sowie für postmitotische Neurone. Eine Färbung zur Unterscheidung von wildtypischen und P(9036)-homozygoten Embryonen (und somit zur Ermöglichung von vergleichenden Färbungen) muss noch ausgearbeitet werden. Für das Expressionskonstrukt *GR21D1* konnte ebenfalls eine transgene Linie (Genotyp *GR21D1;τ-GFP;9036/TM3*) etabliert werden. Im Gegensatz zu dem Markergen *nSyb-GFP* (siehe oben) erwies sich jedoch die Expression von *τ-GFP* als nicht geeignet, Axonen von Geruchs-/Geschmacksinnesneuronen bis ins ZNS zu folgen. Somit muß in diesen Fliegen das Markergen-Konstrukt *τ-GFP* gegen *nSyb-GFP* ausgetauscht werden, um entsprechende Färbungen im P(9036)-mutanten Hintergrund zu ermöglichen.

Für einige Neuropeptide, welche auch zur Markierung definierter Zellpopulationen mittels *InSitu*-Hybridisierung herangezogen worden waren, wurde versucht, 5'-regulatorische Elemente zu klonieren und transgene *driver*-Linien zu generieren. Eine zusätzliche Motivation (neben der vergleichenden Analyse der *klu*-Mutanten) stellte die Tatsache dar, dass nur für wenige der in Tabelle 3.1 aufgelisteten Neuropeptide ein Projektionsmuster entsprechender Neuronen bzw. innervierte Zielorgane bekannt waren. Tabelle 3.2 zeigt auf, mit welchen Promotor-Regionen eine Klonierung in TOPO®-Vektor bzw. in pCaSpeR-Vektor (dem Gal4-Expressionskonstrukt) erreicht wurde, und für welche Konstrukte transgene Fliegen generiert werden konnten. Da sich die genaue Position von Promotoren bzw. *enhancern* nicht vorhersagen lässt, zeigt sich erst in der transgenen Fliege, ob ein entsprechendes Promotor-Konstrukt aktiv ist. *InsP2*, *InsP5* und *akh36* stellen transgene Linien für „tote“ nicht aktive Konstrukte dar.

Im Gegensatz dazu exprimieren *InsP3* und die *hugS*-Linien (*hugS1-hugS7*) entsprechende Markergene in exakt den Domänen, in denen auch die endogenen Neuropeptide exprimiert werden (siehe Abb. 3.6, Colokalisation der *dilp3*-mRNA mit dem Markergen in der Linie *InsP3* bzw. der *hugin*-mRNA mit dem Markergen in der *hugS3*-Linie). Auch die Promotor-Konstrukte *InsP3* bzw. *hugS3*, mit denen sich nun Somata, Axone und Dendriten der *dilp3* bzw. *hugin*-positiven Neurone anfärben lassen, mussten in den Hintergrund der P(9036)-Mutation eingekreuzt werden, um vergleichende Färbungen zu ermöglichen. Für das Expressionskonstrukt *InsP3* wurde das bereits realisiert.

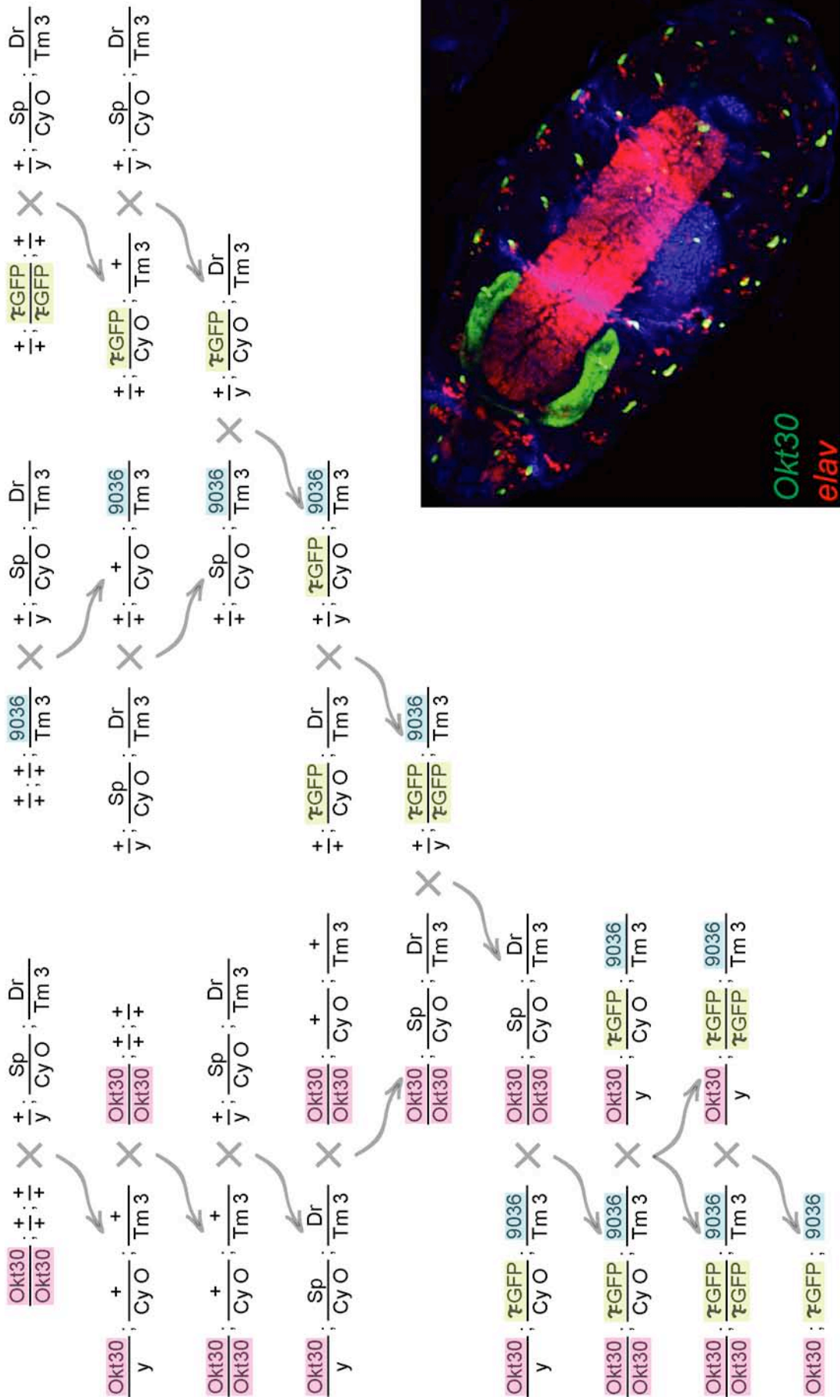


Abbildung 3.5 Kreuzungsschema zur Generierung einer dreifach transgenen Fliege, welche im *klu*-mutanten Hintergrund ein Markergen unter dem *enhancer trap*-Konstrukt *Okt30* exprimiert.

Ausgehend von den drei Einzellinien *Okt30* (dem Expressionskonstrukt), 9036/TM3 (der *klu*-Mutante) sowie τ -GFP (*tau-green fluorescent protein*, dem Markergen-Konstrukt) wurden zunächst alle Wildtyp-Chromosomen genetisch balanciert (mit *Cyo* und TM3 als *balancer*-Chromosomen) bzw. markiert (mit *Sp* und *Dr* als Marker-Chromosomen). Nach anschließender Kombination aller Transgen-Konstrukte kann in Nachkommen der stabil etablierten F7-Generation die Expression von τ -GFP in den *Okt30*-positiven Neuronen in *klu*-Mutanten analysiert werden. (3.4') zeigt einen Embryo der Linie *Okt30*; τ -GFP;9036/TM3 in Dorsalansicht, anterior zeigt nach links oben. Mittels Fluoreszenz-Färbung wurden postmitotische Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem markiert (α -elav-Färbung in Rot). Die *Okt30*-positiven Zellen markieren vor allem Neurone im peripheren Nervensystem und im antennomaxillaren Komplex (α -GFP-Färbung in Grün), zusätzlich tritt unspezifische Markergen-Expression in den Speicheldrüsen auf. Blaufärbung (α - β Gal-Färbung gegen P(9036) zur Detektion von homozygoten *klu*-Mutanten, siehe auch Abb. 3.1) tritt hier nur unspezifisch im sich entwickelnden gastrointestinalen Trakt auf.

Tabelle 3.2 Klonierte Promotor-Regionen von *Drosophila*-Neuropeptiden

Name	PCR	Klonierung TOPO	Klonierung pCaSpeR	Transgene	Expression
InsP2	+	+	+	+	–
InsP3	+	+	+	+	+
InsP5	+	+	+	+	–
CG13586	+	+	–		
npf	+	+	–		
hugS	+	+	+	+	+
akh	+	+	+	+	–
EH	+	+	–		
DMS	+	+	–		
DH	+	+	–		
Capa	+	+	–		

Da in der einzigen verfügbaren *InsP3*-Linie die Insertion des Transgens auf dem dritten Chromosom lokalisiert ist, mussten in diesem Fall P(9036) und das Expressionskonstrukt genetisch rekombiniert werden (siehe Abb. 3.7). Nach Auskreuzen des *balancer*-Chromosoms TM3 (welches Rekombination verhindert), kann in den Keimbahnzellen der Weibchen, die P(9036) und *InsP3* auf den dritten Chromosomen tragen, bei der Oogenese Rekombination beider Konstrukte auf einem Chromosom stattfinden.

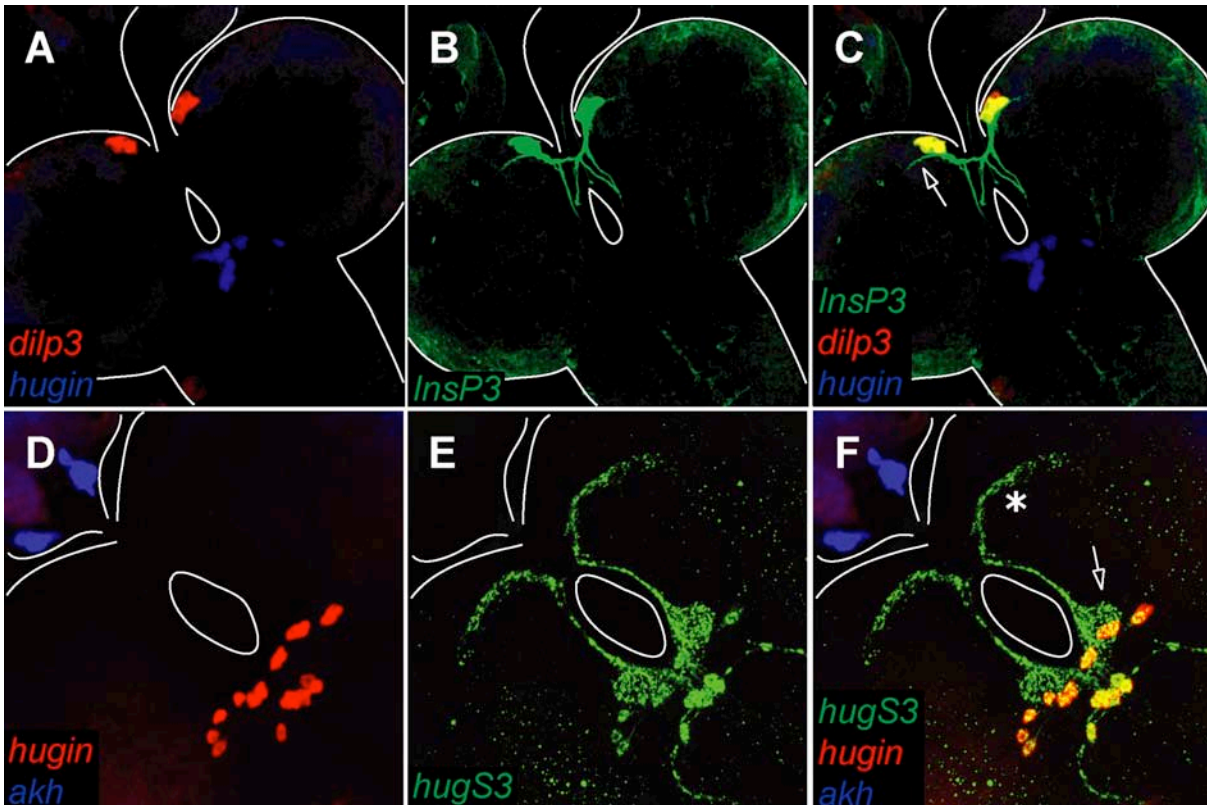


Abbildung 3.6 Neuroanatomischer Vergleich der Expressionsdomänen von künstlichen und endogenen *dilp3*- bzw. *hugin*-Promotoren mittels Fluoreszenzfärbung.

In beiden Fällen (*InsP3*, A-C und *hugS3*, D-F) wurden wandernde 3. Instar-Larven der jeweiligen *driver*-Linie gefärbt. Anterior zeigt nach links oben, die Umrisse von Zentralnervensystem (ZNS), Ringdrüse und oesophagialen Foramen sind eingezeichnet. (A) zeigt die Expressionsdomänen von *dilp3* (Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung in Rot) sowie *hugin* (Blaufärbung, als Kontrolle) im Vergleich zur Markergen-Expression unter dem künstlichen *InsP3*-Promotorkonstrukt (α - β Gal-Färbung in Grün, B). Überlagerung aller Kanäle (C) zeigt Expression des Markergens exklusiv in den sieben medianen neurosekretorischen Zellen (mNSZ) pro Gehirnhemisphäre, welche auch *dilp3* exprimieren. Axone dieser mNSZ projizieren ipsilateral zum oesophagialen Foramen sowie contralateral zur Ringdrüse. Mögliche Dendriten dieser Neurone verlaufen nach lateral an der Grenze zwischen Kortex und Neuropil (siehe Pfeil in C). (D) zeigt die Expressionsdomänen der Neuropeptide *hugin* (Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung in Rot) sowie *akh* (Blaufärbung, als Kontrolle). Im Vergleich dazu die Expression von nSyb-GFP (neuronales Synaptobrevin-GFP) als Marker unter dem künstlichen *hugin*-Promotorkonstrukt *hugS3* (α -GFP-Färbung in Grün, E). nSyb-GFP wird ausschließlich in *hugin*-positiven Neuronen im SOG exprimiert (siehe Gelbfärbung in F). Diese projizieren u.a. nach anterior zu den Pilzkörpern im Protocerebrum (siehe Stern in F) und innervieren glomeruläre Strukturen im SOG nahe des oesophagialen Foramens (siehe Pfeil in F).

Die in der folgenden Generation etablierten und wieder balancierten Einzellinien wurden auf Rekombination von *InsP3* und P(9036) getestet. In diesen Test gingen nur Linien ein, welche eine durch P(9036) ausgelöste Lethalität unter homozygoten (TM3-negativen) Bedingungen aufwiesen. In diesen P(9036)-positiven Linien wurde mittels PCR-Technik auf zusätzliches Vorhandensein des *InsP3*-Konstruktes getestet (siehe Abb. 3.7). Für die drei resultierenden doppel-positiven Linien *9036R11*, *9036R12* und *9036R13* wurde versucht, τ -GFP als Markergen einzukreuzen. Hierbei erwies sich *9036R12* als lethal in Kombination mit dem Markergen-Konstrukt. Für *9036R11* und *9036R13* konnten Linien etabliert werden, die homozygot für τ -GFP sind sowie P(9036) und *InsP3* rekombiniert über dem TM3-*balancer*-Chromosom tragen. Mit diesen Linien kann nun die Neuroanatomie der *dilp3*-positiven Neuronen sowie die Regulation des artifiziellen *dilp3*-Promotors im *klu*-mutanten Hintergrund untersucht werden.

3.3. Microarray-Analyse von klumpfuss-Mutanten

Eine Analyse der Regulation bestimmter Promotoren unter verschiedenen Bedingungen (z.B. Futter- oder Hungerbedingungen) sowie der entsprechende Vergleich zwischen P(9036)-Homozygoten und dem Wildtyp stellt eine weitere Möglichkeit der Analyse der *klumpfuss*-Mutanten dar. Mit Hilfe von Promotor-Fliegen und Expression geeigneter Markergene bzw. mit semiquantitativen *InSitu*-Hybridisierungen für entsprechende Gene lassen sich jedoch immer nur einzelne Gene pro (Futter)-Bedingung oder Genotyp vergleichen. Genomweite Expressionsprofile pro Bedingung oder Genotyp lassen sich hingegen mit DNA-Microarrays anfertigen.

Für den Vergleich von P(9036)-Homozygoten mit einer Wildtyp-Kontrolle (als Vergleich von *klu*-Nullmutante gegen Kontrolle) bzw. *klu*-Überexpression gegen eine entsprechende Kontrolle (siehe auch 2. Material und Methoden) wurden kommerziell erhältliche DNA-Microarrays von Affymetrix® genutzt. Dabei wurden für die Experimente „P(9036) gegen Wildtyp“ sechs Microarrays (drei P(9036) sowie drei Wildtyp) und für „UAS-*klu* gegen Kontrolle“ vier Microarrays (zwei UAS-*klu* sowie zwei Kontrolle) hybridisiert. Nach statistischer Auswertung mittels Affymetrix® *Microarray Suite 5.0* wurden neun Datensätze für „P(9036) gegen Wildtyp“ sowie vier Datensätze für „UAS-*klu* gegen Kontrolle“ generiert.

kann in den Ovarien von Weibchen der F1-Generation Rekombination von *InsP3* und P(9036) auf einem Chromosom stattfinden. Balancierte Einzellinien der F2-Generation wurden genetisch auf P(9036) sowie mittels PCR auf Vorhandensein des *InsP3*-Konstruktes getestet. Rekombinante Linien wurden nach Balancieren und Markieren aller Wildtyp-Chromosomen mit einem Markergen-Konstrukt (τ -GFP) zusammengekreuzt. Nachkommen der stabil etablierten F7-Generation exprimieren das Markergen unter dem *InsP3*-Promotor im *klu*-mutanten Hintergrund. (3.6') zeigt das Ergebnis der *InsP3*-Test-PCR. Fliegenlinien, welche homozygote Lethalität (keine Adulten ohne TM3-*balancer*) aufgrund der P(9036)-Mutation aufwiesen, wurden mittels PCR auf zusätzliches Vorhandensein des *InsP3*-Konstruktes getestet. Als Kontrollen wurden isolierte *InsP3*-Vektor-DNA (InsP3-V) sowie genomische DNA aus *InsP3*-Fliegen (InsP3) verwendet. Drei der getesteten Linien (R11, R12 und R13) zeigen auf dem dritten Chromosom Rekombination von P(9036) mit *InsP3* (890 pb-Signal bei PCR mit *InsP3*-spezifischen *Primern*). Keine der für P(6913) (den *pumpless*-Mutanten, (Zinke et al., 1999)) angesetzten Rekombinationskreuzungen führte zum Erfolg.

Diese beinhalten pro Gen u.a. Größen wie *signal* (ein relatives Maß für das Vorhandensein der entsprechenden mRNA) oder *change p-value*. Aus diesem *change p-value*, welcher ein Maß für die Wahrscheinlichkeit und die Richtung einer Regulation darstellt, leiten sich die Bewertungen „I“ (*Increase*, Hochregulierung), „MI“ (*Marginal Increase*, marginale Hochregulierung), „NC“ (*No Change*, keine Regulierung), „MD“ (*Marginal Decrease*, marginale Herunterregulierung) und „D“ (*Decrease*, Herunterregulierung) ab. Hierbei werden wählbare *cut offs* mit einbezogen, über welche sich die Grenzen zwischen den Bewertungskategorien definieren lassen.

Ein vorrangiges Ziel der Microarray-Experimente war nun zunächst die Suche nach direkten Zielgenen des Transkriptionsfaktors klumpfuss. Hier wurde als Hypothese zugrunde gelegt, dass die Expression solcher primären Zielgene von *klu* entweder positiv oder negativ beeinflusst wird. In der *klu*-mutanten Situation sollte diese Regulation folglich ausbleiben (oder zumindest stark reduziert sein), wohingegen man in der *klu*-Überexpressionssituation eine stark überhöhte Regulation erwarten sollte. Die Microarray-Experimente „P(9036) gegen Wildtyp“ und „UAS-*klu* gegen Kontrolle“ wurden deshalb dahingehend ausgewertet, dass nur solche Gene aussortiert wurden, die in beiden Experimenten entgegengesetzt reguliert sind. Setzt man zusätzlich als Limit eine mindestens 2-fache Regulation in beiden Situationen voraus, so lassen sich von den ca. 14000 *Drosophila*-Genen die in Abbildung 3.8 aufgeführten potenziellen Zielgene des Transkriptionsfaktors klumpfuss extrahieren. In die dargestellte Liste gingen nur Kandidaten ein, welche in allen 13 Datensätzen

Name	P(9036)	UAS-klu	(potenzielle) Funktion	H 4h	Z 4h	H 12h	Z 12h
CG4362	49.42	-6.51	Signaltransduktion	2.0	nc	nc	-6.3
CG13135	9.32	-17.09	unbekannt	nc	-54.7	nc	-83.6
CG14852	2.38	-19.97	unbekannt	nc	nc	nc	-5.0
CG13461	4.35	-4.61	unbekannt	nc	nc	11.8	nc
CG13482	7.77	-2.34	unbekannt	3.0	nc	3.7	3.0
CG13335	2.98	-5.09	unbekannt	2.0	nc	nc	nc
CG14957	3.48	-4.03	unbekannt	nc	nc	nc	-2.0
CG13075	2.54	-3.77	unbekannt	nc	2.0	nc	nc
CG16775	2.23	-3.16	unbekannt	-10.0	-11.7	-21.3	-20.4
CG12838	2.06	-3.00	unbekannt	nc	nc	3.1	2.5
CG8232	2.61	-2.25	Ribonuklease	2.5	3.3	2.9	nc
CG15043	2.67	-2.16	unbekannt	nc	nc	-5.7	-2.5
CG7220	2.31	-2.03	Enzym	nc	nc	2.0	3.3
CG3292	-19.77	69.56	Alkalische Phosphatase	nc	-2.0	-19.3	-15.2
CG9259	-52.54	3.59	unbekannt	-10.5	-7.0	-4.1	-7.7
CG9246	-2.99	10.47	unbekannt	-3.0	nc	nc	nc
CT24983	-3.06	6.05	Enzym	nc	nc	nc	nc
CG7845	-3.38	4.35	Transkriptionsfaktor	nc	nc	-2.1	-3.0
CG8083	-2.75	3.71	Nukleosid-Transporter	nc	-17.3	nc	-4.5
CG8939	-3.75	2.66	unbekannt	-5.0	-2.3	nc	nc
CG6724	-3.95	2.52	Enzym	nc	-6.3	-2.6	nc
CG7006	-4.09	2.24	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG2875	-3.00	2.99	RNA-Polymerase	nc	nc	-4.8	nc
CG3819	-4.24	2.08	unbekannt	nc	nc	nc	nc
La	-3.90	2.17	Autoantigen-ähnlich	-3.8	-3.7	nc	-4.3
CG5258	-3.69	2.18	unbekannt	-6.0	-4.7	-2.1	-3.3
CG2199	-2.17	2.99	Nukleinsäure-bindend	nc	nc	nc	nc
CG1381	-2.97	2.04	Ribosomales Strukturprotein	-6.0	-7.0	-2.4	-3.0
CT16163	-2.82	2.14	Enzym	-3.0	-2.0	nc	nc
CG5290	-2.61	2.30	unbekannt	-2.0	-2.7	nc	nc
CG3699	-2.60	2.31	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG3983	-2.58	2.17	unbekannt	-4.0	-3.5	nc	nc
Hsp67Bb	-2.25	2.42	Hitzeschock-Protein	nc	nc	nc	nc
CG7637	-2.39	2.02	unbekannt	-7.5	-6.0	-4.8	-4.3
CG6994	-2.10	2.22	Zelladhäsion	-3.0	nc	nc	nc
CG12092	-2.02	2.19	Transmembran-Rezeptor	-6.5	-3.3	nc	nc
CG5770	2.06	2.49	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG14253	2.50	2.17	unbekannt	nc	nc	2.2	nc
CT37476	2.42	2.28	unbekannt	nc	nc	nc	nc
Cat	2.72	2.47	Katalase	nc	-2.3	nc	-3.5
timp	3.70	2.22	Metalloprotease-Inhibitor	nc	nc	2.2	nc
CG18331	4.05	2.06	unbekannt	2.3	2.0	21.5	11.4
CG13095	3.40	2.76	Endopeptidase	nc	nc	nc	-2.3
Amy-d	4.98	2.10	alpha-Amylase	5.0	nc	2.3	-11.0
CG16844	4.55	2.58	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG17738	5.59	2.70	unbekannt	3.0	4.3	13.5	22.2
CG9040	2.37	6.70	unbekannt	nc	-3.3	nc	-3.0
CG10659	2.18	12.32	Enzym	nc	-3.0	-2.2	-2.5
CG6996	9.32	3.68	Transporter	nc	nc	5.5	3.5
Cyp4ac3	22.59	2.34	Cytochrom P450	3.0	nc	5.8	2.5
CG18108	9.16	18.17	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG5002	-2.31	-2.20	Transporter	-3.0	nc	-7.3	nc
CG13560	-3.03	-6.62	unbekannt	nc	nc	nc	nc

Abbildung 3.8 Potenzielle Zielgene des Transkriptionsfaktors klu.

Ausgewertet wurden hier die Affymetrix® Microarray-Experimente „P(9036) gegen Wildtyp“ und „UAS-klu gegen Kontrolle“. Hochregulierte Gene sind grün hinterlegt, herunterregulierte Gene rot. Zahlenwerte stehen für x-fache Regulation, P(9036) steht für das Experiment „P(9036) gegen Wildtyp“ und UAS-klu für das Experiment „UAS-klu gegen Kontrolle“. Aus den von Affymetrix® bereitgestellten Datensätzen gingen alle Gene in die dargestellte Liste ein, welche in allen Einzel-Auswertungen eine „I“- oder „D“-Bewertung (für eine statistisch signifikante Regulierung in die eine oder andere Richtung) erhalten hatten. Dabei wurden die von *Affymetrix® Microarray Suite5.0* vorgegebenen Standard-Parameter für *cut offs* etc. beibehalten. Als zusätzliches Kriterium für Zielgen-Kandidaten von klu wurde eine mindestens 2-fache Regulation in beiden Experimenten sowie eine Regulation in entgegen gesetzte Richtung (bei Vergleich von „P(9036) gegen Wildtyp“ mit „UAS-klu gegen Kontrolle“) angesetzt. Die ebenfalls aufgelisteten Gene, die in beiden Experimenten in die gleiche Richtung reguliert sind, stellen eher Kandidaten zur Analyse von Sekundär-Effekten dar. Zusätzlich zur Aussortierung dieser potenziellen klu-Zielgene wurde deren Regulation unter verschiedenen Hungerbedingungen geprüft. Dazu wurde auf die Microarray-Daten von Zinke et al. (Zinke et al., 2002) zurückgegriffen, wobei dort Expressionsprofile unter 4 bzw. 12 Stunden Hungerbedingungen (auf PBS, siehe H 4h und H 12h) bzw. Zuckerbedingungen (auf PBS +20% Sucrose, siehe Z 4h und Z 12h) angefertigt wurden. Für alle potenziellen klu-Zielgene wurden die entsprechenden Werte mit in die dargestellte Liste aufgenommen, Zahlenwerte stehen wiederum für x-fache Regulation. Hochregulierte Gene sind grün hinterlegt, herunterregulierte Gene rot. Potenzielle klu-Zielgene, welche unter allen Hungerbedingungen unreguliert sind, sind gelb hinterlegt.

(9 x „P(9036) gegen Wildtyp“ sowie 4 x „UAS-klu gegen Kontrolle“) eine *Increase*- bzw. *Decrease*-Bewertung erhalten hatten und eine Regulation somit als statistisch signifikant galt. Des weiteren wurde in beiden Experimenten eine mindestens 2-fache Regulation in die eine oder andere Richtung als Auswahl-Kriterium angesetzt. Die ebenfalls aufgeführten Kandidaten, welche in beiden Experimenten in dieselbe Richtung reguliert sind, adressieren eher Sekundäreffekte (und stellen keine primären Zielgene dar).

Im nächsten Schritt sollten die in Abbildung 3.8 aufgelisteten potenziellen klu-Zielgene mit Expressionsprofilen von Wildtyp-Larven unter verschiedenen Hungerbedingungen verglichen werden. Dabei wurde auf eine Serie von Microarray-Experimenten zurückgegriffen, in welchen Wildtyp-Larven für 4 bzw. 12 Stunden auf PBS bzw. PBS plus 20% Zucker gehungert und gegen normal gefütterte Wildtyp-Larven verglichen worden waren (Zinke et al., 2002). Aus diesen Expressionsprofilen wurden die in Abbildung 3.8 mitaufgeführten Werte für die potenziellen klu-Zielgene aussortiert, dabei gingen nur Werte ≥ 2 in die dargestellte Liste ein (Werte ≤ 2 wurden zurückgesetzt auf *nc*, *no change*). Wie an der Farbkodierung (Rot für Herunterregulierung, Grün für Hochregulierung) zu erkennen ist, entspricht die Richtung der Regulation vieler Gene in P(9036) der Richtung der Regulation in den

Hungerexperimenten. Des weiteren ist auffällig, dass nur sehr wenige der *klu*-Zielgen-Kandidaten in den Hungerexperimenten als unverändert gelistet sind. Einige der aufgeführten Gene lassen sich in die von Zinke et al. (Zinke et al., 2002) vorgeschlagenen Kategorien einordnen als nur unter Hungerbedingungen (und nicht unter Zuckerbedingungen, Kategorie I) oder als nur unter Zuckerbedingungen (und nicht unter Hungerbedingungen, Kategorie II) oder als unter Hunger- und Zuckerbedingungen reguliert (Kategorie III). Mit allen aufgeführten potenziellen Zielgen-Kandidaten können nun weitergehende Experimente wie Expressionsanalysen oder Promotor-Analysen zur Suche nach konservierten *klu*-Bindemotiven oder auch vergleichende Färbungen etc. durchgeführt werden. Weitere aufschlussreiche Hinweise über die veränderte Physiologie der P(9036)-Mutanten ergeben sich durch Vergleiche der beschriebenen Expressionsprofile mit denen von anderen Fressmutanten wie z.B. P(6913) (siehe Anhang 6.3)

Neben der Suche nach direkten Zielgenen von *klu* wurden die Microarray-Experimente auch im Hinblick auf weitere ZNS-spezifische Marker ausgewertet, mit denen die morphologische Phänotypisierung der P(9036)-Mutanten komplettiert werden sollte. Abbildung 3.9 zeigt eine Auswahl von bekannten Neuropeptid-Genen, welche teilweise ein verändertes Expressionsniveau in *klu*-Mutanten zeigen. Mit diesen Markern konnten gezielt vergleichende *InSitu*-Hybridisierungen in wildtypischen und P(9036)-homozygoten Larvengehirnen durchgeführt werden. Da bereits für einige der gelisteten Neuropeptide ein dem Wildtyp entsprechendes Expressionsmuster in den *klu*-Mutanten aufgezeigt worden war (also kein qualitativer Unterschied im Sinne von Verlust oder Verdopplung von entsprechenden Neuronen ermittelt werden konnte), wurden nun semiquantitative *InSitu*-Hybridisierungen durchgeführt. Bei möglichst exakter Parallel-Durchführung der Färbungen mit Wildtyp- und mutanten Gehirnen sollte dabei die Intensität der Färbung ein Maß für das Expressionsniveau des entsprechenden Gens darstellen. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, konnte sowohl für *akh* (*adipokinetic hormone*) als auch für *hugin* eine erhöhte Expression in den Fressmutanten im Vergleich zum Wildtyp gezeigt und somit auch die Microarray-Daten verifiziert werden. Interessanterweise konnte die erhöhte Expression von *hugin* in den P(9036)-Mutanten auch für die P(6913)-Mutanten aufgezeigt werden. Diese *pumpless*-Mutanten zeigen wie auch die P(9036)-Homozygoten neben Wachstums- und Entwicklungsdefekten sowie Wanderverhalten einen Stopp der Nahrungsaufnahme (Zinke et al., 1999).

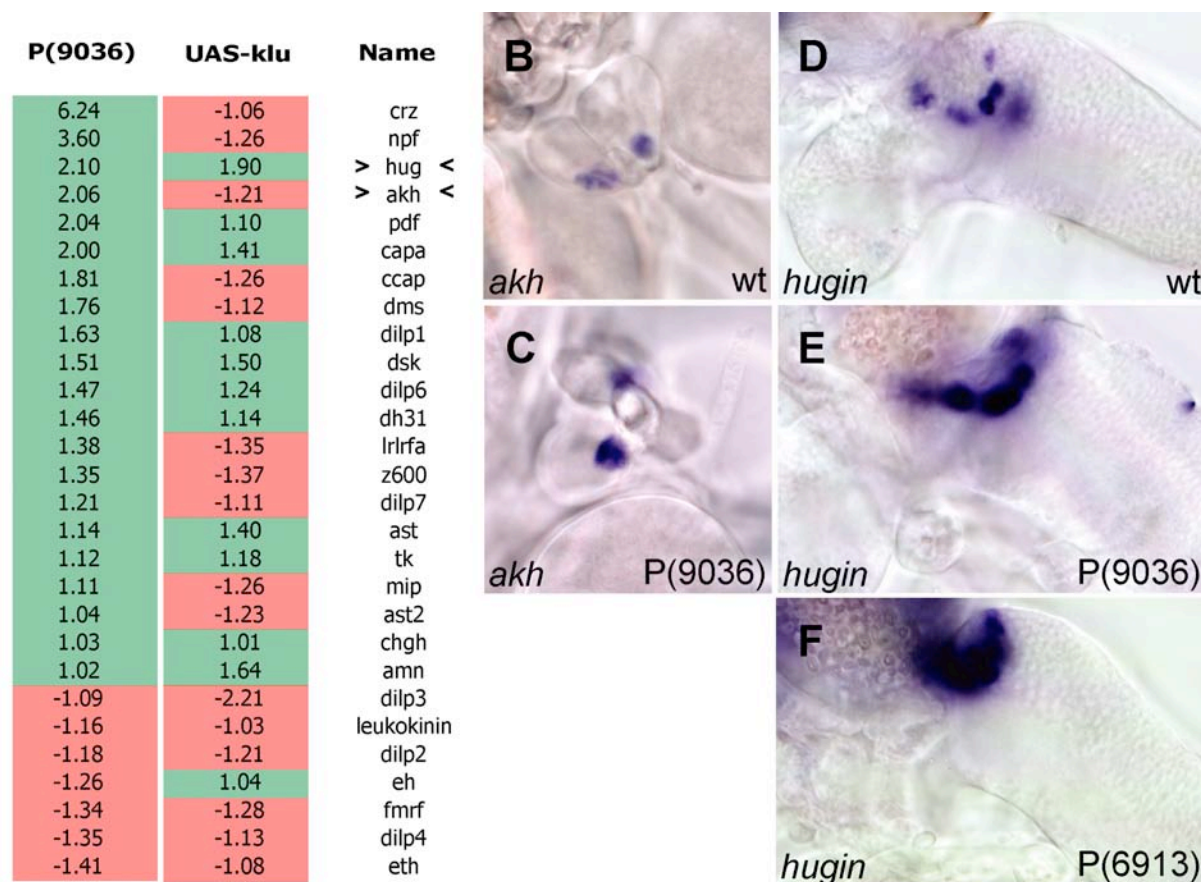


Abbildung 3.9 Neuropeptide als Marker zur semiquantitativen Analyse von P(9036)-mutanten Larvengehirnen.

Aus den Affymetrix® Microarray-Experimenten „P(9036) gegen Wildtyp“ und „UAS-klu gegen Kontrolle“ (siehe auch 3.7) wurden alle bisher bekannten *Drosophila*-Neuropeptide (ohne Berücksichtigung der statistischen Parameter *signal*, *change p-value* und *change call*, siehe Text) aussortiert. Neuropeptid-Gene, welche dem Affymetrix®-Experiment „P(9036) gegen Wildtyp“ zufolge in den *klu*-Mutanten dereguliert sind (siehe Tabelle, hochregulierte Gene sind grün hinterlegt, herunterregulierte Gene rot), dienten als Marker für semi-quantitative *InSitu*-Hybridisierungen (B-J). Für das in der Ringdrüse exprimierte *akh* (*adipokinetische hormone*) konnte im Vergleich zum Wildtyp-Expressionsniveau (B) eine erhöhte Expression in P(9036)-mutanten Larven des 1. Instar gezeigt (C) und somit die Affymetrix®-Daten verifiziert werden. Auch für das im SOG exprimierte *hugin* konnte im Vergleich zur Wildtyp-Situation (D) ein erhöhtes Expressionsniveau in der *klu*-Mutanten P(9036) detektiert werden (siehe E). Interessanterweise konnte eine solche Erhöhung der *hugin*-Expression auch in den Fressmutanten P(6913)/*ppl* nachgewiesen werden (siehe F). In allen Fällen wurden 1. Instar-Larven des jeweiligen Genotyps parallel gefärbt, anterior zeigt nach links oben.

Um zu testen, ob eines dieser in P(9036) deregulierten Neuropeptide eine wildtypische Regulation unter verschiedenen Hungerbedingungen aufweist, wurden entsprechende Färbungen in normal gefütterten und gehungerten Larven durchgeführt. Zwingt man Wildtyp-Larven des 2. Instar durch sechsständiges

Hungern auf PBS ebenfalls zum Stopp der Nahrungsaufnahme (vergleichbar dem Fress-Phänotyp in P(9036) und P(6913)), so erreicht man im Gegenteil eine Herunterregulierung der *hugin*-Expression (siehe Abbildung 3.10). Diese Herunterregulierung ist wie dargestellt Zucker-unabhängig, da sich auch bei Hungern auf PBS plus 20% Zucker ein erniedrigtes *hugin*-Expressionslevel (im Vergleich zu normalen Futterbedingungen auf Frischhefe) zeigen ließ.

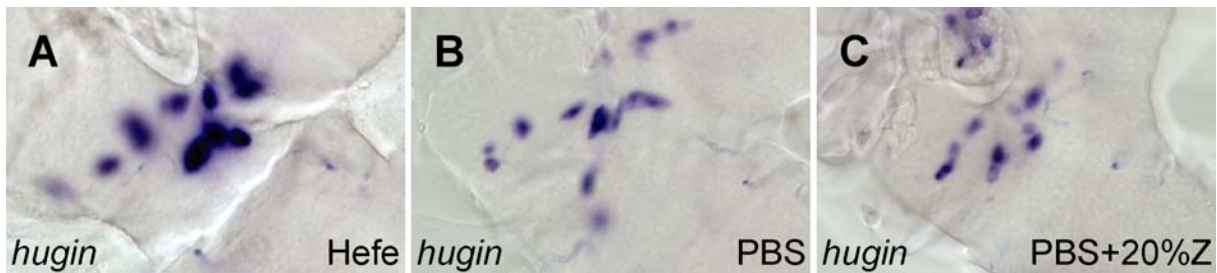


Abbildung 3.10 Regulation der *hugin*-Expression im Wildtyp als Antwort auf Hungern.

In 44-50 Stunden alten Wildtyp-Larven des 2. Instar konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Fütterung auf Frischhefe (A) das *hugin*-Expressionsniveau nach sechs Stunden Hungern auf PBS herunterreguliert wird (B). Für diese Regulation konnte keine Zucker-Abhängigkeit gezeigt werden, da sich nach Hungern auf PBS+20% Zucker ebenfalls ein erniedrigtes *hugin*-Niveau detektieren ließ (siehe C).

Somit konnte mit *hugin* ein Neuropeptid-Gen identifiziert werden, welches wildtypisch auf einen Hungerreiz hin herunterreguliert wird (Abbildung 3.10), aber in den Fressmutanten P(9036) und P(6913) hochreguliert ist (Abbildung 3.9). Diese im Wildtyp nahrungsabhängige Expression eines Neuropeptid-Gens sowie dessen „anti-wildtypische“ Regulation in zwei Fressmutanten ließen es als gerechtfertigt erscheinen, das Neuropeptid-Gen *hugin* näher zu untersuchen.

3.4. Charakterisierung des Neuropeptid-Gens *hugin*

3.4.1. Morphologische Charakterisierung von *hugin*

Im Labor von S. Roos konnte gezeigt werden, dass *hugin* für ein Prä-Propeptid kodiert, welches in mindestens zwei aktive Peptide gespalten wird. Eines der Fragmente, *hugin_γ*, zeigt Sequenzhomologien zu dem Häutungs-modifizierenden ETH (*ecdysis triggering hormone*). Das andere, *Drm-PK* (*Drosophila melanogaster Pyrokinin*) scheint ein Pyrokinin mit myostimulatorischer Wirkung zu sein (Meng et al., 2002), siehe Abbildung 3.11). Als Expressionsdomäne konnten Neurone im

suboesophagealen Ganglion (SOG) ermittelt werden, die Expression beginnt im späten Embryo und bleibt bis ins Adultstadium detektierbar. Ein mutanter Phänotyp ist nicht bekannt, ektopische Überexpression von *hugin* führt u.a. zu Häutungsdefekten und Lethalität (Meng et al., 2002).

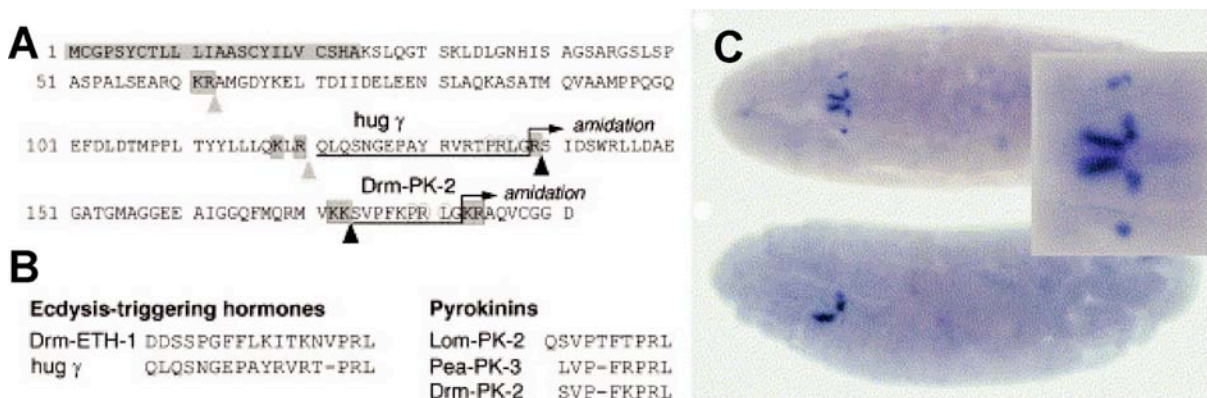


Abbildung 3.11 Charakterisierung des Neuropeptid-Gens *hugin*.

(A) Analyse der Aminosäuresequenz des von *hugin* codierten Propeptides ergab ein Signalpeptid (Aminosäuren 1-24, grau hinterlegt in A) sowie weitere drei potenzielle Peptide, welche jeweils zwischen dibasischen (ebenfalls grau hinterlegten) Schnittstellen liegen. Eine Flankierung durch solche Schnittstellen ist für Neuropeptide ebenso typisch wie eine amidierbare Aminosäure (z.B. Glycin) am 3'-Ende des Peptids. (B) Zwei der drei von *hugin* codierten Peptide zeigen Sequenzhomologien zu bereits bekannten Neuropeptiden von *D. melanogaster* und anderen Insekten (Drm, *Drosophila melanogaster*, Lom, *Locusta migratoria*, Pea, *Periplaneta americana*). (C) Histochemische *InSitu*-Hybridisierungen ergaben das sich entwickelnde suboesophageale Ganglion im ZNS des Embryos als Expressionsdomäne von *hugin* (gezeigt ist ein Stadium17-Embryo von lateral sowie von dorsal mit Vergrößerung, anterior zeigt nach links). Alle dargestellten Ergebnisse und Abbildungen nach (Meng et al., 2002).

Als erster Schritt zur weiteren Charakterisierung von *hugin* sollte zunächst ein möglichst detailliertes Konnektivitätsmuster der *hugin*-Neurone ausgearbeitet werden. Expression des Markergens τ -GFP unter der Kontrolle des *hugin*-Promotors (siehe Abb. 3.6) ermöglichte das Anfärben von Zellsomata, Axonen und Dendriten der *hugin*-Neurone. Abbildung 3.12 zeigt wie auch schon die Doppelfärbung für *Okt30* mit einer *hugin*-Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung (siehe Abb. 3.4E) die Ringdrüse als ein Ziel der *hugin*-Neurone, des weiteren werden die Pilzkörper innerviert. Weitere Axontermini sind nahe der Mittellinie in thorakalen Segmenten des Ventralnervensystems (VNS) detektierbar, ebenso wie glomeruläre Dendritenzweigungen im SOG anterior der *hugin*-Zellsomata.

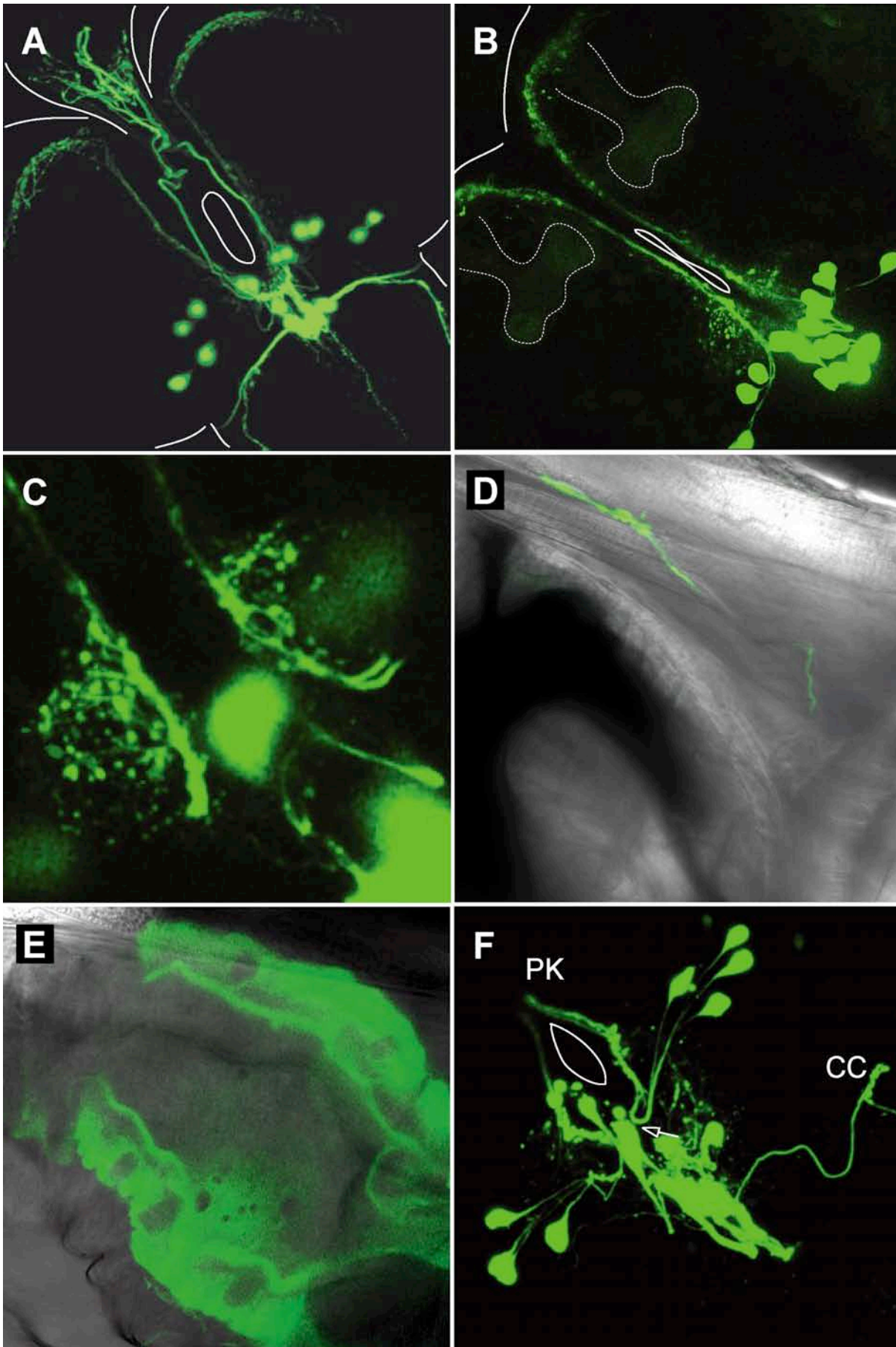


Abbildung 3.12 Neuroanatomische Analyse der *hugin*-Zellen sowie deren Konnektivität in Larven und Adulten von *Drosophila melanogaster*.

In allen Fällen wurden cytoplasmatisches GFP oder τ -GFP unter dem Promotor-Konstrukt *hugS3* exprimiert und die GFP-Fluoreszenz in 3. Instar-Larven (A-E) bzw. Adulten (F) direkt detektiert. Anterior zeigt nach links oben, Umriss von ZNS, Ringdrüse und Foramen sind eingezeichnet. (A) Ausgehend von den *hugin*-Neuronen im ventralen Teil des suboesophagealen Ganglion (SOG) lassen sich prominente Axone bis in die *Corpora cardiaca* in der Ringdrüse verfolgen. Weitere *hugin*-Axone verlaufen ventral am Foramen vorbei nach anterior, um an der Kortex-Neuropil-Grenze entlang im lateralen Protocerebrum zu enden. Vom SOG aus verlassen weitere paarige Axone das SOG nach lateral, zusätzlich verlaufen weitere paarige Axone parallel zur Mittellinie im Ventralnervensystem (VNS) nach posterior und verlassen das VNS am posterioren Ende. (B) Ventralansicht der *hugin*-Neurone, welche im Protocerebrum die Pilzkörper innervieren (Umriss der Pilzkörper sind angedeutet, siehe auch Autofluoreszenz der Pilzkörper). Dabei verlaufen die Endigungen der *hugin*-Axone zwischen den Kenyon-Zellen im Kortex und deren Dendriten in der Pilzkörper-Calyx. (C) Anterior der *hugin*-Somata und in direkter Nachbarschaft des oesophagealen Foramens lassen sich glomerulär organisierte, von *hugin* innervierte dendritische Strukturen detektieren (Vergrößerung des SOG-Neuropilbereiches, *hugin*-Zellkörper außerhalb des Fokus). (D) Die *hugin*-Axone, die von den Zellsomata aus das SOG nach lateral verlassen, können bis zum cephalopharyngealen Bereich der Larve verfolgt werden, wo pharyngeale Muskulatur innerviert wird. Dargestellt ist ein Durchlichtbild vom cephalopharyngealen Apparat der Larve mit erkennbaren Bodenplatten der Mundhaken und innervierter, quergestreifter Muskulatur in Überlagerung eines Fluoreszenzbildes, das die *hugin*-Axone zeigt. (E) Im Bereich des Mitteldarmes befindet sich in *hugS3>GFP*-Larven ein kurzer, genau begrenzter Bereich mit fluoreszenten Darmepithelzellen. Diese kommen als potenzielle Ziele der *hugin*-Axone in Frage, welche vom SOG aus nach posterior verlaufen und das VNS am posterioren Ende verlassen. (F) Auch in der Adulten lassen sich Pilzkörper (PK, außerhalb des Fokus gelegen) und *Corpora cardiaca* (CC) als Projektionsziele der im SOG gelegenen *hugin*-Neuronen ausmachen. Dabei scheinen die am weitesten lateral gelegenen *hugin*-Zellen exklusiv am Foramen vorbei zu den Pilzkörper-Calyces zu projizieren (siehe Pfeil).

Im Übergang vom SOG zum thorakalen VNS verlassen paarige Axone das ZNS nach lateral, diese konnten bis zum cephalopharyngealen Komplex der Larve verfolgt werden. Hier werden paarige Pharynxmuskeln innerviert. weitere paarige *hugin*-Axone verlaufen lateral entlang der Mittellinie des VNS und verlassen dieses am posterioren Ende. Diesen Axonen konnte zwar noch nicht bis zum innervierten Zielorgan gefolgt werden, die in Abbildung 3.12E gezeigte Fluoreszenz im Mitteldarm spricht jedoch für eine Innervierung des Gastrointestinaltraktes durch *hugin*.

3.4.2. Phänotypische Charakterisierung von *hugin*

Da für *hugin* keine klassische Mutante zur Verfügung steht, sollte mit Hilfe der *hugin*-Promotorfliegen ein zellulärer bzw. ein Transkript-*knock out* induziert werden. In einem Ansatz sollte durch Expression von *reaper* Apoptose in den *hugin*-Neuronen induziert werden. Parallel dazu wurde ein Expressionskonstrukt kloniert, das über

RNA-Interferenz einen transkriptionellen *knock down*, also ein Ausschalten der endogenen *hugin*-mRNA ermöglicht (Misquitta and Paterson, 1999). Unter der Kontrolle des UAS-Promotors wird hier eine „Kopf an Kopf“ oder „Fuß an Fuß“ zusammengesetzte *hugin*-RNA inklusive eines mittigen Introns transkribiert. Das Intron erlaubt die Ausbildung einer Haarnadelschleife sowie Hybridisierung der gegensinnigen *hugin*-RNA-Abschnitte. Über bisher nicht bis ins Detail geklärte Mechanismen kommt es nach der Bildung eines RNA-Tripletts mit der endogenen *hugin*-RNA zur Degradierung desselben, wodurch ein Verlust des *hugin*-Proteins erwirkt wird.

Erste Analysen dieser „*hugin*-Mutanten“ ergaben sowohl für den zellulären *knock out* als auch für RNA-*knock down* den in Abbildung 3.13 dargestellten Häutungsphänotypen. Die *hugin*-mutanten Larven können die Häutung zwischen 2. und 3. Larvenstadium nicht vervollständigen, wobei die alte Kutikula sowie das Skelett des alten Mundapparates nicht abgestreift werden. Daher konnten in beiden Situationen die in Abbildung 3.13 gezeigten doppelten Mundhaken bzw. Bodenplatten detektiert werden. Inwieweit dieser Häutungsphänotyp den von Meng et al. (Meng et al., 2002) gezeigten Überexpressionsphänotyp widerspiegelt, muss zunächst offen bleiben.

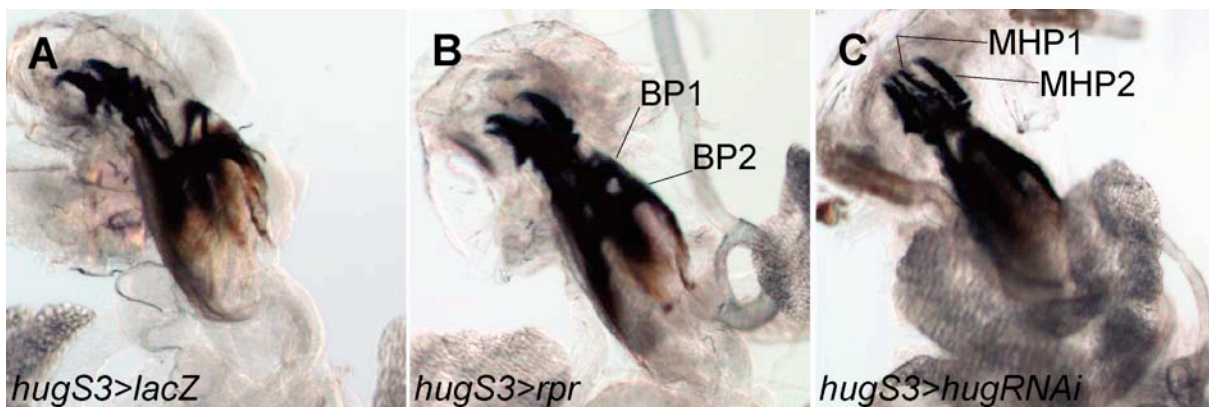


Abbildung 3.13 Phänotypische Analyse der *hugin*-Zell-*knock outs* und der *hugin*-mRNA-*knock downs*.

Im Vergleich zum Mundapparat der Kontrolle (*hugS3>lacZ*, A) waren sowohl bei den Zell-*knock out*-Larven *hugS3>reaper* (mit in den *hugin*-Neuronen induzierter Apoptose, B) als auch bei den RNA-*knock downs* *hugS3>hug*-RNAi (wobei hier die endogene *hugin*-mRNA degradiert wird, C) doppelte Mundhakenpaare (MHP) sowie doppelte Bodenplatten (BP) detektierbar. Präpariert wurden in allen Fällen 72-76 Stunden alte Larven des jeweiligen Genotyps, anterior zeigt nach links oben. In beiden Fällen des *hugin*-*knock out*'s wurden beide Stadien der nicht vollendeten Häutung zwischen 2. und 3. Instar gefunden.

3.4.3. *hugin*-Neurone und sensorischer *Input*

Wie oben dargestellt konnten u.a. die Pilzkörper als Projektionsziele von *hugin*-Neuronen ermittelt werden. Diese aus Zellsomata (den Kenyon-Zellen), dendritischen Feldern (der Pilzkörper-Calyx) und Axonbahnen bestehenden Gehirnstrukturen gelten als Zentren für das Verarbeiten von gustatorischen und olfaktorischen Signalen sowie als Sitz des Gedächtnisses von *Drosophila*. Die Innervierung dieser gustatorischen und olfaktorischen Signalverarbeitungszentren durch *hugin*-Neurone spricht für eine Rolle von *hugin* in solchen Geschmacks- bzw. Geruchssignalkaskaden. Eine solche hypothetische Rolle könnte sich beispielsweise durch eine Regulation des *hugin*-Expressionsniveaus in Abhängigkeit von geruchs- oder geschmackssensorischem *Input* nachweisen lassen. Um dies zu testen, wurden Wildtyp-Larven normal gefüttert, komplett gehungert oder gehungert in Gegenwart von Frischhefe als Geschmack bzw. Geruch (schematischer Versuchsaufbau siehe Abbildung 3.14).

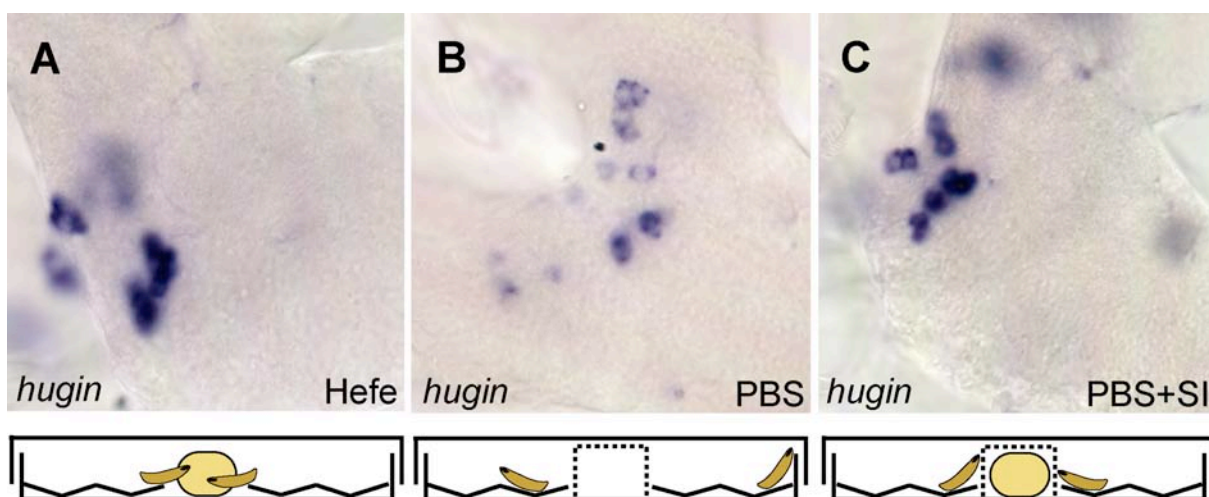


Abbildung 3.14 Regulation der *hugin*-Expression in Antwort auf sensorischen *Input* (SI).

Der jeweilige Versuchsaufbau ist schematisch im Querschnitt dargestellt. (A) zeigt eine semiquantitative *InSitu*-Hybridisierung für *hugin* im suboesophagialen Ganglion (SOG) einer 72 Stunden alten Wildtyp-Larve, die für weitere sechs Stunden auf Frischhefe gefüttert wurde. Im Vergleich dazu ist das *hugin*-Expressionsniveau im SOG einer gleichaltrigen Wildtyp-Larve, die für sechs Stunden auf PBS gehungert wurde, deutlich niedriger (siehe B). Diese Herunterregulierung von *hugin* unter kompletten Hungerbedingungen lässt sich jedoch nicht detektieren, wenn man Frischhefe als sensorischen *Input* (unter einem Sieb unerreichbar für die Larve, siehe C) anbietet. Unter diesen Hungerbedingungen, in welchen aber Frischhefe als Futterquelle gerochen bzw. geschmeckt werden kann, steigt das *hugin*-Expressionslevel wieder auf Normalniveau.

Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, ist die Reduktion des *hugin*-Expressionslevels auf einen sechsständigen Hungerreiz hin (Abb. 3.14, im Vergleich zur normalen Futtersituation auf Frischhefe) keine eigentliche Hungerantwort, sondern vielmehr auf das Ausbleiben sensorischer Signale zurückzuführen. Bietet man nämlich Frischhefe als olfaktorischen bzw. gustatorischen Reiz an (und stellt aber sicher, dass die Hefe nicht gefressen werden kann, die Larve also weiter hungert), so lässt sich wieder ein normales *hugin*-Expressionsniveau detektieren (Abbildung 3.14). Somit könnten *hugin*-Neurone durchaus eine Rolle in olfaktorischen bzw. gustatorischen Signalkaskaden spielen.

Eine solche hypothetische Rolle von *hugin*-Neuronen in der Geschmacks- bzw. Geruchssignalverarbeitung sollte auch voraussetzen, dass *hugin*-Neurone olfaktorischen/gustatorischen *Input* vom antenno-maxillaren Komplex der Larve erhalten.

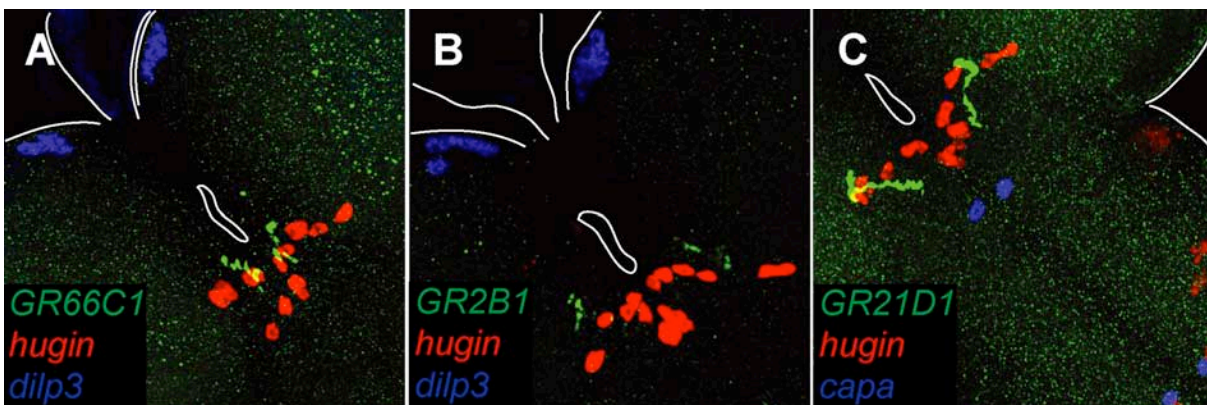


Abbildung 3.15 Neuroanatomische Analyse der Konnektivität von *hugin*-Neuronen und Geschmacks-/Geruchssinnesneuronen.

In allen Fällen wurden wandernde 3. Instar-Laven der jeweiligen *driver*-Linie gefärbt. Anterior zeigt nach links oben, Umriss von ZNS, Ringdrüse und Foramen sind eingezeichnet. In Verbindung mit *hugin*-*InSitu*-Hybridisierungen (Rotfärbung in A-C) lassen sich Axone von Geschmacks-/Geruchssinnesneuronen (Grünfärbung in A-C) im Larven-ZNS proximal der *hugin*-Somata detektieren. Diese im antenno-maxillaren Komplex der Larve gelegenen sensorischen Neurone 1. Ordnung exprimieren z.B. *GR66C1* und innervieren das SOG (Grünfärbung in A, als Kontrolle Blaufärbung für *dilp3*). *GR2B1*-exprimierende Sinnesneurone innervieren die Antennalloben im Deuterocerebrum (Grünfärbung in B, als Kontrolle Blaufärbung für *dilp3*). Die Antennenloben werden ebenfalls innerviert von *GR21D1*-positiven Sinnesneuronen (Grünfärbung in C, als Kontrolle Blaufärbung für *capa*).

Um dies zu testen, wurden die bereits in Abbildung 3.4 gezeigten Projektionsmuster von Geruchs- und Geschmacksrezeptor-Neuronen (Or-/Gr-Neuronen) mit Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierungen für *hugin* kombiniert. Wie in Abbildung 3.15 dargestellt, ließen sich tatsächlich in direkter Nachbarschaft der *hugin*-Zellsomata im SOG Axone der sensorischen Neuronen detektieren.

Da dies aber noch nicht auf eine synaptische Verbindung von Or-/Gr-Axonen und *hugin*-Dendriten schließen lässt (beachte, dass Zellsomata im Kortex und Axone, Dendriten und Synapsen im Neuropil lokalisiert sind), wurden Färbungen für die Or-/Gr-Projektionsmuster auch mit Färbungen für das *hugin*-Projektionsmuster kombiniert. Eine solche Doppelfärbung lässt sich nicht über die Expression von zwei Markergenen mittels Gal4-UAS-System realisieren, da „über Kreuz“-Aktivierung der Markergenen-Expression stattfinden würde. Zur Anfärbung der *hugin*-Neuronen und deren Konnektivität wurden daher direkte Expressionskonstrukte kloniert, in welchen der *hugin*-Promotor direkt die Expression von cytoplasmatischem YFP (*yellow fluorescent protein*) bzw. CFP (*cyan fluorescent protein*) steuert. Transgene Fliegen für beide Konstrukte exprimieren nun CFP bzw. YFP in allen *hugin*-positiven Zellen, auch Axone und Dendriten lassen sich so (durch Diffusion der Fluorochrome) bis zu einem gewissen Grad anfärben.

Abbildung 3.16 zeigt den SOG-Neuropilbereich von doppeltransgenen *Drosophila*-Larven, die über das Gal4-UAS-System unter verschiedenen Gr-/Or-Promotorkonstrukten das Fusionsprotein nSyb-GFP sowie YFP direkt unter dem *hugin*-Promotor exprimieren. Mittels spektraler Analyse der gesamten detektierten Emission können beide Signale, obwohl sich die Emissionsspektren von GFP und YFP stark überschneiden, getrennt und in unterschiedlichen Falschfarben dargestellt werden (siehe 2. Material und Methoden für *emission fingerprinting*). In den in Abbildung 3.16 dargestellten Fällen wurde jeweils dasjenige Volumen mikroskopisch ausgewertet, in welchem die Axontermini der jeweiligen Geruchs- bzw. Geschmackssinnesneurone detektierbar waren. Im Falle von *GR66C1*, für den Scott et al. eine Innervierung des SOG publiziert haben, konnten im gleichen Volumen, in dem auch diese Sinnesneuron-Efferenten enden, glomeruläre, von *hugin* innervierte Strukturen detektiert werden (Scott et al., 2001). Als „morphologische Negativ-Kontrolle“ wurden auch die Projektionsmuster von *GR21D1* sowie *hugin* parallel detektiert. Für die Endigungen von *GR21D1*-positiven und *GR2B1*-positiven Sinnesneuronen wurde von Scott et al. eine Innervierung der larvalen Antennenloben publiziert (Scott et al., 2001). Bei der spektralen Auswertung des Volumens, in welchem die entsprechenden Axone enden, wurden die von *hugin* innervierten glomerulären Strukturen nicht mitdetektiert.

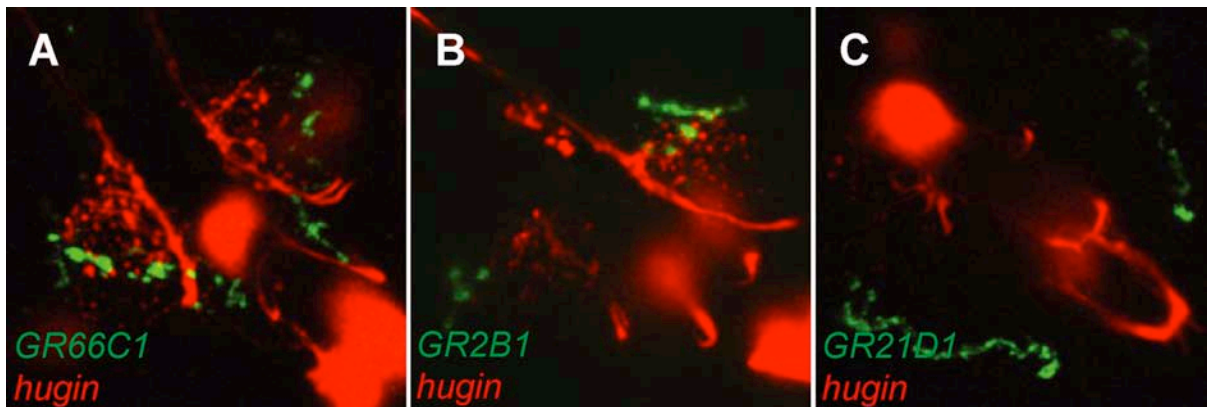


Abbildung 3.16 Neuroanatomische Analyse der Innervierung des SOG/Tritocerebrums durch Geschmackssinnesneurone sowie durch *hugin*-Neurone.

Paarige glomeruläre Strukturen im SOG/Tritocerebrum, in welche *hugin*-Neurone Dendriten entsenden (Rotfärbung in A), werden auch von Axonen der Geschmacks-/Geruchssinnesneuronen innerviert (*GR66C1*, Grünfärbung in A). Sowohl *GR2B1*-exprimierende als auch *GR21D1*-positive Sinnesneurone innervieren die deuterozerebral gelegenen Antennalloben (Grünfärbung für *GR2B1* und *GR21D1* in B und C). Diese werden nicht von *hugin* innerviert (fehlende glomeruläre Rotfärbung in B und C). Ausgewertet wurden hier jeweils Neuropil-Regionen des SOGs, Trito- sowie Deuterozerebrums von wandernden 3. Instar-Larven des jeweiligen Genotyps *GR>nSyb-GFP;hugS-YFP*. Anterior zeigt nach links oben.

3.4.4. Geschmackspräferenz-Tests mit *hugin-knock out*-Larven

Die Möglichkeit, dass *hugin*-Neurone an der gustatorischen Reizweiterleitung vom SOG zu den Pilzkörpern beteiligt sind, sollte weiterhin auf physiologischem Weg getestet werden. In einem Geschmackspräferenz-Test mit attraktiven bzw. aversiven Stimuli sollte man erwarten, dass Wildtyp- bzw. Kontrolllarven einen attraktiven (z.B. süßen) Geschmack bevorzugen und einen aversiven (z.B. salzigen) Geschmack vermeiden. Unterbricht man hingegen eine hypothetisch *hugin*-vermittelte Geschmacksreizweiterleitung (z.B. mit den bereits in Abbildung 3.13 gezeigten *reaper*- und *hugin*-RNA-*knock outs*), so sollte Präferenz eines attraktiven bzw. Vermeiden eines aversiven Geschmacks ausbleiben. In einem wie in Abbildung 3.17 schematisch dargestellten Versuchsaufbau wurden Kontroll- und *knock out*-Larven eine geschmacklose Wasseragar-Platte mit einem Insert aus attraktiven Zuckeragar bzw. aversiven Kochsalzagar angeboten. In beiden Situationen wurde jedoch kein unterschiedliches Verhalten von Kontroll- und *knock out*-Individuen festgestellt.

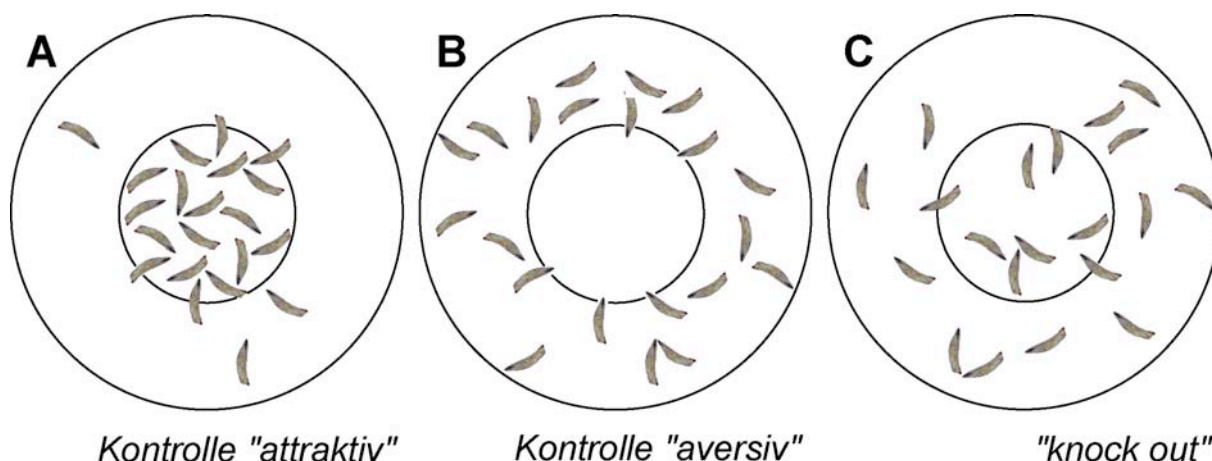


Abbildung 3.17 Geschmackstests mit *hugin*-Zell-*knock outs* und *hugin*-mRNA-*knock down*-Individuen.

In Geschmackspräferenz-Tests mit einem attraktiven Geschmack wie „süß“ (Zuckeragar in der inneren Platte in A) bevorzugte der größte Teil der Larven des Kontrollgenotyps *hugS3>lacZ* die innere „süße“ Platte. Wurde ein aversiver Geschmack wie „stark salzig“ angeboten (NaCl-Agar in der inneren Platte in B), so vermieden fast alle Individuen der Kontrolle *hugS3>lacZ* die „salzige“ Platte. Unterbräche man tatsächlich die Verarbeitung von Geschmacksinformation durch einen *hugin*-Zell-*knock out* oder *hugin*-mRNA-*knock down*, so wäre eine zufällige Verteilung der Individuen auf Geschmacks- und Wasseragar zu erwarten. Diese in C dargestellte Situation trat sowohl für *hugS3>reaper* als auch für *hugS3>hug-RNAi* weder für „süß“ noch für „salzig“ ein. Verwendet wurden hier 72 Stunden alte Larven des jeweiligen Genotyps.

Auch die *hugS3>reaper*- und *hugS3>RNAi*-Individuen bevorzugten den Zuckeragar bzw. mieden den Kochsalzagar. Auf weitere Tests mit den drei verbleibenden Geschmacksstimuli „sauer“, „bitter“ und „umami“ wurde zunächst im Hinblick auf weitere morphologische Analysen zunächst verzichtet.

3.4.5. *hugin*-Neurone als Projektions- oder modulatorische Neurone

Die Morphologie von Signalbahnen, über welche in *Drosophila*-Adulten olfaktorische Information von sensorischen Neuronen über Projektionsneurone zu Pilzkörper-Neuronen geleitet wird, sind bereits in vielen Details bekannt. Dabei sind es die Neurone 2. Ordnung, die Projektionsneurone, welche Glomeruli in den Antennalloben (AI) innervieren und von dort die Geruchsinformation vertikal an die Pilzkörper als Verarbeitungszentren der Geruchsinformation weiterleiten. Ein Großteil der Projektionsneurone lässt sich mit Hilfe der *enhancer trap*-Linie *GH146* anfärben (Stocker et al., 1997).

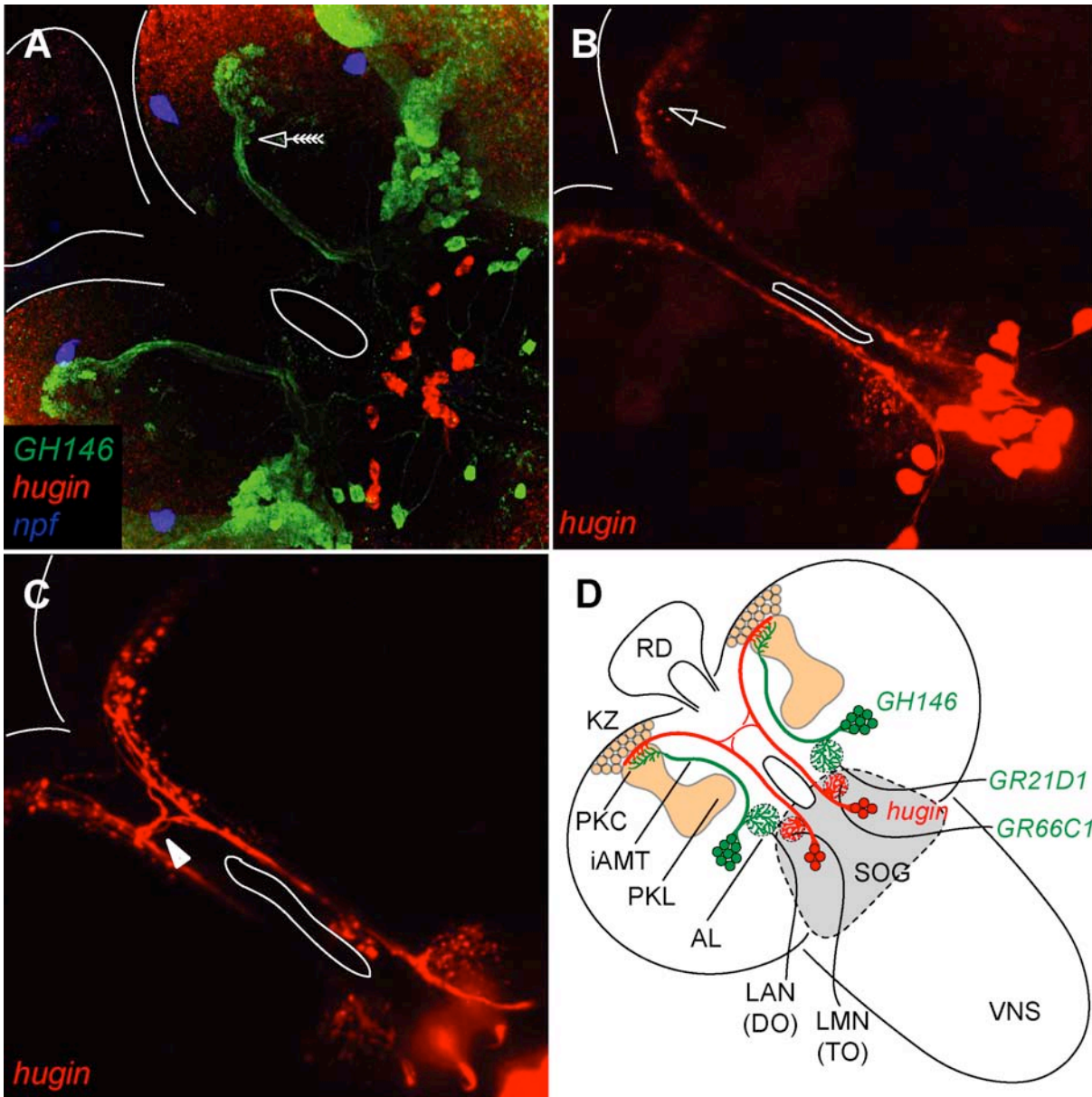


Abbildung 3.18 Neuroanatomischer Vergleich von Projektionsneuronen mit *hugin*-Neuronen.

In allen Fällen wurden wandernde 3. Instar-Larven des jeweiligen Genotyps (*GH146>Cameleon2.1* in A bzw. *hugS3>YFP* in B und C) ausgewertet. Die in A dargestellte Grünfärbung zeigt Projektionsneurone, welche von dem *enhancer trap*-Konstrukt *GH146* markiert werden. Von den Zellsomata im Deuterocerebrum aus werden die larvalen Antennalloben innerviert und die dort abgegriffene olfaktorische Information wird über die im inneren antennocerebralen Trakt verlaufenden Axone zur Calyx der Pilzkörper im Protocerebrum weitergeleitet (Eintrittsstelle der Axone in Pilzkörper-Calyx ist markiert, siehe gefiederter Pfeil). Die Kombination dieser *GH146*-Färbung mit einer *hugin*-Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung (Rotfärbung in A, als Kontrolle *npf*-*InSitu* in Blau) ergibt keine doppelgefärbten *hugin*/*GH146*-Zellen. B zeigt das Projektionsmuster derjenigen *hugin*-Neurone, welche zu den Pilzkörpern projizieren (nur der ventrale Teil des ZNS wurde hier ausgewertet) sowie Autofluoreszenz der Pilzkörper. Die Eintrittsstelle der *hugin*-Axone in die Pilzkörper-Calyx ist markiert

(siehe ungefederter Pfeil). C Bei exklusiver Auswertung des Volumens, in welchem die *hugin*-Axone verlaufen, wird Innervierung der ipsi- und contralateralen Pilzkörper durch *hugin*-Axone deutlich. Axone, welche die Mittellinie kreuzen, sind markiert (siehe Pfeilspitze, *hugin*-Zellsomata liegen außerhalb des Fokus). Die Unterschiede der in A dargestellten olfaktorischen Projektionsneuronen und der in B und C dargestellten *hugin*-Neuronen sind in D schematisch zusammengefasst. Klassische olfaktorische Projektionsneurone im Deuterocerebrum (*GH146*-positiv, in grün dargestellt) empfangen über Dendriten in den Antennalloben (AL) olfaktorische Informationen, welche über die larvalen Antennalnerven (LAN) hauptsächlich vom Dorsalorgan (DO, z.B. *GR21D1*-positive Sinnesneurone) das ZNS erreichen. Über den inneren antenno-cerebralen Trakt (iACT) leiten die Projektionsneurone diese Information an die Pilzkörper (hellbraun hinterlegt) weiter. Die jeweils ipsilaterale Pilzkörper-Calyx (PKC), welche die Dendriten der Kenyon-Zellen (KZ) beinhaltet, wird dabei von median innerviert. Über die Pilzkörper-Loben (PKL), welche die Axone der Kenyon-Zellen beinhalten, wird die verarbeitete Geruchsinformation weitergeleitet. *hugin*-Neurone (dargestellt in Rot) im suboesophagialen Ganglion (SOG, grau hinterlegt) entsenden Dendriten in bisher uncharakterisierten SOG-Glomeruli, welche über den larvalen Maxillarnerv (LMN) von z.B. *GR66C1*-positiven Sinnesneuronen im Terminalorgan (TO) innerviert werden. Über ebenfalls uncharakterisierte Bahnen innervieren die *hugin*-Axone die ipsi- und contralateralen Pilzkörper-Calyces von dorsoanterior. *hugin*-Neurone, welche Axone zur Rindrüse (RD), ins ventrale Nervensystem (VNS) oder zum cephalopharyngealen Komplex entsenden, sind nicht eingezeichnet.

Um morphologisch zu testen, ob es sich bei den *hugin*-Neuronen um klassische olfaktorische Projektionsneurone handelt, wurde wie in Abbildung 3.18 dargestellt das *GH146*-Projektionsmuster mit einer Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung für *hugin* kombiniert. Keine der *GH146*-positiven Projektionsneuronen exprimieren jedoch *hugin*. Da aber durchaus auch *GH146*-negative Projektionsneurone existieren, lässt sich nicht gänzlich ausschließen, dass *hugin*-Neurone Projektionsneurone sind. Ein Vergleich der Axonbahnen, über welche „klassische“ *GH146*-positive Projektionsneurone die Pilzkörper innervieren, mit dem Projektionsmuster von *hugin*-Neuronen zum Pilzkörper (siehe Abbildung 3.18) bestärkt diese Hypothese aber nicht. So innervieren die *GH146*-positiven Projektionsneurone die Pilzkörper-Calyces eher von median, während die *hugin*-Neurone die Pilzkörper-Calyces von dorsoanterior innervieren (vergleiche Abb. 3.19A+B). Des weiteren findet sich bei klassischen Projektionsneuronen keine Innervierung der contralateralen Pilzkörper (siehe Abb. 3.19C).

Von der Honigbiene *Apis mellifera* ist ein modulatorisches Neuron bekannt, das wie die *hugin*-Neurone Dendriten in das SOG entsendet sowie Pilzkörper und andere Gehirnregionen axonal innerviert. Dieses unpaarige Neuron stellt kein Projektionsneuron dar, sondern wirkt positiv modulatorisch auf Geruchsverarbeitung und geruchsassoziertes Lernen.

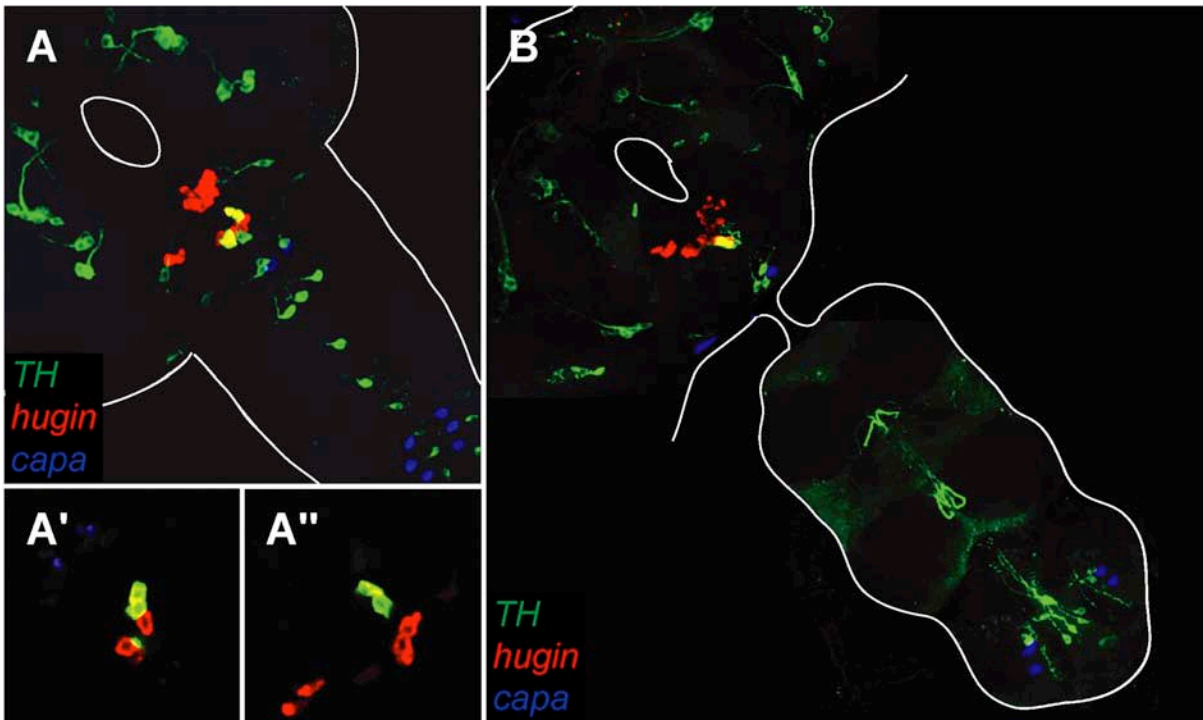


Abbildung 3.19 Vergleich der Expressionsdomänen von *TH* (*tyrosine hydroxylase*) und *hugin* im ZNS von *Drosophila*-Larven und -Adulten.

Gefärbt wurden jeweils Individuen des Genotyps *TH>GFP*, anterior zeigt nach links oben. Die Umrisse des ZNS und des oesophagealen Foramens sind eingezeichnet B stellt eine Montage zweier Einzel-Projektionen eines adulten ZNS dar. Unter dem Promotor der *Tyrosin-Hydroxylase* (*TH*, dem Schlüsselenzym der Dopamin-Synthese) lassen sich Markergene in dopaminergen Neuronen im *Drosophila*-ZNS exprimieren (Friggi-Grelin et al., 2002), τ -GFP als Markergen, Grünfärbung in A, A', A'', und B). Kombination dieser *TH*-Färbung mit einer Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung für *hugin* (Rotfärbung in A, A', A'', und B, blaue *capa*-Färbung als Kontrolle) zeigt vier der *hugin*-positiven Neurone im SOG als potentiell dopaminerg auf. Diese Doppelfärbung ist sowohl im Larven-ZNS (siehe A als Projektion sowie A' und A'' als Einzel-Fokusebenen-Bilder) als auch im Adulten-ZNS (siehe B) zu beobachten. *TH*-positive/dopaminerge Neurone sind in vier Gruppen zu jeweils 4-10 Zellen in Proto- und Deutero-cerebrum sowie paarig und unpaarig im SOG sowie in fast allen Thorax- und Abdominalsegmenten im VNS angeordnet.

Als Neurotransmitter konnte in diesem Neuron Oktopamin ermittelt werden, und auch in *Drosophila* wird diesem biogenen Amin eine generelle modulatorische Rolle im ZNS zugeschrieben. Neben Oktopamin scheint auch Dopamin eine solche Rolle als genereller synaptischer Neuromodulator zu spielen. Dopaminerge Neurone lassen sich in *Drosophila* mit Hilfe einer Promotor-Fliege markieren, in welcher Markergene unter dem Promotor der *Tyrosin-Hydroxylase* (*TH*) exprimiert werden können (Friggi-Grelin et al., 2002). Tyrosin-Hydroxylase als Schlüsselenzym in der Dopaminsynthese

katalysiert die Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin zum Dopaminvorläufer L-Dopa.

Um zu testen, ob *hugin*-Neurone als potentielle modulatorische Neurone einen dieser beiden Neurotransmitter nutzen, wurde zunächst die Färbung der *TH*-positiven Zellen mit einer Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierung für *hugin* kombiniert. Wie in Abbildung 3.19 gezeigt, exprimieren vier der *hugin*-positiven Zellen im SOG auch *TH*, wobei diese Doppelfärbung sowohl für Larven als auch für Adulte nachgewiesen werden konnte. Eine Bestätigung dieser Doppelfärbung durch die Kombination einer *hugin*-*InSitu*-Hybridisierung mit einer Antikörper-basierten Detektion von Dopamin (siehe auch Diskussion) konnte noch nicht erreicht werden. Das Ausarbeiten der Konnektivitätsmuster dieser doppelpositiven Neurone sowie Doppelfärbungen für *hugin* und weitere Neurotransmitter stehen ebenfalls noch aus.

4. Diskussion

Das Zentralnervensystem (ZNS) von *Drosophila melanogaster* als übergeordnete Schaltstelle, über welche elementare Prozesse wie Nahrungsaufnahme, Wachstum und Entwicklung gesteuert werden, war bisher experimentell mehr oder weniger unzugänglich. Klassische neuroanatomische Experimente zur Untersuchung der Regulation von Nahrungsaufnahme wie z.B. das Durchtrennen des *Nervus cardiacus recurrens* und dadurch ausgelöste Hyperphagie in der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* (Gelperin, 1967) oder die artifizielle Stimulierung von abdominalen Dehnungsrezeptoren und dadurch ausgelöster Nahrungsaufnahme-Stopp sowie Ecdysis bei der Wanze *Rhodnius prolixus* (Wigglesworth, 1934) lassen sich in systematischer Art und Weise bei *Drosophila melanogaster* technisch nicht durchführen. Erst in letzter Zeit und nicht zuletzt durch die Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms wurden über molekularbiologische Methoden Arbeiten zur Regulation von Nahrungsaufnahme (Zinke et al., 1999), Wachstum und Entwicklung (Colombani et al., 2003; Ikeya et al., 2002; Rulifson et al., 2002) möglich. So gewinnt man langsam Einblicke in Regelkreise, die u.a. über das ZNS die Nahrungsaufnahme und dadurch auch Wachstum und Entwicklung steuern.

4.1. Die Fressmutante P(9036) und das Neuropeptid-Gen *hugin*

Im Kontext der Regulation der Nahrungsaufnahme konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse der Fressmutanten P(9036) ein weiterer Zugang zum Zentralnervensystem von *Drosophila melanogaster* geschaffen werden. In diesen Fressmutanten inseriert der P(9036)-Vektor direkt oberhalb (5'-) des ersten Exons von *klumpfuss* (*klu*), einem ZNS-spezifischen Transkriptionsfaktor. Phänotypisch zeigen die P(9036)-Mutanten neben einem Stopp der Nahrungsaufnahme auch ein Wanderverhalten, das wildtypisch für 3. Instar-Larven kurz vor der Verpuppung ist (Melcher, 2001). Auf Transkript-Ebene konnte nun zunächst eine 5'-Deletion der *klu*-mRNA nachgewiesen werden, was wie gezeigt zu einem Verlust des *klu*-Proteins in den P(9036)-Mutanten führt.

Zur systematischeren Analyse dieser Fressmutanten P(9036) und der Rolle des Transkriptionsfaktors *klu* bei der Regulation der Nahrungsaufnahme sollten genomweite molekularbiologische Methoden wie DNA-Microarrays mit bildgebenden Methoden wie confokaler Mehrkanal-Fluoreszenz-Mikroskopie kombiniert werden. Über diesen Ansatz konnte mit *hugin* ein bisher funktionell uncharakterisiertes Neuropeptid-Gen identifiziert werden, welches nicht nur spezifisch in einem an der

Nahrungsaufnahme beteiligten Bereich des ZNS, dem suboesophagealen Ganglion (SOG) exprimiert wird. Vielmehr konnte auch eine wildtypische Regulation der *hugin*-Expression in Abhängigkeit von Nahrungssignalen sowie eine Deregulation in den Fressmutanten P(9036) und P(6913) (der *pumpless*-Mutante, (Zinke et al., 1999)) aufgezeigt werden. Auf neuroanatomischer Ebene konnten zum einen geschmackssensorische Neurone im antenno-maxillären Komplex der Larve als potenziell vorgeschaltete Sinnesorgane identifiziert werden. Des weiteren konnten die Ringdrüse (Kontrolle des gesamten Metabolismus), die Pilzkörper (Integration von Geruch und Geschmack), Pharynxmuskulatur (Mechanik der Nahrungsaufnahme) und Darm (Verdauung) als nachgeschaltete Organe identifiziert werden (zusammengefasst in Abbildung 4.1).

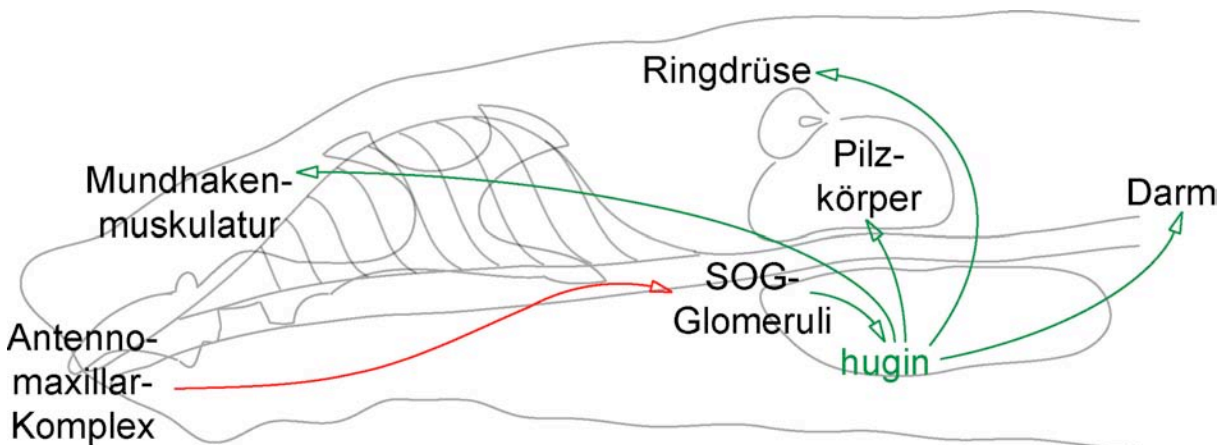


Abbildung 4.1 Zusammenfassung der *hugin*-Afferenzen und -Efferenzen.

Schematisch dargestellt sind die Bahnen, über die die *hugin*-Neuronen im suboesophagealen Ganglion (SOG) gustatorische Informationen von geschmackssinnesneuronen im antenno-maxillären Komplex der Larve empfangen. Zwischenstation dieser Informationen sind SOG-Glomeruli. Des weiteren sind die Bahnen dargestellt, über welche die *hugin*-Neuronen ihre Zielorgane innervieren. Dies sind die Ringdrüse (als wichtigstes neuroendokrines Organ der Larve), die Pilzkörper (als Haupt-Relaisstation für Geschmacks- und Geruchsinformation sowie Hauptsitz des Gedächtnisses von *Drosophila*), des weiteren Mundhakenmuskulatur und Darm (mit eindeutiger Beteiligung an Nahrungsaufnahme und Verdauung).

Sowohl *Input* als auch *Output* der *hugin*-Neuronen, die aufgrund einiger neuroanatomischer Eigenheiten in eine bisher nicht charakterisierte Klasse von Interneuronen fallen, passen sehr wohl in den Kontext einer Regulation der Nahrungsaufnahme. Vor diesem Hintergrund soll auch eine Rolle von *hugin* als Modulator des Fressverhaltens von *Drosophila*-Larven diskutiert werden.

4.2. Optische und genetische Methoden

Da ein systematischer Zugang zum *Drosophila*-ZNS über Methoden wie z.B. Elektrophysiologie schlecht möglich ist, sollte eine Analyse von P(9036)-mutanten im Vergleich zu wildtypischen Gehirnen optisch mit Hilfe von confokaler Fluoreszenz-Mikroskopie versucht werden. Jedoch stehen Antikörper gegen ZNS-spezifische Proteine, wie sie für möglichst spezifische Färbungen im ZNS benötigt werden, nur in sehr begrenztem Maße zur Verfügung und sind in der Herstellung zeitaufwendig und teuer. Seit der Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms stellen *InSitu*-Hybridisierungen gegen ZNS-spezifische Proteine wie z.B. Neuropeptide eine elegante Alternative dar. So bieten *InSitu*-Hybridisierungen (*InSitu*'s) nicht nur eine Möglichkeit zur schnellen und billigen Expressionsanalyse unbekannter Gene von Interesse, Neuropeptid-*InSitu*'s liefern auch sehr zellspezifische Markierungen für vergleichende Analysen von Wildtyp- und mutanten Gehirnen. Im Vergleich zu histochemischen *InSitu*'s ermöglichen Fluoreszenz-*InSitu*-Hybridisierungen die simultane Detektion mehrerer genspezifischer RNAs sowie die Kombination von RNA- und Protein-Detektion. Des Weiteren stellt die confokale Fluoreszenz-Mikroskopie neben der Multiphotonen-Mikroskopie die einzige Methode zur Generierung optischer Schnitte dar (Pawley, 1995), was wiederum Voraussetzung für detaillierte vergleichende Analysen von P(9036)-/wildtypischen Gehirnen mittels 3D-Modellierungen ist. Mit der Etablierung von Fluoreszenz-*InSitu*'s, auch in Kombination mit Proteindetektion, sowie der Auswertung entsprechender Mehrkanal-Färbungen mittels confokaler Fluoreszenz-Mikroskopie und 3D-Modellierung waren die methodischen Voraussetzungen zur systematischen Analyse des P(9036)-mutanten ZNS geschaffen.

Im ventralen Nervensystem (VNS) von *klu*-mutanten Embryonen war die Detektion fehlender bzw. duplizierter Neurone mit Hilfe von Antikörper-Färbungen möglich (Klein and Campos-Ortega, 1997; Yang et al., 1997), hier waren aber neben dem deutlich weniger komplexen Aufbau durch die klare Segmentierung des VNS zusätzliche Orientierungspunkte gegeben. Da jedoch Identität und genaue Lokalisation von „Fress“-Neuronen im larvalen *Drosophila*-ZNS bisher nicht bekannt sind, erwiesen sich generelle Markerproteine wie *elav* (als Marker für postmitotische Neuronen), *repo* (als Marker für Gliazellen) oder 22C10 (als Neuropil-spezifischer Marker) als vorerst zu unspezifisch. Daher wurden als spezifischere Färbemethode histochemische *InSitu*-Hybridisierungen für verschiedene Neuropeptid-Gene etabliert. Diese ermöglichen neben qualitativen Färbungen auch semiquantitative Vergleiche zwischen P(9036) und dem Wildtyp, da hier die Färbeintensität ein Maß für das Expressionsniveau des entsprechenden Gens darstellt. Semiquantitative Fluoreszenz-

InSitu's sind prinzipiell auch möglich, wurden aber noch nicht ausgearbeitet, da hier eine genaue Austarierung von Fluorochrom-Substratmenge, Inkubationsdauer etc. eine Färbung im linearen (nicht-gesättigten) Bereich sicherstellen muss. Daher wurde zur semiquantitativen Analyse auf herkömmliche histochemische *InSitu*-Hybridisierungen zurückgegriffen.

Neben dem Verlust bzw. der Verdopplung bestimmter Neuronen stellt fehlende oder veränderte Innervierung entsprechender Zielorgane eine weitere mögliche Ursache für den Fress-Phänotypen der P(9036)-Homozygoten dar. In dieser Hinsicht ermöglichen Promotor- und *enhancer trap*-Fliegen über die zellspezifische Expression axongängiger Markergene eine Analyse von Konnektivitätsmustern. Markergene der Wahl waren τ -GFP (Hidalgo et al., 1995) oder nSyb-GFP (Ito et al., 1998), aber auch cytoplasmatische Varianten von CFP oder YFP diffundieren bis zu einem gewissen Grad in Axone und Dendriten und ermöglichen so entsprechende Färbungen. Vergleich von Expressions- oder Konnektivitätsmustern zwischen Wildtyp und P(9036)-Mutanten erfordert jedoch langwieriges Einkreuzen entsprechender Expressionskonstrukte und Markergene in den P(9036)-mutanten Hintergrund. Dabei treten des öfteren Komplikationen wie Sterilität oder Lethalität durch die Kombination verschiedener Transgen-Konstrukte auf. Daher konnten erst in drei Fällen (*Okt30*, *GR21D1* und *InsP3*) stabile mehrfach-transgene Linien etabliert werden, welche entsprechende Expressionskonstrukte und Markergene im P(9036)-mutanten Hintergrund tragen. Die Auswertung dieser Linien sowie die Generierung weiterer mehrfach-transgener Linien stehen noch aus.

Weiter erschwert wird dieser Ansatz zur Analyse von P(9036)-Mutanten dadurch, dass sich „hausgemachte“ Expressionskonstrukte wie *InsP3* oder *hugS3* erst in der transgenen Fliege auf Funktionalität testen lassen. Erfolgreiches Generieren von Promotor-Fliegen bzw. Einkreuzen solcher Expressionskonstrukte in den zu untersuchenden mutanten Hintergrund ermöglicht jedoch schnelle und spezifische morphologische und auch physiologische Analysen, da artifizielle und endogene Promotoren derselben Regulation unterliegen sollten. Eine zusätzliche Anwendung von Expressionskonstrukten wie *InsP3* und *hugS3* ist das Ausschalten entsprechender Zellen bzw. Transkripten mittels der Expression von *reaper* (als Apoptose-Induktor) oder RNA-Interferenz-Konstrukten. Dies ist besonders wertvoll, wenn keine klassischen (z.B. P-Element-induzierten) Mutanten zur Verfügung stehen, und die Funktion eines entsprechenden Gens zunächst in der wildtypischen *knock out*-Situation getestet werden soll. Neben einem Zell- und Transkript-*knock out* lässt sich mit Hilfe von Promotor-Fliegen auch spezifisch die Signalübertragung in Neuronen blockieren. Die Expression von *shibire^{ts}* ermöglicht

temperatursensitive reversible Blockierung des Vesikel-Recycling und so der Signalübertragung in entsprechenden Synapsen, während durch Expression von *TeTxLC* (*Tetanus Toxin Light Chain*) die stimulierte Ausschüttung von Neurotransmittern inhibiert werden kann. TeTxLC spaltet die neuronale Form von Synaptobrevin, einem Ankerprotein auf Vesikelmembranen, welches für die Fusion von Vesikel- und Zell-Membran benötigt wird (Sweeney et al., 1995). Lassen sich so Kenntnisse über die Funktion bestimmter Gene oder Neuronen im Wildtyp erarbeiten, so sollte auch die P(9036)-mutante Situation besser analysierbar sein.

4.3. Genomweite molekularbiologische Methoden

Als Ergänzung zur spezifischen, Mikroskopie-basierten Suche nach morphologischen Defekten im Zentralnervensystem der P(9036)-Mutanten wurde auch unspezifisch im gesamten mutanten Organismus nach physiologischen Defekten gesucht. DNA-Microarrays lieferten hier die Möglichkeit des genomweiten Vergleichs von Expressionsprofilen in P(9036)-Mutanten und Wildtyp-Larven. Dadurch konnten nicht nur potenzielle Zielgene des Transkriptionsfaktors *klumpfuss* ermittelt werden, sondern auch Kenntnisse über physiologische Aspekte wie in P(9036)-Mutanten betroffene Stoffwechselwege erlangt werden. Da bereits eine Fülle von wildtypischen Expressionsprofilen unter verschiedenen Hungerbedingungen zur Verfügung steht, konnten durch entsprechende Vergleiche z.B. eine Reihe von potenziellen *klu*-Zielgenen mit dem durch den Fress-Phänotypen ausgelösten Hungerzustand der P(9036)-Larven in Verbindung gebracht werden. So entspricht bis auf wenige Ausnahmen die Regulation potenzieller *klu*-Zielgene in den P(9036)-Mutanten der Regulation in Wildtyp-Larven unter Hungerbedingungen. Das könnte darauf hinweisen, dass *klumpfuss* neben seiner Rolle in der Neurogenese eine weitere physiologische Rolle in der Vermittlung von Hungerantworten spielt. In diesem Kontext sei auch zu erwähnen, dass wildtypisch die Transkription von *klu* sowohl in Larven als auch in Adulten unter Hungerbedingungen hochreguliert ist (Melcher, 2001). Vor allem diese Regulation in Adulten lässt auf eine weitere Rolle von *klu* im Stoffwechsel schließen, da hier keine Neurogenese mehr stattfinden sollte. Um jedoch eine solche hypothetische Rolle des Transkriptionsfaktors *klu* bei der Vermittlung von Hungerantworten zu untermauern, werden weitere Experimente wie detailliertere Expressionsprofilierungen, extensivere Auswertungen solcher Expressionsprofile oder auch Promotoranalysen entsprechender Gene nötig sein. Nützliche Hinweise könnte hier auch der Vergleich von Expressionsprofilen der P(9036)-Mutanten mit P(6913)-Mutanten liefern (siehe Anhang).

Neben der Suche nach potenziellen Zielgenen von *klu* dienten die Microarrays auch der Suche nach weiteren Markern für ZNS-spezifische Färbungen und somit zur Komplementierung der morphologischen Analyse des P(9036)-Mutanten. Neuropeptid-Gene erwiesen sich wiederum als erste Wahl, da durchaus einige bekannte Neuropeptide ein dereguliertes Expressionsniveau in den P(9036)-Mutanten aufwiesen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass das absolute Expressionsniveau von solchen nur in wenigen Zellen exprimierten Genen relativ zur Gesamt-RNA sehr gering ist. Deshalb kann diese Regulation auf den Affymetrix®-Microarrays nicht als statistisch gesichert angesehen werden (die entsprechenden Gene erhielten bei der Affymetrix®-Auswertung auch keine *I*- oder *D*-Bewertungen).

Verifikation der Deregulation für zumindest zwei der gefundenen Neuropeptide durch semiquantitative *InSitu*-Hybridisierungen untermauert aber die Affymetrix®-Daten. Beide Neuropeptide sind funktionell bisher uncharakterisiert, weisen aber im Kontext der Regulation von Nahrungsaufnahme interessante Aspekte auf. So gilt das *akh* (*adipokinetik hormone*) als funktionelles Homologes des Vertebraten-Glukagons, wird aber mit der Ringdrüse in einem noch schwieriger zugänglichen Organ als dem ZNS exprimiert. Da in einem ersten Versuch auch kein funktioneller *akh*-Promotor kloniert werden konnte (eine transgene Fliege für ein potenzielles *akh*-Promotorkonstrukt erwies sich als nicht funktionell), wurde bisher auf weitere Analysen von *akh* verzichtet.

Das ebenfalls funktionell uncharakterisierte *hugin* wird im suboesophagealen Ganglion (SOG) exprimiert, einem Teil des ZNS mit gesicherter Beteiligung an der Regulation der Nahrungsaufnahme. So liegen neben den Projektionsfeldern von Geschmackssensillen (Stocker and Schorderet, 1981) auch die dendritischen Felder von pharyngealen Motorneuronen sowie die Projektionsfelder des stomatogastrischen Nervensystems (Singh, 1997) im SOG. Wie gezeigt werden konnte, wird die Expression von *hugin* nicht nur im Wildtyp in Abhängigkeit von Nahrungssignalen reguliert, sondern auch in der Fressmutanten P(9036) anti-wildtypisch reguliert. Die *hugin*-Deregulation konnte auch in der P(6913)-Mutanten, einer weiteren fressmutanten Linie, nachgewiesen werden. Diese stellt aufgrund ihres primären Defekts im Fettkörper der Larve eine ideale Ergänzung zur P(9036)-Linie dar, da beide Linien denselben Phänotypen aufweisen, einmal aber das ZNS und einmal ein peripheres Organ betroffen ist. Wie in Abbildung 4.2 modellhaft dargestellt mag die in beiden Fällen detektierte Deregulation der *hugin*-Expression entweder sekundär als Folge des Fress-Phänotyps auftreten, oder aber *hugin* vermittelt primär als Teil einer auf unterschiedlichen Stufen gestörten Signalkaskade den Fress-Phänotypen (oder auch andere Aspekte der mutanten Phänotypen).

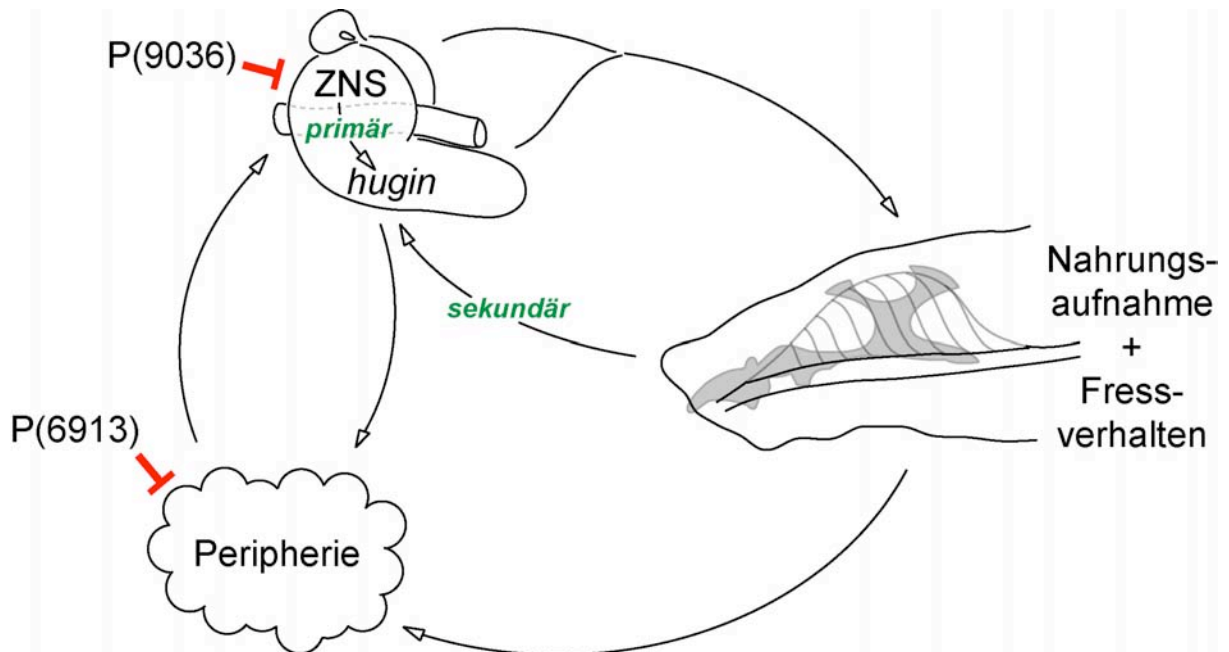


Abbildung 4.2 Modellhafte Darstellung der Zusammenhänge von *hugin* und Nahrungsaufnahme in P(9036) und P(6913).

Die beiden Fressmutanten P(9036) und P(6913) zeigen mit einem Stopp der Nahrungsaufnahme im ersten Larvalstadium denselben Phänotypen. Einmal ist mit dem Fettkörper der Larve (in der P(6913)-Mutante) ein peripheres Organ betroffen, das andere Mal das Zentralnervensystem (ZNS, in der P(9036)-Mutante). Im Fall der P(6913)-Mutante mag es wahrscheinlich sein, dass das ZNS nie entsprechende Hunger-Signale aus der Peripherie erhält (Zinke et al., 1999), während im Fall der P(9036)-Mutante das ZNS vorhandene Hunger-Signale möglicherweise falsch verarbeitet. In beiden Fällen könnte *hugin* als Bestandteil einer Signalkaskade, über welche das Fressverhalten reguliert wird, den Fress-Phänotyp auslösen. Oder aber der unabhängig von *hugin* induzierte Fress-Phänotyp führt sekundär zu einer Deregulation von *hugin*.

4.4. Die Rolle von *hugin* in der Ecdysis-Modifikation

Funktionell ist das Neuropeptid-Gen *hugin* bisher uncharakterisiert, wohl aber ist bekannt, dass *hugin* für mindestens zwei aktive Peptide kodiert. Eines der Peptide, *hugin γ* zeigt Sequenzhomologien zu dem häutungsmodifizierenden *eth* (*ecdysis triggering hormone*), während das andere, Drm-PK-2 ein Muskel-stimulierendes Peptid zu sein scheint. Für beide Peptide sind keine endogenen Rezeptoren bekannt, beide binden aber mit relativ hoher Affinität an den Rezeptor CG8795 (Park et al., 2002b). CG8795, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit uncharakterisierter Funktion und unbekanntem Expressionsmuster bindet auch andere *Drosophila*-Neuropeptide wie CAP2b-3 und ETH1. Die von *hugin* codierten Drm-PK-2 und *hugin γ* scheinen Antagonisten für einen von CG8795 codierten Rezeptor zu sein (Park et al., 2002b).

Sowohl CAP2b-3 als auch ETH1 spielen ihre Rolle im Häutungsverhalten der *Drosophila*-Larven, welches über die ZNS-Ringdrüsenachse reguliert wird. Die aufgezeigte Innervierung der Ringdrüse durch *hugin*-Neurone sowie die Sequenz-Homologien zwischen *hugin* und ETH passen durchaus in diesen Kontext, wobei die Ringdrüse aber auch Metabolismus und Nahrungsaufnahme über das Insulin/Glukagon-System zu regulieren scheint. Eine Verbindung solcher Ecdysis-Regelkreise mit Metabolismus-Regelkreisen mag aber durchaus auch sinnvoll erscheinen, da die larvalen Häutungen als *checkpoints* der Entwicklung nur passiert werden sollten, wenn auch adäquate Nahrungsaufnahme und Wachstum stattgefunden haben.

Der auffälligste Phänotyp sowohl der hier beschriebenen *hugin-knock outs* als auch der *hugin*-Überexpressionslarven (Meng et al., 2002) ist Lethalität bei der Häutung. Der Häutungsprozess ist ein Zusammenspiel mehrerer Neuropeptide (u.a. EH, ETH, Juvenilhormon und Ecdyson) mit komplexen Bewegungsmustern (Park et al., 2002a). Dabei sind es die Neuropeptide, welche durch zeitlich genau aufeinander abgestimmte Expression und Sekretion eine Reihe morphologischer, physiologischer und Verhaltensvorgänge regulieren. Ein Zuviel oder Zuwenig an einem dieser Peptidhormone mag das komplexe System aus dem Gleichgewicht bringen und so den detektierten Häutungsphänotypen erklären.

Die anatomische Heterogenität der *hugin*-Neurone macht jedoch eine detaillierte funktionelle Analyse mittels *knock out*- oder Überexpressionsexperimenten sehr schwierig. So scheint im Kontext der Ecdysis z.B. die Interpretation der Pilzkörper- und Darm-Innervierung durch *hugin*-Neurone wenig sinnvoll, da hier bisher keinerlei Verbindung zum Häutungsprozess bekannt ist. Weiter kompliziert werden solche Experimente und deren Interpretation auch durch die neurochemische Heterogenität der *hugin*-Zellen. So kodiert *hugin* nicht nur für mehrere verschiedene Signalpeptide, sondern wird auch mit *Tyrosin-Hydroxylase* (dem Schlüsselenzym der Dopamin-Synthese) koexprimiert. Dass ein Teil der *hugin*-Neurone potenziell dopaminerg ist, kann einerseits noch nicht als endgültig gesichert gelten, da bereits eine falsch positive Markierung von einigen nicht-dopaminergen Neuronen durch die *TH*-Fliegenlinie gezeigt wurde (Friggi-Grelin et al., 2002). Eine immunhistochemische α -Dopamin-Färbung zur Verifikation dieses vorläufigen Ergebnisses konnte bisher noch nicht ausgearbeitet werden. Andererseits wäre Koexpression eines Neuropeptid-Genes in Neuronen, welche zudem distinkte Neurotransmitter nutzen, aber nicht nur im Kontext einer Ecdysis-Regulation schwer zu interpretieren. Könnte jedoch verifiziert werden, dass ein Teil der *hugin*-Neuronen dopaminerg ist, so wäre interessant zu wissen, welche der verschiedenen Zielorgane von diesen doppelpositiven Zellen innerviert werden. Des Weiteren wären sicher auch

immunhistochemische Färbungen für andere Neurotransmitter wie Oktopamin, Serotonin oder GABA im Vergleich zu *hugin*-Färbungen interessant, da einige dieser Neurotransmitter bekanntermaßen in SOG-Neuronen zu finden sind (Monastirioti, 1999; Python and Stocker, 2002).

4.5. Die Rolle von *hugin*-Neuronen in der Geschmacksverarbeitung

Die Neuroanatomie der *hugin*-Neurone, welche Dendriten ins suboesophagiale Ganglion (SOG) sowie Axone in die Pilzkörper entsenden, lässt sich nicht im Zusammenhang mit den beschriebenen Häutungsphänotypen interpretieren. Wohl aber ist eine Interpretation im Kontext des physiologischen Ergebnisses, dass *hugin* in Abhängigkeit von sensorischem *Input* reguliert wird, möglich. Eine Rolle von *hugin*-Neuronen als olfaktorische Projektionsneurone kann dabei mehr oder weniger ausgeschlossen werden. Die Morphologie solcher Interneuronen, welche Geruchsinformation von den Antennalloben über *iACT* und *äACT* (*innerer* und *äusserer Antennocerebraler Trakt*) zur ipsilateralen Pilzkörper-Calyx und zum lateralen Horn weiterleiten, ist im Detail bekannt (Stocker et al., 1997). Im Gegensatz dazu projizieren *hugin*-Neurone über eine median des *iACT* gelegene Bahn nicht nur zum ipsilateralen, sondern nach Kreuzen der Mittellinie auch zum contralateralen Pilzkörper. Des weiteren treten die *hugin*-Axone nicht wie die der olfaktorischen Projektionsneurone mittig in die Pilzkörper-Calyces ein, sondern innervieren diese eher von dorsal. Diese Charakteristika unterscheiden die *hugin*-Neurone und deren Konnektivität bereits wesentlich von klassischen olfaktorischen Projektionsneuronen. Wichtigster Unterschied ist zudem, dass *hugin*-Afferenzen nicht die Antennalloben innervieren, sondern bisher nicht weiter charakterisierte Glomeruli im suboesophagialen Ganglion. Diese könnten die von N. Singh als dorsoanteriore SOG-Glomeruli beschriebenen Strukturen sein (Singh, 1997). Die besagten Glomeruli werden zudem wie gezeigt von potenziellen Geschmackssinnesneuronen innerviert. Auf physiologischer Ebene konnte eine Rolle der *hugin*-Neuronen als gustatorische Projektionsneurone mittels Geschmackspräferenz-Tests an *knock out*-Larven noch nicht bestätigt werden. In Anlehnung an die Geschmackskodierung bei Vertebraten (in *süß*, *salzig*, *sauer*, *bitter* und *umami*) wurden aber bisher erst zwei Geschmacksrichtungen getestet. Ebenso wenig gilt es als endgültig gesichert, dass Geschmack bei Insekten überhaupt über diese fünf Grund-Geschmacksrichtungen wahrgenommen und kodiert wird (Scott et al., 2001). Möglicherweise könnten sich Geschmackstests mit einzelnen Futterkomponenten anstatt klassischer

Geschmacksstoffe als aufschlussreich erweisen. Des weiteren erschwert wiederum die anatomische Heterogenität und die mögliche Involvierung in andere physiologische Prozesse wie Ecdysis solche Geschmackstests. Eine mögliche Vereinfachung wäre auch hier die Expression des temperaturabhängig mutanten *shibire*-Proteins in den *hugin*-Zellen. Eine Entwicklung auf permissiver Temperatur bis kurz vor den Geschmackstest stellte dann die wildtypische *hugin*-Funktion sicher, während der reversible, funktionelle *knock out* nur während der entsprechenden Testphase auf restriktiver Temperatur erfolgen würde.

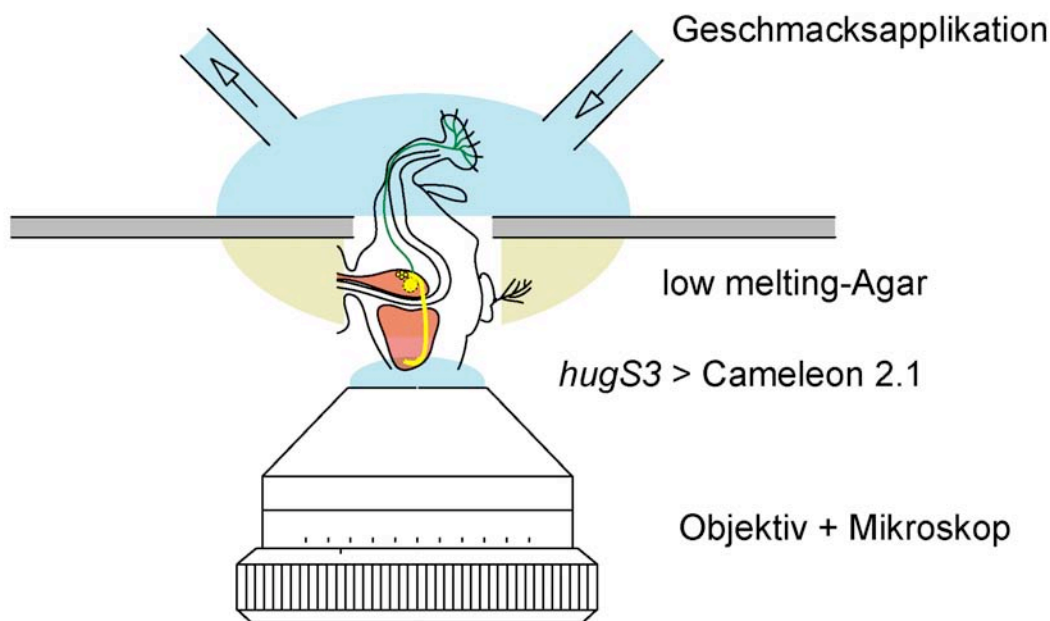


Abbildung 4.3 Modellhafter Versuchsaufbau zum Ca^{2+} -Imaging in *hugin*-Neuronen.

Calcium-Indikatoren wie *Cameleon2.1* (Miyawaki et al., 1999) lassen sich in *hugin*-Neuronen, welche auch in der Adulten zu den Pilzkörpern projizieren, exprimieren. Bietet man einem Fliegenkopf des entsprechenden Genotyps, welcher mit Agar am Objektträger befestigt ist, einen adäquaten Geschmack (in wässriger Lösung) an, so sollten sich in *hugin*-Axonen Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzsignale detektieren lassen, falls *hugin*-Neurone tatsächlich gustatorische Projektionsneurone darstellen. Mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wurde Ca^{2+} -Imaging in Abhängigkeit von olfaktorischem *Input* realisiert (Fiala et al., 2002).

Eine andere elegante Möglichkeit, eine Rolle der *hugin*-Neuronen als gustatorische Projektionsneurone zu testen, wäre die Expression Calcium-sensitiver Fluorochrome in selbigen Zellen. Damit könnten Funktionstests unter *hugin*-wildtypischen Bedingungen durchgeführt werden, wobei Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzsignale auf distinkte Geschmacks-*Inputs* hin einen direkten Beweis darstellen sollten. Da *hugin*-

Expression bzw. Aktivität des *hugS3*-Promotorkonstruktes auch in *Drosophila*-Adulten gegeben ist, sollte eine mehr oder weniger direkte Adaption der bereits etablierten Systeme für Geruchstests (Fiala et al., 2002; Wang et al., 2002) möglich sein. Ein entsprechender Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.3 modellhaft dargestellt.

4.6. *hugin*-Neurone als modulatorische Neurone

Die Interpretation der Neuroanatomie und Neurochemie der *hugin*-Neuronen lässt neben einer Rolle als gustatorische Projektionsneurone noch eine weitere Möglichkeit zu. So ist von der Honigbiene *Apis mellifera* ein im suboesophagealen Ganglion (SOG) gelegenes oktopaminerges Neuron bekannt (Hammer, 1993). Neben Dendriten im SOG entsendet dieses Neuron Axone in andere Gehirnregionen wie die Pilzkörper. Diesem unpaaren V_{um} -Neuron (*Ventral unpaired median*-) wird die Rolle eines modulatorisch agierenden Neurons mit elementarem Einfluss auf geruchs- und geschmacksassoziiertes Lernen und Verhalten zugeschrieben (Hammer, 1993; Hammer, 1997). Ob *hugin*-Neurone eine vergleichbare Rolle bei geschmacks- bzw. geruchsassoziertem Lernen in *Drosophila*-Larven spielen, ließe sich möglicherweise durch Anwendung adäquater Lernparadigmen (Gerber et al., 2003; Scherer et al., 2003) auf *hugin-knock out*-Larven testen.

Es scheint aber durchaus möglich, dass *hugin* eine Rolle als Modulator des Fressverhaltens spielt, sei es nun über eine modulatorische Rolle im geschmacksassozierten Verhalten bzw. Lernen oder über eine Rolle in gustatorischen Projektionsneuronen. So lässt sich in einem in Abbildung 4.4 dargestellten Modell durchaus das Expressionsniveau von *hugin* mit dem Fressverhalten (bzw. mit der Aktivität der Nahrungsaufnahme) korrelieren. Dabei ist zwar nicht geklärt, ob das Fressverhalten *hugin* beeinflusst oder umgekehrt (siehe auch Abbildung 4.2), dennoch geht ein normales *hugin*-Expressionsniveau einher mit normalem Fressverhalten (zu sehen in normal gefütterten Wildtyp-Larven). Hingegen tritt ein Stopp der Nahrungsaufnahme zusammen mit erhöhtem *hugin*-Expressionsniveau auf (wie in den Fressmutanten P(9036) und P(6913) zu sehen). Geht man nun noch davon aus, dass gehungerte Wildtyp-Larven ihr Fressverhalten, also die Nahrungsaufnahme überaktivieren müssen (auf der Suche nach adäquater Nahrung zur Sicherstellung von normalen Wachstums- und Entwicklungsraten), so korreliert dies mit einem erniedrigten *hugin*-Expressionsniveau.

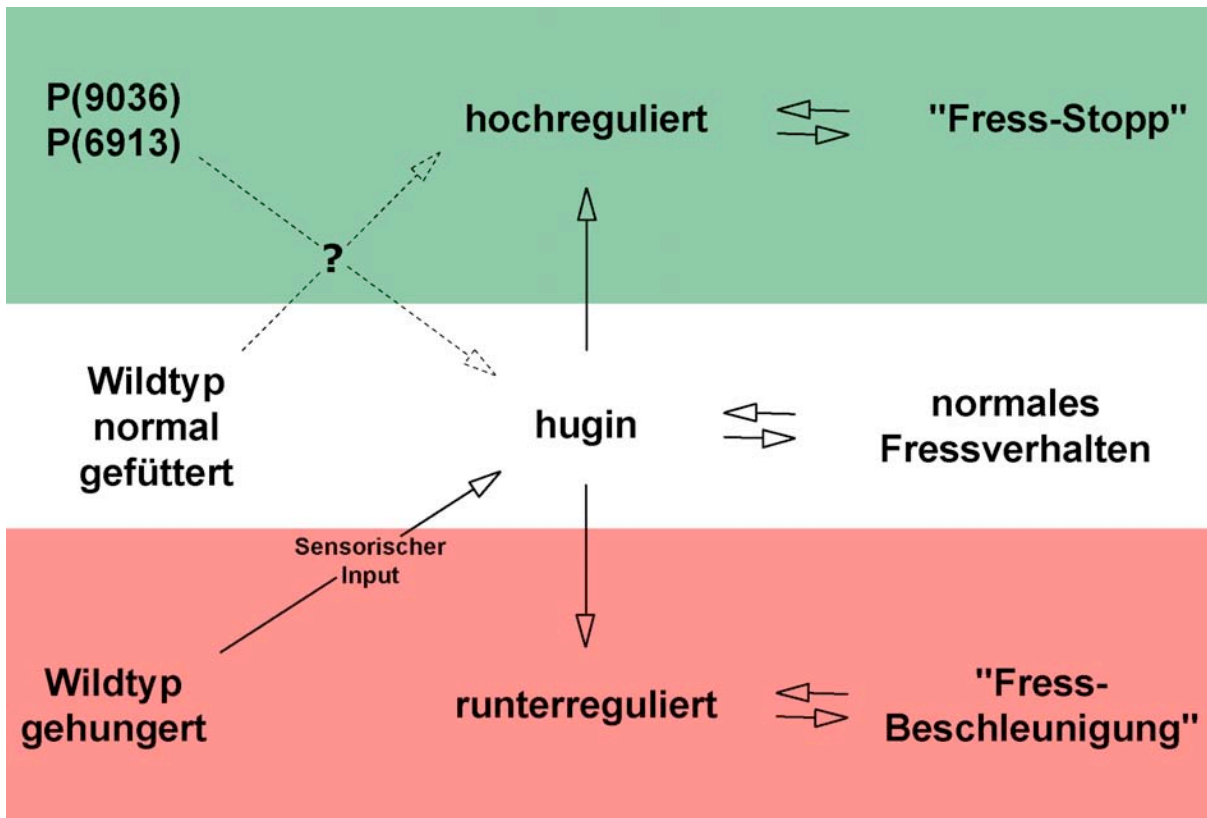


Abbildung 4.4 Modell zur Korrelation des *hugin*-Expressionsniveaus mit dem Fressverhalten.

Wie in normal gefütterten Wildtyp-Larven detektierbar entspricht hier ein normales Fressverhalten einem bestimmten (normalen) *hugin*-Expressionslevel. In den Fressmutanten P(9036) und P(6913), welche einen Stopp der Nahrungsaufnahme zeigen, entspricht dies einer erhöhten *hugin*-Expression. Gehungerte Wildtyp-Larven, welche hyperaktiv nach Nahrung suchen (also quasi ihr Fressverhalten überaktivieren), zeigen wiederum ein erniedrigtes *hugin*-Expressionsniveau. Gehungerte Wildtyp-Larven, welchen durch entsprechenden sensorischen *Input* das Vorhandensein einer Nahrungsquelle signalisiert wird, zeigen infolge dessen wieder ein normales *hugin*-Level. Ob in all diesen Fällen *hugin* das Fressverhalten beeinflusst oder umgekehrt das Fressverhalten die *hugin*-Expression, bleibt zunächst offen (siehe Doppelpfeile). Jedoch sollte sich eine daraus abgeleitete Hypothese, dass „zuviel *hugin*“ einen Fress-Stopp bzw. „zuwenig *hugin*“ eine Fress-Beschleunigung bewirkt, mit Hilfe von *hugin-knock down*- und *hugin*-Überexpressionsexperimenten testen lassen. So sollte nämlich *hugin*-Überexpression in wildtypischen Larven einen Fress-Stopp induzieren, während ein Erniedrigen des *hugin*-Levels in den P(9036)- und P(6913)-Mutanten dessen Fress-Phänotyp abschwächen oder aufheben sollte (siehe gestrichelte Pfeile mit Fragezeichen).

Sensorischer *Input* (SI) mag in dieser Situation das Vorhandensein einer adäquaten Nahrungsquelle signalisieren, was die Normalisierung des Fressverhaltens sowie des *hugin*-Expressionsniveaus zur Folge hat.

Dieses Modell sollte sich in nächster Zukunft leicht testen lassen, ermutigt es doch zur Vorhersage eines „Fress-Stopps“ in Wildtyp-Larven, in welchen das Expressionsniveau von *hugin* ektopisch erhöht wird. Des weiteren sollten dann auch die Fressmutanten P(9036) und P(6913) bei artifiziell erniedrigtem *hugin*-Level ein normales (oder zumindest normaleres) Fressverhalten zeigen. In beiden Fällen müsste wiederum vorausgesetzt werden, dass *hugin* primär an der Vermittlung einer entsprechenden Signalkaskade beteiligt ist und nicht nur sekundär als Folge einer erzwungenen Änderung des Fressverhaltens in Fressmutanten und Wildtyp reguliert wird (siehe auch Abbildung 4.2).

Ob sich möglicherweise über adäquate Verhaltenstests eine Rolle von *hugin* bzw. den *hugin*-Neuronen als generelle Modulatoren des Lern- oder Fressverhaltens oder über Ca^{2+} -*Imaging* eine Rolle als gustatorische Projektionsneurone verifizieren lässt, auf jeden Fall wurde mit *hugin* ein Neuropeptid-Gen näher beschrieben, welches wildtypisch in Abhängigkeit von Nahrungssignalen reguliert wird und in den Fressmutanten P(9036) und P(6913) dereguliert ist. Des weiteren konnte möglicherweise eine neue Klasse von Projektionsneuronen beschrieben und neuroanatomisch charakterisiert werden. Die physiologischen Aspekte sowie die im Kontext der Regulation von Nahrungsaufnahme durchaus interessanten Projektionsziele der *hugin*-Neurone lassen hoffen, über weitere Analysen die Fressmutanten *klumpfuss* (*klu*, P(9036)) und *pumpless* (*ppl*, P(6913)) besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang sollten auch generelle Mechanismen, über welche Nahrungsaufnahme, Wachstum und Entwicklung reguliert werden, weiter durchleuchtet werden können.

5. Literatur

- Adams, M. D., Celniker, S. E. and Holt, R. A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2196.
- Britton, J. S. and 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.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R. and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11, 213-21.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J. and Leopold, P. (2003). A Nutrient Sensor Mechanism Controls *Drosophila* Growth. *Cell* 114, 739-749.
- de Bruyne, M., Schwarz, S. J., Wendt, M. and Carlson, J. R. (2003). The Gr21a receptor and Carbon Dioxide perception in *Drosophila melanogaster*. EDRC Abstract Book, EuroFly 2003 Göttingen.
- Demerec, M. (1994). *Biology of Drosophila*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J.-M., Buchner, E. and Galicia, C. G. (2002). Genetically Expressed Cameleon in *Drosophila melanogaster* Is Used to Visualize Olfactory Information in Projection Neurons. *Curr Biol* 12, 1877-1884.
- Friggi-Grelin, F., Coulom, H., Meller, M., Gomez, D., Hirsh, J. and Birman, S. (2002). Targeted Gene Expression in *Drosophila* Dopaminergic Cells Using Regulatory Sequences from Tyrosine Hydroxylase. *J Neurobiol* 54, 618-627.
- Gan, W.-B., Bishop, D. L., Turney, S. G. and Lichtman, J. W. (1999). Vital imaging and ultrastructural analysis of individual axon terminals labeled by iontophoretic application of lipophilic dye. *Journal of Neuroscience Methods* 93, 13-20.
- Garofalo, R. S. (2002). Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13, 156-162.
- Gelperin, A. (1967). Stretch receptors in the foregut of the blowfly. *Science* 157, 208-210.
- Gendre, N., Lüer, K., Friche, S., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Technau, G. M. and Stocker, R. F. (2003). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development* 131, 83-92.

Gerber, B., Scherer, S., Diegelmann, S., Michels, B., Hendel, T., Neuser, K., Godenschwege, T. A., Schwaerzel, M., Zars, T., Stocker, R. F. et al. (2003). Associative learning in individually assayed *Drosophila* larvae. EDRC Abstract Book, EuroFly 2003 Göttingen.

Hammer, M. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366, 59-63.

Hammer, M. (1997). The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci* 20, 245-52.

Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Haberlin, C. and Stocker, R. F. (1999). Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: toxin expression studies in chemosensory neurons. *J Neurosci* 19, 6599-609.

Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S. and Byers, D. (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* 2, 1-30.

Hertweck, H. (1932). Anatomie und Variabilität des Nervensystems und der Sinnesorgane von *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 130, 560-663.

Hidalgo, A., Urban, J. and Brand, A. H. (1995). Targeted ablation of glia disrupts axon tract formation in the *Drosophila* CNS. *Development* 121, 3703-3712.

Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K. and 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, 1293-300.

Ito, K., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D. and Strausfeld, N. J. (1998). The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5, 52-77.

Klein, T. and Campos-Ortega, J. A. (1997). *klumpfuss*, a *Drosophila* gene encoding a member of the EGR family of transcription factors, is involved in bristle and leg development. *Development* 124, 3123-34.

Marin, E. C., Jefferis, G. S., Komiyama, T., Zhu, H. and Luo, L. (2002). Representation of the Glomerular Olfactory Map in the *Drosophila* Brain. *Cell* 109, 243-255.

Melcher, C. (2001). Von Klumpfüßen und armen Schluckern: Identifizierung und Charakterisierung von *klumpfuss* (*klu*) als Ursache der Wachstums- und Entwicklungsstörungen in der P(9036)-Linie von *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit* Uni (TH) Karlsruhe.

Meng, X., Wahlstrom, G., Immonen, T., Kolmer, M., Tirronen, M., Predel, R., Kalkkinen, N., Heino, T. I., Sariola, H. and Roos, C. (2002). The *Drosophila*

- hugin gene codes for myostimulatory and ecdysis-modifying neuropeptides. *Mech Dev* 117, 5-13.
- Misquitta, L. and Paterson, B. M. (1999). Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA -i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1451-6.
- Mitchell, B. K., Itagaki, H. and Rivet, M. P. (1999). Peripheral and central structures involved in insect gustation. *Microsc Res Tech* 47, 401-15.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. and Tsien, R. Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2135-2140.
- Monastiriotti, M. (1999). Biogenic Amine Systems in the Fruit Fly *Drosophila Melanogaster*. *Microsc Res Tech* 45, 106-121.
- Nijhout, H. F. (1994). *Insect Hormones*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Park, Y., Filippov, V., Gill, S. S. and Adams, M. E. (2002a). Deletion of the ecdysis triggering hormone gene leads to lethal ecdysis deficiency. *Development* 129, 493-500.
- Park, Y., Kim, Y.-J. and Adams, M. E. (2002b). 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.
- Pawley, J. B. (1995). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York: Plenum Press.
- Python, F. and Stocker, R. F. (2002). Immunoreactivity Against Choline Acetyltransferase, γ -Aminobutyric Acid, Histamine, Octopamine, and Serotonin in the Larval Chemosensory System of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 453, 157-167.
- Robinow, S., Campos, A.R., Yao, K.-M., White, K. (1988). The elav gene product of *Drosophila*, required in neurons, has three RNP consensus motives. *Science* 242, 1570-72.
- Rulifson, E. J., Kim, S. K. and Nusse, R. (2002). Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes. *Science* 296, 1118-1120.
- Scherer, S., Stocker, R. F. and Gerber, B. (2003). Olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae. *Learn Mem* 10, 217-25.
- Scott, K., Brady, R., Jr., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C. and Axel, R. (2001). A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* 104, 661-73.

- Siegmund, T. and Korge, G. (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 431, 481-91.
- Singh, N. R. (1997). Neurobiology of the Gustatory systems of *Drosophila* and Some Terrestrial Insects. *Microsc Res Tech* 39, 547-563.
- Stocker, R. F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275, 3-26.
- Stocker, R. F., Heimbeck, G., Gendre, N. and de Belle, J. S. (1997). Neuroblast ablation in *Drosophila* P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons. *J Neurobiol* 32, 443-56.
- Stocker, R. F. and Schorderet, M. (1981). Cobalt filling of sensory projections from internal and external mouthparts in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 216, 513-523.
- Sweeney, S. T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H. and O'Kane, C. J. (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14, 341-351.
- Voie, A.-M. and Cohen, S. (1998). Germ-line transformation of *Drosophila melanogaster*. In *CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK*, vol. 3, pp. 510-517. San Diego: Academic Press.
- Vosshall, L. B., Wong, A. M. and Axel, R. (2000). An Olfactory Sensory Map in the Fly Brain. *Cell* 102, 147-159.
- Wang, J. W., Axel, R., Flores, J. and Wong, A. M. (2002). Visualizing an olfactory map with two-photon microscopy and a genetic calcium probe. NeuroFly Abstract Book, NeuroFly 2002 Dijon/F.
- Wigglesworth, V. B. (1934). The physiology of ecdysis in *Rhodnius proxilus*. II. Factors controlling molting and 'metamorphosis'. *Quart. J. Microsc. Sci.* 77, 191-222.
- Wong, A. M., Wang, J. W. and Axel, R. (2002). Spatial Representation of the Glomerular Map in the *Drosophila* Protocerebrum. *Cell* 109, 229-241.
- Xiong, W. C., Okano, H., Patel, N. H., Blendy, J. A. and Montell, C. (1994). repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes Dev* 8, 981-94.
- Yang, X., Bahri, S., Klein, T. and Chia, W. (1997). Klumpfuss, a putative *Drosophila* zinc finger transcription factor, acts to differentiate between the identities of two secondary precursor cells within one neuroblast lineage. *Genes Dev* 11, 1396-408.
- Zinke, I., Kirchner, C., Chao, L. C., Tetzlaff, M. T. and Pankratz, M. J. (1999). Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development* 126, 5275-84.

Zinke, I., Schutz, C. S., Katzenberger, J. D., Bauer, M. and Pankratz, M. J. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *Embo J* 21, 6162-73.

6. Anhang

6.1. Neuropeptid-Sequenzvergleiche

Dargestellt sind hier jeweils die Namen der Neuropeptide /Neurohormone /Peptidhormone, die als Vorlage verwendet wurden (fett gedruckt mit Namen der Spezies in Klammern) sowie die Aminosäuren-Sequenz dieser Vorlagen im Ein-Buchstaben-Code. Des weiteren sind die Ergebnisse des Sequenzvergleichs dargestellt mit den ähnlichen Bereichen der Vorlage (*Query*), den konservierten bzw. ähnlichen (+) Aminosäuren und den Such-Ergebnissen (*Sbjct*, aus einer Datenbank aller vorhergesagten *Drosophila*-Proteine). Zusätzlich sind die CG-Nummern bzw. Namenskürzel der jeweiligen Such-Ergebnisse mit kompletter Aminosäuren-Sequenz aufgeführt.

- **PEPTIDE YY [HOMO SAPIENS].**

MVFVRRPWPA LTTVLLALLV CLGALVDAYP IKPEAPREDA SPEELNRYYA SLRHYLNLVLT
RQRYGKRDPG DTLSSKTFPP DGEDRPVRSR SEGPDLW

QUERY: 37 REDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRYGKRDPDTLLS---KTFPPDGEDRPVRSRS 91
RE A P + + + R R+G+ D PD L S K +F D +P+RS S
SBJCT: 69 REYAGPVVFPNHQVERKAQRSPSLRLRFGRSD-PDMLNSIVEKRWFGDVNQKPIRSPS 125

CG13968

MFHLKRELSQGCALALICLVSLQMQPAQAEVSSAQGEHLVQPPPEKQSS
KDSFLGTPLSNLYDNLLQREYAGPVVFPNHQVERKAQRSPSLRLRFGRSD
PDMLNSIVEKRWFGDVNQKPIRSPSLRLRFGRDPSPQMRRRTAYDDLLE
RELTLNSQQQQQLGTEPDSDLGADYDGLYERVVVRKQRLRWGRSVPOFE
ANNADNEQIERSQWYNSLNSDKMRRMLVALQQQYEIPENVASYANDEDT
DTDLDNDTSEFQREVRKPMRLRWGRSTGKAPSEKHTPEETSSIPPKTQN

- **PANCREATIC POLYPEPTIDE [HOMO SAPIENS].**

MAAARLCLSL LLLSTCVALL LQPLLGAQGA PLEPVYPGDN ATPEQMAQYA ADLRRYINML
TRPRYGRHK EDTLAFSEWG SPHAAVPREL SPLDL

QUERY: 42 TPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRYGRHKEDTLAFSEWGSPhAAVPRE 89
TPE+M +Y ++ ++ Y K D W + P E
SBJCT: 21 TPEEMKKGYSVMKNRKDVTLSEYDKVKSVD---IENWENKRGPRPWE 65

CG14865

MMVAGSFGLOOYQYAKKQPVTPEEMKKGYSVMKNRKDVTLSEYDKVKSVD
DIENWENKRGPRPWEQEDQPTTAKH

- **NEUROPEPTIDE Y [HOMO SAPIENS].**

MLGNKRLGLS GLTLALSLLV CLGALAEAYP SKPDNPGEDA PAEDMARYYS ALRHYINLIT
RQRYGKRSSP ETLISDLLMR ESTENVPRTR LEDPAMW

QUERY: 27 EAYPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENV 86
EA S+P + D ++ L Y R R+GKR S + D+L +N+
SBJCT: 25 EASNSRPPRKNVNTMADAYKFLQDLDTYYGDRARVRFGRSGS----LMDILRNHEMDNI 80

CG10342 / NPF

MCQTMRCILVACVALALLAAGCRVEASNSRPPRKNVNTMADAYKFLQDL
DTYYGDRARVRFGRSGSLMDILRNHEMDNINLGKNANNGGEFARGFNREEE
IF

• **INSULIN PRECURSOR. (FISH)**

MAALWLQAFS LLVLMVSWP GSQAVGGPQH LCGSHLVDAL YLVCGRGFF YNPRRDVDPL
 LGFLPPKAGG AVVQGGENEV TFKDQMEMMV KRGIVEECCH KPCTIFDLQN YCN

QUERY: 11 LLVLMVSWPGSQAVGGPQHLCGSHLVDALYLVCGRGFFYNPRRDVDPLLGFLPPKAGG 70
 LL+++M+ G QA LCG L + L +C GF +R +DP+ F + G
 SBJCT: 18 LLLILMIG--GVQAT---MKLCGRKLPETLSKLCV-YGFNAMTKRRLDLPV-NF--NQIDG 68

QUERY: 71 AVVQGGENEVTFKDQMEMMVKR----GIVEECCHKPCTIFDLQNYC 112
 + + ++M+ R G+ +ECC K CT+ ++ YC
 SBJCT: 69 FEDRSLLERLLSDSSVQMLKTRRLRDGVFDECCCLKSCTMDEVLYC 114

CG14167 / DILP
 MGIEMRCQDRRILLPSLLLLLILMIGGVQATMKLCGRKLPETLSKLCVYGF
 NAMTKRRLDLPVNFNQIDGFEDRSLLERLLSDSSVQMLKTRRLRDGVFDECC
 CLKSCTMDEVLYCAAKPRTVTCKNL

QUERY: 91 KRGIVEECCHKPCTIFDLQNYC 112
 +R I ECC + CT D+ +YC
 SBJCT: 112 RRIAHECCKEGCTYDDILDYC 133

QUERY: 1 MAALWLQAFSLVLMVSWPGSQAVGGPQHLCGSHLVDALYLVCGRGFFYNPRR 55
 M+ + L LL+L VS Q V G + +CG L+ AL ++C + GF RR
 SBJCT: 1 MSLIRLGLALLLLLATVSQL-LQPVQGRRKMCGEALIQALDVICVN-GFTRRVR 53

CG6736 / DILP
 MSLIRLGLALLLLLATVSQLQPVQGRRKMCGEALIQALDVICVNGFTRR
 VRRSSASKDARVRDLIRKLOQPEDIEQETETGRKQKHTDADTEKGVPP
 AVGSGRKLRRHRRRIAHECCKEGCTYDDILDYCA

QUERY: 93 GIVEECCHKPCTIFDLQNYC 112
 G+ +ECC K C+ +L YC
 SBJCT: 132 GYDECCVKTCSYLELAIYC 151

QUERY: 1 MAALWLQAFSLVLMVSWPGS--QAVGGPQH-LCGSHLVDALYLVCGRGFFYNPRRDV 57
 + +L + A + MV+ GS Q + H LCG L DA+ +VC GF PR+
 SBJCT: 15 LQSLIIAAMLTAAMAMVTPTGSGHQLLPPGNHKLCPALSDAMDVVC-PHGFNTLPRKR- 72

QUERY: 58 DPLLG 62
 + LLG
 SBJCT: 73 ESSLG 77

CG14173 / DILP
 MFSQHNGAAVHGLRLQSLIIAAMLTAAMAMVTPTGSGHQLLPPGNHKLCP
 PALSDAMDVVCPHGFNTLPRKRESLLGNSDDDEDTEQEVQDDSSMWQTL
 GAGYSFSPLLTNLYGSEVLIMRRHRRHLTGCVYDECCVKTCSYLELAIY
 CLPK

QUERY: 91 KRGIVEECCHKPCTIFDLQNYCN 113
 ++GIVE CC K C + L+ YC+
 SBJCT: 111 RQGIVERCCKKSCDMKALREYCS 133

QUERY: 31 LCGSHLVDALYLVCGRGFFYNP 53
 LC L + L +VC + YNP
 SBJCT: 28 LCSEKLNEVLSMVCEE----YNP 46

CG8167 / DILP
 MSKPLSFISMVAVILLASSTVKLAQGTLCSEKLNEVLSMVCEEYNPVI
 PHKRAMPGADSDLDALNPLQFVQEFEEEDNSISEPLRSALFPGSYLGGVLNS
 LAEVRRTTRQRGIVERCCKKSCDMKALREYCSVVRN

• **SOMATOSTATIN II PRECURSOR (FISH)**

SADQPNSIPP RERKAGCKNF YWGLTSC

QUERY: 8 IPPRERKAGCKNFYWK 24
 +PP E + G K Y KG
 SBJCT: 64 LPPLEERDGIKAEYMK 80

CG4186
 MPRNQAEQDNPCLEQELSFKCLNKNFDRDKCEIYFANYNNCKEFWNK
 VKTERRAKGIAPYLPLEERDGIKAEYMKGKPPQS

• **MOLT-INHIBITING HORMONE PRECURSOR (MIH) . (DECAPODA)**

MMSRANSRFS CQRTWLLAVV VLAAIWSSSL HQAAARVFNDCPNLMGNRD LYKKVEWICD
DCANIFRIPG MASICRKCFC FNEFDLWCVR ATERTEEMMQ LKQWVRILGA GRM

QUERY: 7 SRFSCQRTWLLAVV---VLAAIWSSSLHQ---AAARVFNDDCPNLMGNRDLYKKVEWIC 59
+R C R ++VV VL I+++ H + F+ +C + N+ ++ +++ IC
SBJCT: 281 AREMCSRNIKISVVFLVLIPIFAALPHNHLNLSKRSNFFDLECKGIF-NKTMFFRLDRIC 339

QUERY: 60 DDCANIFRIPGMASICRKCFCFNEFDLWCVRATE-RTEEMMQLKQWVRIL 108
+DC +FR + +C+ +CF +E F C++ EE+ QL+ +++++
SBJCT: 340 EDCYQLFRETSLHRLCKANCFVHETFGDCLKVLIDDEEISQLQHYLKV 389

CG13586 / CHGH

MIEICEYIPRDPNPNPTNPCRLLSLREKQKPKQINYQQKGSFTSSSS
YEEAVTKSEKLETHDGLPNANACEYEHEYEYEYEHEYEYGYGYG
YEEYECEYEYEMEMVSELQSWQINWRNATRRMSDAEFEIPLQQRLEI
RADTAPMCQPVQHAYIYECSDDVAGTKQSPRGLCFMFGLSAPPCLRSQAL
RLTVEAPVALVQMEVVVPHIPVGHIVRGMHSFGLRRPPAHPRCGSSSRSM
PPGRELPLPLSFGGGVELGRHRAHLAHLAREMCSRNIKISVVFLVLI
PIFAALPHNHLNLSKRSNFFDLECKGIFNKTMFFRLDRICEDCYQLFRETSL
HRLCKANCFVHETFGDCLKVLIDDEEISQLQHYLKVINGSPYPQECFG
SPFFNACIEALQLHEEMDKYNEWRDTLGRK

• **CHH-LIKE PROTEIN PRECURSOR (BOMBYX MORI)**

MHLSSVQFAW AALVALAVSA AGALPSSAPH HVERRSFFTL ECKGVFDAAI FARLDRICDD
CFNLFREPQL YTLCAECFT TPYFKGCMES LYLYDEKEQI DQIDFVGRK

QUERY: 30 HHVERRS-FFTLCKGVFDAAI FARLDRICDDCFNLFREPQLYTLCAECFTTPYFKGCM 88
H++ +RS FF LECKG+F+ +F RLDRIE+DC+ LFRE ++ LC+A CF F C+
SBJCT: 310 HNSKRSNFFDLECKGIFNKTMFFRLDRICEDCYQLFRETSLHRLCKANCFVHETFGDCL 369

QUERY: 89 ESLYLYDEKEQIDQ 103
+ L + DE +I Q+
SBJCT: 370 KVLIDDE--EISQL 382

QUERY: 77 ECFTTPYFKGCMESLYLYDEKEQIDQIDFVGRK 110
ECF +P+F C+E+L L++E ++ ++ D +G++
SBJCT: 397 ECFGSPFFNACIEALQLHEEMDKYNEWRDTLGRK 430

CG13586

QUERY: 84 FKGMESLYLYDEKEQIDQIDFV 107
F +++Y+++EKE + ++ DF+
SBJCT: 4 FINICKNIYVFNEKELVSRL-DFI 26

CG16803

MHTFINICKNIYVFNEKELVSRLDFICVPISVTKDIESFTSK

• **MANDIBULAR ORGAN-INHIBITING HORMONE PRECURSOR (CRUSTACEA)**

MTTKCTVMAV VLAACICLQV LPQAYGRSTQ GYGRMDKLLA TLMGSSEGGA LESASQHSLE
KRQIFDPSC GLYDRGLFSD LEHVCKDCYN LYRNPQVTS CRVNCYSNRV FRQCMEDLL
MEDFDKYARA IQTVGKK

CG13586

QUERY: 82 EH-VCKDC-----YNLYRNPQVTSACRVNCYSNRVFRQCMEDLL 119
EH VCKDC +N+ V SAC V+ YS + C +L
SBJCT: 49 EHFVCKDCQCPITEASFNINDGQPVCACFVSNYSG-ICHGCKRPIL 94

CG18358 / CYS-RICH + LIM-DOMAIN

MTSIRCSFIRLLSPNSTPLQSEQPSICHKCNEVIQLRIITALGKTWHPEH
FVCKDCQCPITEASFNINDGQPVCACFVSNYSGICHGCKRPILVSNQY
D

• **TACHYKININ 2 PRECURSOR, ISOFORM ALPHA (HUMAN)**

MKILVALAVF FLVSTQLFAE EIGANDDLNY WSDWYDSQI KEELPEPFEH LLQRIARRPK
PQQFFGLMGK RDADSSIEKQ VALLKALYGH GQISHMAYE RSAMQNYERR R

QUERY: 54 RIARRPKPQQFFGLMGKRDADSSIEKQVALLKAL---YGHGQISHMAYERSAMQN 106
+I PK Q FG KR+ S K+ +L+ A GHG+ ++ R N
SBJCT: 18 KIVETPKQHEFG---KRECYSLDSKKYSLVPATPSSSGHGKQFQTELKRRKRNKLN 70

CG17962 / Z600

MSSNETNQVLRQLNSLKIVETPKQHEFGKRECYSLDSKKYSLVPATPS
SSGHGKQFQTELKRRKRNKLNRMITYEADKNFIKARKSLNF

• **ADIPOKINETIC HORMONE II PRECURSOR - MIGRATORY LOCUST.**

MTQSCSTLTLV LVVAVLAALA TAQLNFSAGW GRRYADPNAD PMAFLYRLIQ IEARKLAGCS
D

QUERY: 23 QLNFSAGWRRYADPNADPMAF 44
QL FS WG+R A P F
SBJCT: 23 QLTFSPDWGKR SVG-GAGPGTF 43

CG1171 / AKH
MNPKEVLIAAVLFMLLACVQCQLTFSPDWGKR SVGGAGPGTFFETQOQN
CKTSNEMLLEIFRFVQSQQLFLDCKHRE

QUERY: 28 AGWRRYADPN 38
AG GR +A+PN
SBJCT: 39 AGVGRSFANPN 49

CG13212
MSYSSRFGDFHLPDEGWCPKNDMHFIRSAEWPVEKAGVGRSFANPN
VIYPRVGMIPRYGGHVPGNKFRVNTYGRSTIDAKRHLALNHD

• **GLUCOSE-DEPENDENT INSULINOTROPIC PEPTIDE [RATTUS NORVEGICUS].**

MVALKTCSLL LVLLFLAVGL GEKEEVEFRS HAKFAGPRPR GPRYAEGTFI SDYSIAMDKI
RQQDFVNWLL AQKGKNDWK HNLTOREARA LELAGQSQRN EEKEAQGSSL PKSLSDDEVL
RDLLIQELLA WMADQAE LCR LRSQ

QUERY: 58 DKIROQDFVNWLLAQKGKNDWKHNL--QREARALELAGQSQRN-EEKEAQGSS 109
D RQ++ KGK+ D NLT QR+AR EL + Q+ EE A G+S
SBJCT: 8 DLARQKNQKQADLTGKRTD---NLTVEQRKARDAELMREKQKKKEEAAAAGTS 59

CG17931 + NLS
MTRGNQRDLARQKNQKQADLTGKRTDNLTVEQRKARDAELMREKQKK
EAAAAGTSK

• **GASTRIC INHIBITORY POLYPEPTIDE [MUS MUSCULUS].**

MVALKTCSLL LVLLFLAVGL GEKEEVEFRS HAKFAGPRPR GPRYAEGTFI SDYSIAMDKI
RQQDFVNWLL AQKGKSDWK HNLTOREARA LVLAGQSQ GK EDKEAQESSL PKSLSDDDVL
RDLLIQELLA WMVDQAE LCR LRSQ

QUERY: 58 DKIROQDFVNWLLAQKGKSDWKHNLTOREARALVLAGQSQ GKEDKEA 105
D RQ++ +GK++D + QR+AR L + Q K+++ A
SBJCT: 8 DLARQKNQKQADLTGKRTD-NLTVEQRKARDAELMREKQKKKEEAAA 54

CG17931

• **GLUCAGON. (CHINCHILLA)**

HSQGTFTSDY SKHLDSRYAQ E FVQWLMNT

QUERY: 20 QEFVQWLMN 28
+EFV+WL N
SBJCT: 187 REFVKWLG N 195

CG13488 + NLS
MSYQNLGFLVLVTPSLINTYGDRSRYRLYQSDYALQTI STQLVLSQAIE
LVDYVVEDLIVLDSQNSILLGYLDRFADF TAVNANKTEQKLNAFYGVIED
YLDSDTTGDPLRTSS IETQLIALCLQRNGFDRWKRTVQTRTSQ LKLIYR
KLRKHLESIDREDRLAVERRRWKILTRGGPRRLEKLEFVKWLG NFRD

• **SOMATOTROPIN. (CHICK)**

MAPGSWFSP LIAVVTGLGLP QEAAATFPAM PLSNLFANAV LRAQHLHLLA AETYKEFERT
YIPEDQRYTN KNSQA AFCYS ETIPAPTGKD DAQKSDMEL LRFSLVLIQS WLTPVQYLSK
VFTNNLVFGT SDRVFEKLD LEEGIQALMR ELEDRSPRGP QLLRPTYDKF DIHLRNEDAL
LKNYGLLSCF KKDHLHKVETY LKVMKCRRF G ESNCTI

QUERY: 161 QLLRPTYDKFDIHLRNEDALLK-NYGLLSCFKKDLHKVETY LKVMKCRRF GESNCT 215
Q PTY++ + + LL +YG ++D+H++ET LK+ K F N T
SBJCT: 27 QSFTPTYEQEEPQMA---LLSWHYGRQWMEERDIHRMETKLIKKEANFIPPNYT 79

CG14659
MSEKKYWEPAKAFRPKNERAKVSIWHQSFTPTYEQEEPQ MALLLSWHYGR
QWMEERDIHRMETKLIKKEANFIPPNYTSWLEKRAIKTKQQLIRS

• **BOMBYXIN II. (BOMBYX MORI)**

EQPQAVHTYC GRHLARTLAD LCWEAGVDGI VDECCLRPCS VDVLLSYC

QUERY: 27 VDGIVDECCLRP-CSVDVLLSYC 48
+ + D CC C+ LL YC
SBJCT: 83 LQNVTDLCKSGGCTYRELLQYC 105

CG14049
MVLKVPSTKVLVLLVATLFAVAAMISSWMPQVAASPLAPTEYEQRRMMCST
GLSDVIQKICVSGTVALGDVFPNSFGKRRKRDLQNVTDLCKSGGCTYRE
LLQYCKG

• **PEPTIDE YY C-FLANKING PEPTIDE. (FISH)**

STPEEAVAWL LYGGNSNQDT EPRSDYVDQO

QUERY: 2 TPEEAVAWLLYGGNSNQDTEPRSD 25
T + A+ WL +GG D RS+
SBJCT: 63 TAKWALFWLCWGGALQGDIFSRSE 86

CG13767
MSEATIELDSSIAVAPKCSNVNNNSARSSRVGSSISGPDSDAECQRFGW
CGWNPALWQRFCTAKWALFWLCWGGALQGDIFSRSELLT

QUERY: 5 EAVAWLLYGGNSNQDTEPRSD 25
EA + GG +N D P +D
SBJCT: 103 EAFRGVPOGGTTNHDGSPPTD 123

CG11562
MSTASRVTLGLAVSISTAIIGYVHYKQSDRLRLHDGVLRDVEQQORRKH
ENTYTLOQQIDMTKQLKAREASSNSDTPVPPSTHRAQSNLQAEKPAVQN
EGEAFRGVPOGGTTNHDGSPPTDIA

• **BOMBYXIN PRECURSOR. (BOMMO)**

MKILLALIALM LSTVMWVSTQ QPQEVHTYCG RHLARTMADL CWEEGVDKRS DAQFASYGSA
WLMYPYSAGRG IVDECCLRPC SVDVLLSYC

QUERY: 1 MKILLALIALMLSTVMWVSTQPPQEVHTYCG 30
+K+++ +AL +S V S ++P++V CG
SBJCT: 4 IKLIILVALTISMVQSCSVEEPEQVECGCG 33

CG7606 + CYS
MFNIKLIILVALTISMVQSCSVEEPEQVECGCGKPKQLSCGSRSCGCG
CNPCRCPSSSGCGCKD

• **NEUROPARSIN A. LOCUSTA MIGRATORIA**

NPISRSEGA NCVVDLTRCE YGDVTDFFGR KVCAKGPDK CGGPYELHGK CGVGMDCRCG
LCGCSLHNL QCFEFGGLP SSC

QUERY: 32 VCAKGP-GDKCGPYELHGKCGVGMDCRCGLCS-GCSLHNLQCFEFGGLPSSC 83
+C GP G +C P CG +C LC C+ +QC F G P C
SBJCT: 1 MCC-GPCGPRCCDP-----CGGCYNCCVELCCVPCTPAYIQCSFMPCG-PRGC 46

CG17567 + CYS
MCCGPCGPRCCDPCCGCYNCCVELCCVPCTPAYIQCSFMPCGPRGCC

QUERY: 14 VDLTRCEYGDVTDFFGRKVKAKGPGDKCGGPYELHGKCGVGMDCRCGLCSGCSLHNLQCF 73
VD T ++ +FF ++ + G CG CG G CG GC N
SBJCT: 22 VDFTSLKHDTEMNFFFKRRLQPSG--CG-----CGYGCGYECGYGCGGCANAYAD 71

QUERY: 74 FFE 76
F++
SBJCT: 72 FYD 74

CG3898 + CYS
MNRIEWESERNETKRKTQTMRVDFTSLKHDTEMNFFFKRRLQPSGCGCG
YCGYECGYGCGGCANAYADFYDILLADSVGLVFEFAFAVRMAREMDRI
GLDQNESDRISAVIGTIDASARLL

• **BOS TAURUS NEUROPHYSIN**

AVLDLDRVTC LPCPGGKGR CFGPSICCGD ELGCFVGTAE ALRCQEENYL PSPCQSGQKP
CGSGGRCAAA GICCPDGDCH EDPACDPEAA FSQ

QUERY: 13 CGPGGKGRCFGPSI--CCGDELGC 34
CG GG G C G CCGD GC
SBJCT: 71 CGEGGGGGCCGDDGGGCCGDDGGG 94

QUERY: 27 CCGDELGCFVGTAEALRCQEENYLSPC-QSGQKPCGSGGRCAAAGICCPDGC 79
CCG L C A C E C G CG GG C G DGC
SBJCT: 55 CCG--LACSACLACDEGCGEGGGGGCCGDDGGGCCGDDGGGCGDCG-----DGC 101

CG13494 + CYS
MTETSSWSTTIATTTTTEAAKAGSMAVGIIVLIVVMVLLCCLLIICLPLL
CLCGCCGLACSACLACDEGCGEGGGGGCCGDDGGGCCGDDGGGCGDCGDG
CGDCTLDDD

QUERY: 13 CGPGGKGRCFGPSICCGDELGCFVGTAEALRCQEEN--YLPSP--CQSGQKPCGSGGRCA 68
C PG C P CCG G G L C N + S C G PCG G C +
SBJCT: 2 CNPG---MCSMPGTCCGPT-G---GLGPCLLCGPYNGQWFRSVNHC-CG--PCGPYGCC 51

QUERY: 69 AAGICCPDGDCH 80
C P G H
SBJCT: 52 ----CYGPYGGH 59

QUERY: 10 CLPCPGGKGRCF-GPSICCGD--ELGC 34
CL CGP G+ F + CCG GC
SBJCT: 23 CLLCGPYN-GQWFRSVNHCPCGPYGC 49

CG4959 + CYS
MCNPGMCSMPGTCCGPTGGLGPCLLCGPYNGQWFRSVNHCPCGPYGCC
SCYGPYGGHC

• **CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE ISOFORM B**

MFACRTLCLV VVMVASLGTG VVGRSVEGV SRMEKLLSSS ISPSTPLGF LSQDHSVNRK
QVFDQACKGV YDRNLFKLN RVCEDCYNLY RKPFIIVTCR ENCYSNRVFR QCLDLLLLSD
VIDEYVSNVQ MVGK

QUERY: 46 TPLGFLSQDHSVNRKQVFDQACKGVYDRNLFKLN RVCEDCYNLYRKP 93
TP L +H N+R+V A G+ D + LNR C +Y+KP
SBJCT: 35 TPTLLLRLEHPRNERRVAFHA--GIIDN---EHLNRKSKCCCIYKPK 77

CG13994
MAHKQSTNNETSNGSTTEIIDETDARAQLESGRTPPTLLLRLEHPRNERR
VAFHAGIIDNEHLNRKSKCCCIYKPLAFGESSEDEDECEHCFGHPEK
RQRNAKHNNHGDKPCTEASHPEGPSTSTQAAHISQPPAEPVESKTDPKP
PTPGVDFEQTGSS

• **DROSOPHILA ALLATOSTATIN PREPROHORMONE**

MNSLHAHLIL LAVCGVGYIA SSPVIGDQQR SGDSADVLL ADEMADNGG DNIDKRVRY
AFGLGRRAYM YTNNGPGMKR LPVYNFGLGK RSRPYSFGLG KRSDYDQD NEIDYRVPPA
NYLAAERAVR PGRQNKRTTR PQPFNFGGLR R

QUERY: 7 HLILLAVCGVGYIASSPVIGDQQRSGDSADVLLAAD-EMADNGGDNIDKRVRYAFGLG 65
HL LL V G + G D D L AD A+ + R+ R FG G
SBJCT: 5 HLNLL-VLSAGLLVLLAQSGTTAPQADEDVQQLTLADVNQAEQEQEMPAVRLARQ-FGFG 62

QUERY: 66 RRAYMYTNGGPG 77
R + GG G
SBJCT: 63 REGFGRGRGGFG 74

CG9759
MRIYHLNLLVLSAGLLVLLAQSGTTAPQADEDVQQLTLADVNQAEQEQEM
PAVRLARQFGFGREGFGRGRGGFGGRRGGGFRPFGFGGGFGGFYF
PPPPFFGGPFYF

- **BOS TAURUS COPEPTIN**

ADDRSATLLD GPSGALLLRL VQLAGAPEPA EPAQPGVY

QUERY: 6 ATLLDGPAGAL 16
AT++DG +G L
SBJCT: 3 ATIVDGDAGPL 13

CG17706
MLATIVDGDAGPLSTIQIKSAITKHQRRRTGPMHLLRTMNRPLQLLAKIKR
IRTPTRAQINGKDKTKIKIKSMVKEIKED

- **PRO-MCH PRECURSOR (MOUSE)**

MAKMTLSSYM LMLAFSLFSQ GILLSASKSI RNLEDDIVFN TFRMGKAFQK EDTAERSVVA
PSLEQYKNDK SGFMNDDDNK NSKNTGSKQN LVTHGLPLSL AVKPYLALKG SVAVFPAENG
VQNTTESTQEK REIGDEENSA KFFIGRRDFD MLRCMLGRVY RPCWQV

QUERY: 35 DDIVFNTRFMGKAFQKEDTAERSVVAAPSLEQYKNDKSGFMNDDDNKNSKNTGSKQNLVTH 94
DD + N+ + +A K+ AE+ +PS K+DES + + + S + +
SBJCT: 117 DDFL-NSLKRRQANAKKHRAEKPP-SPSKPAKKSDESN-SGEQEEQASAPAPAPASSPAK 173

QUERY: 95 GLPLSLAVKPYLALKGSAVFPAENGQNTTESTQEKREIGDEENSAKFFIGR 146
G + A+ K + A P E V++ + +E + EE K PIGR
SBJCT: 174 GYKGSALSRRKLSKPAKAT-PVE-AVEDA-AAEESQOQKEETKPKRPIGR 222

CG9782
MSYFWQFSNCLLFIVCVLCYGVVSAQEEGGPAVSPAKRIAALRRPVGKAA
KVTTTTTAAPAQADAGGEGEYDEETGEHGDHGEEGDEASFTTTTTT
EAPKKVGPVIRPFRSNDLNSLKRRQANAKKHRAEKPPSPKPAKKSDE
SNSGEQEEQASAPAPAPASSPAKGYKGSALSRRKLSKPAKATPVEAVED
AAEESQOQKEETKPKRPIGRLLRKRNL

QUERY: 3 SVAVFPAENG--VQNTTESTQEKREIGDEENSAKFFIGRRDFDMLRCMLGR 50
S A P+ G V + +R + + S K + RRD + L C+L R
SBJCT: 63 STAAKPSGPGSSVSQYRANMVRRSNTNRQSPKEQM-RRDRNTLACLRSR 111

CG16815
MENSSTYTHKKFAVSKRREVDHDKENQTOQSEQPIFKRRQTOGFFRPWL
DNEQNQAQAEKETSTAAPKSGPGSSVSQYRANMVRRSNTNRQSPKEQMR
DRNTLACLLSRRAQAQEEQVGGQYEQYRSHHAAMLEQQVRLSLYRHL
QQAVFQRAINPAPGHILPQQQQQFLQOMALSQQMLIFGGQHC

QUERY: 29 ENSAKFFIGRRDFDMLRCMLGRV 51
EN ++P G+R+ ++L L R+
SBJCT: 17 EN-IRYPPGKRELEILEKQLDRI 38

CG11263
MNKSDGNESFALDSL PENIRYPFGKRELEILEKQLDRIVLIYQVDTTYHS
ALKDIKDQKIISLLVEPSFYGRHPTSILVVATCNGTYIFDIKALGLIFL
ELAKILEADQPRKVIHSHRIADHLLHRQISLGGIFDTFVAVCLSSNTR
IPYTLPEAISLVFGLPMEKVTGGCESQRNFTARPLTHSQMRYLAKLVQLQ
HIMHDHLNYSHFCAEVYRISLEFSHSYGLRSCDVAINMAPASSFGFQL
LDSFCKKADKELEQI

- **LW-AMID AND MW-AMID-CONTAINING PREPROHORMONE [HYDRA MAGNIPAPILLATA].**

MGMFERKKIV LLVSLICVSQ QATNVQDANS KSTSTELKVV KPQKRVTPVK DAEKLSILRT
QDNSLDLNTN GEEVWDELTH NIPLEYIEKI YNELNQLAQN ENRPKRLWGA TAAINTDNLN
PEVENELENK KNAPVIEKFE RPIGLWHKDI ETKNPENRLP LGLWGKDSEP LPIGLWGKDA
DVNDLKKKEP LPIGLWGKDT DSTRGDNKPN AYKGLPIGL WGKDNALNTD LGKKNNGKDS
GPPPLWGKD SKPIPGLWGK DNGPMTGLWG KKDVGPPPGL WGKQDQPPIG MWGRAGKRDS
NPYPGLWGK EEELENDVKE IEEDSLEFP ACLENNPPCE IQEKRYNIDK SGPPPGLWGK
RSEYQMNKP PWRGGMWGRS EILENSVHDS KKTNTIDMEH AEN

QUERY: 256 GLWGKDN---GPMTGLWGKDVGPP-PGLWGKQDPP 288
G WGK + G+WGK+D G WGK+ Q P
SBJCT: 173 GAWKREPTWNNLKGWGRDQWQKLHGGWGRSOLP 209

CG6456 / MIP
MAHTKTRTYGFLMVLILGSACGNLVASGSAGSPPSNEPGGGLSEQVV
LDQLSESDLYGNKRAWQSLQSSWGKRSSSGDVSDDPIYMTGHFVPLVIT
DGTNTIDWDTFERLASGQSAQQQQQPLQQQSQSGEDFDDLAGEPDVEKR
AWKSMNVAWGKRRQAQGWKFRGAWKREPTWNNLKGWGRDQWQKLHG
GWGKRSOLPSN

QUERY: 353 PPPGLWGRSEKYQMN 368
P G+WG+ + Y N
SBJCT: 29 PMEGIWGRNNNSYNAN 44

QUERY: 242 PPPGLWGK--DSKPIPGLWGKD 262
P W + +P+ G+WG++N
SBJCT: 16 PEQWQWRRRGSQRPMEGIWGRNN 38

QUERY: 287 PPIGMWGRAGKRDSNPYPGLWGK 309
P W R G + P G+WG+
SBJCT: 16 PEQWQWRRRGSQ--RPMEGIWGR 36

CG13352
MRSASAAETPAVTPSPEQWQWRRRGSQRPMEGIWGRNNNSYNANS

• **GLUCAGON-FAMILY NEUROPEPTIDES PRECURSOR (RANA)**

MYRKALLVWL LVIYIMRCTV HSSPTALKYP ALRLEDEVID EDGNTLPDFA FDNNPIGIGN
PASVFDDMYS FYYPAEKRHA DLLLNKAYRN LLGOLSARKY LHTLMAKHLG AVSSSLEDD
EPLSKRHSQG IFTDSYSRYR QMAVKKYLA AVLGKRYKQR IKNKGRRVAY L

QUERY: 5 KYPALRLEDEVI--DEDGNTLP-DFAFDN----NPIGIG-NPASVFDDMYSFYYPAEKRH 56
K+ R+ D++Y D++ L +FA + + G +PA FD M+S + H
SBJCT: 166 KHAIKRINDQIYMLDKENRYLKRNFACSSISALKRCLNGQDPAMFFDTMFVFCEDVSDH 225

QUERY: 57 AD-DLLNKAYRNLLGOLSARKYLHTLMAKHLGAVXXXXXXXXXXXXKRHS--GIFTDSY 113
N+ ++ LL Y A + KR+ + G+ D+
SBJCT: 226 QQVQHFNLFKTTLL-HAHMDHYRRQQRAPLMEEASQSFNDLKAQVSKRYKNVLMKLDLAE 284

QUERY: 114 SRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRIKKN 141
S + ++ +YLA VL K +K K K
SBJCT: 285 S-HELTLSAMRYLA-VLRKLFKATFKGK 310

CG14383
MAKPFSLTEEKLDLDFVQEVVSVVVKLVDMPLDKDNIVPTCTRWLNIHQQS
TPKERFSRNYMLLLHKLNDHKSGLGYPFTWPGSFQDLRLTLHQMSLKP
PAIGKDVVCKFDESLNEEQSSFSCENIVEANRRLVKENAALTKESME
LQCLIDKLVKRAADKHAIKRINDQIYMLDKENRYLKRNFACSSISALKR
LCNGQDPAMFFDTMFVFCEDVSDHQVQHFNLFKTTLLHAHMDHYRRQ
RAPLMEEASQSFNDLKAQVSKRYKNVLMKLDLAEHELTLSAMRYLAVLR
KLFKATFKGKASTKKAVLKFLOHNYELMNEML

• **PBAN-TYPE NEUROPEPTIDES PRECURSOR (HELICOVERPA)**

MFNQTLQFV LAFVFTSSVL GNNNDVKDGA ASGAHSDRLG LWFGPRLGKR SLRISTEDNR
QAFFKLEEA DALKYYYDQL PYEMQADEPE TRVTKKVIFT PKLGRSLAYD DKSFENVEFT
PRLGRRLSDD MPATPADQEM YRQDPEQIDS RTKYFSPRLG RTMNFSPRLG RELSYDMPN
KIRVVRSTNK TRST

QUERY: 40 GLWFGPRLGKRSL 52
GLWFGPRLGKRSL+
SBJCT: 90 GLWFGPRLGKRSLV 102

CG15520 / CAPA
MGLYAFPRVGRSDPSLANSLRDGLEAGVLDGIYGDASQEDYNEADFQKKA
SGLVAFPRVGRGDAELRKWAHLALQQVLDKRTGPSASSGLWFGPRLGKR
SVDKSFADISKQKELN

QUERY: 8 FVFLAV-FTTSSVLGNNNDVKDGAASGAHSDRLGLWFGPRLGKRSLRISTEDNRQAFF 64
F F+ + F T S L V D +GA DRLGLW RSL +D+++ FF
SBJCT: 86 FAFIVIAFATPSWL-----VSDYRITGAKLDRGLVWHCF---RSLPDVNDQSRRFF 135

CG10624 / L(3)06425
MVFCGITSAAATLQSTPKQQTQTFPQETSEIPIEFPTQRMQKPSHFA
SQEHLPTSHQNSHTVNMKRRTLSGSCGVFVFAFAFIVIAFATPSWL
SDYRITGAKLDRGLVWHCFRSLPDVNDQSRRFFVGCWVYDPFTTGYD
EIRGFLLPAPMIATQFFYTLAFIGMLVSAIGVLFILCAGPDQKHFITLI
KSLGYVLLGAGVSAIAVIVFAGFGNRRNGWMPHANNWFGWSFILACVGT
VLTAVASTLFLSEAHVQHKRIQFKESQTRFELVRG

• **PROTACHYKININ 1 PRECURSOR (RAT)**

MKILVAVAVF FLVSTQLFAE EIGANDDLNY WSDWSDSDQI KEAMPEPFEH LLQRIARRPK
PQQFFGLMGK RDADSSIEKQ VALLKALYGH GQISHKRHKTD SDFVGLMGKR ALNSVAYERS
AMQNYERRRK

QUERY: 61 PQQFFGLMGKRDADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKTD SDFVGLMGKRALNSVAYERS 120
P F G+ GKR A + + +A ++ KR +SFVG+ GK+ ++ Y+R+

SBJCT: 158 PTGFTGMRGKR PALLAGDDDAEAEDEAT---ELQQKRAPVNSFVGMGKGDVSHQHYKRA 213

QUERY: 121 AMQN-YERRRK 130
A+ + Y+ R K

SBJCT: 214 ALSDSYDLRGK 224

CG14734 / TK

MRPLSGLIALALLLLLLLTPASSAADTETESSGSPLTPGAEPRRVVKRA
PTSSFIGMRGKDEEHDTESEGNWLGSGPDPLDYADEADSSYAENGRRLK
KAPLAFVGLRGKGFIPINNRLSDVLQSLEERLRDSSLQDFDRVAGRDRG
SAVGKRAPTGFTGMRGKR PALLAGDDDAEAEDEATELQQKRAPVNSFVGMG
GKGDVSHQHYKRAALSDSYDLRGKQORFADFNSKFVAVRGKKS DLENGV
GIGDDHEQALVHPWLYLWGEKRAPNGFLGMRGKR PALFE

QUERY: 54 RIARRPKPQQFFGLMGKRDADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKTD SDFVGLMGKRALN 113
+I PK Q FG KR+ S K+ +L+ A H + +T+ + K LN

SBJCT: 18 KIVETPKQHEFG---KRECYSLDSKKYSLVPATPSSS--GHGKFQTE--LKKRRRNKLN 70

QUERY: 114 SVAYERSAMQNYERRRK 130
+ Y A +N+ + RK

SBJCT: 71 RM-YTYEADKNFIKARK 86

Z600

• **NEUREXOPHILIN 2 PRECURSOR. (MOUSE)**

LFCDSEEVH NTESDVWEDR TVPETLVGNL FHSRITSPRL LFVKQPPDPK PSYADNTKNF
WDWLANITEI QEQLARTKRR PIVKTGKFKK MFGWGDHNS IKTVKLNLLI TGKIVDHGNG
TFSVYFRHNS TGLGNVSLSL VPPSKVVEFE ISPOSTLETK ESKSFNCHIE YEKTDRAKKT
ALCNFDPSKI CYQEQTQSHV SWLCSKPFKV ICIHIFYSV DYKLVQKVCV DYNVHSERP
LSFG

QUERY: 147 EFEISPOSTLETESKES-FNCHIEYKTDRAKKTALCNFDPSKICYQEQTQSHVSWLCSK 205
E E+ L T SKS F+C + A ++ C Y +++Q H SW+C +

SBJCT: 127 EEEVEEPDRLLSTLLSKSSFSC--TDRNSGYADESLSEV----FHYCQESQKH-SWICPE 180

QUERY: 206 PFKVICIHIFYSVDYKLVQKVCVDPDYN-YHSERPYL 240
F IH+I + +C + YH YL

SBJCT: 181 GFTFHQIHLICMPPSH---DNICKQSSKYHIVNDYL 213

CG8192 / L(3)10419

MHIPSALVLLVAVSTGLWACCVEGASTGSPSATATTAKPKGFEARSLDVN
SSGGEELDDFETQAQTHLAYRQQPQQQQLYEYSEEDQEEAPRPVYANR
NAKQSNYKIQGQLKKPLSEEEEEEEVEEPDRLLSTLLSKSSFCTDR
NSGYADESLSEV FHYCQESQKHSWICPEGFTFHQIHLICMPPSHDNIC
KQSSKYHIVNDYLYKPINLQEHQSKPNVTLRYSERYPENYEHERYDDE
EEQLPAAPRPRIQQQHQQHQQPQQOHRQVLAQQPQQPQVRYQYQQP
QQHQQHQQQAQPAQVVTQIRHQPPQPPTTLAYRKPQPVTTVQPQLQLHQ
LHQPQLQLHQRPQTLAPTVPAPYRFFTAAPQLQHLQQQQQVFRTPPE
INISLQORRPQVFIATTPRYEYDEYLYERRK

• **NOCICEPTIN PRECURSOR (RAT)**

MKILFCDVLL LSLSSVFSS CPEDCLTCQE RLHPAGGSFN LKLCILOCEE KVFPRPLWTL
CTKAMADSE QLSPADPELT SAALYQSKAS EMQHLKRMPR VRSVVQARDA EPEADAEPVA
DEADEVEQKQ LQKRFGGFTG ARKSARKLAN QKRFSEFMRO YLVLSMQSSQ RRRTLHQNGN
V

QUERY: 163 VLSMQSSQRRRTLHQNGN 180
VL++ S ++ R H NG+

SBJCT: 13 VLNLDSPEKYRPHYHLNGS 30

CG13799

MLALKECLIREGVLNLDSPEKYRPHYHLNGSKSSGAMDFPRYS

• **PYROKININ-1 (INS. CARAUSIUS)**

DEGGTQYTPR L

QUERY: 3 GGTQYTPRLXXXDEGGTQYTPRLXXXDEGG 32
GGTQY R G QY GG
SBJCT: 90 GGTQYIGRRSKRQSRGGQYIDLGGSGGRGG 119

QUERY: 17 GGTQYTPRLXXXDEGGTQY 35
GGTQY R G QY
SBJCT: 90 GGTQYIGRRSKRQSRGGQY 108

CG15067

MKSLTLLALLLILATLAFVHGGKVTINGKCVNCSHDQTTTTHKPTSGKGS
GGRTTARPSSRSPARGRPSWDDDDDDDLTGDWALHQSAGGTQYIGRRSK
RQSRGGQYIDLGGSGGRGGGGWAGSGITIDSSGYPGGTLVRNSDCVGC
NIRG

• **ANTHO-RFAMIDE NEUROPEPTIDES TYPE 2 PRECURSOR. (HYDRA)**

MTTVSYVTIL LTVLVQVLTS DAKATNNKRE LSSGLKERSL SDDAPQFWKG RFSRSEEDPQ
FWKGRFSDPQ FWKGRFSDPQ FWKGRFSDPQ FWKGRFSDPQ FWKGRFSDPQ FWKGRFSDPQ
FWKGRFSDGT KRENDPQYWK GRFSRSFEDQ PDSEAQFWKG RFARTSTGEK REPQYWKGRF
SRDSSVPGRYG RELQGRFGRE LQGRFGREAO GRFGRELOQR FGREFQGRFG REDQGRFGRE
DQGRFGREDQ GRFGREDQGR FGREDQGRFG REDQGRFGRE LQGRFGREDQ GRFGREDQGR
FGREDQGRFG RELQGRFGRE DQGRFGREDQ GRFGREDLAK EDQGRFGRED LAKEDQGRFG
REDIAKEDQG RFGNAAAAA KKRTIDVIDI ESDPKPQTRF RDGKDMQEKR KVEKKDKIEK
SDDALAKIS

CG2346 / FMRF

QUERY: 263 REDQGRFGREDQGRFGRELOQRFGREDQGRFGREDQGRFG---REDQGRFGRELOQRFG 319
RED+GR GR GREL R R + R + R G R + GR G E +G R
SBJCT: 253 REDEGR-GRNRYFVGGRELD RR-SRVHRSRSRERQRNRDGDRERPNNGR-GPEEKGS-ER 308

QUERY: 320 EDQGRFGREDQGRFGREDLAKEDQGRFGREDLAKEDQGRFGREDIAKEDQGRFG 373
+ G E R ++D+ GR+ +E GR R+ + D+GRFG
SBJCT: 309 PKEAADGP ERAERAPDRGRRDRDRDNHGRDHRERERDRRRDRDRHGRNDRGRFG 362

QUERY: 247 REDQGRFGREDQGRFGRE-DQ-GRFGREDQGRFGRELOQRFGREDQGRFGREDQGRFGRE 304
RED+GR GR GRE D+ R R R G R + GR G E++G R
SBJCT: 253 REDEGR-GRNRYFVGGRELD RR-SRVHRSRSRERQRNRDGDRERPNNGR-GPEEKGS-ERP 309

QUERY: 305 DQGRFGRELOQRFGREDQGRFGREDQGRFGREDLAKEDQGRFGREDLAKEDQGRFG 360
+ G E R D+G R+D+ GR+ +E GR R+ + D+GRFG
SBJCT: 310 KEAADGP ERAER--APDRGG-RRDRDNHGRDHRERERDRRRDRDRHGRNDRGRFG 362

QUERY: 199 RELQGRFGREAOGRFGRELXXXXXXXXXXXXXXXXDQGRFG---REDQGRFGREDQGRFG 255
RE +GR GR GREL + R G R + GR G E++G R
SBJCT: 253 REDEGR-GRNRYFVGGRELD RR-SRVHRSRSRER-QRNRDGDRERPNNGR-GPEEKGS-ER 308

QUERY: 256 EDQGRFGREDQGRFGREDQGRFGRELOQRFGREDQGRFGREDQGRFGREDQGRFGRELOQ 315
+ G E R R R+ GR RE + R GR D+ R GR D+GRFG
SBJCT: 309 PKEAADGP ERAERAPDRGRRDRDRDNHGRDHRERE-RDGRDRDRHGRNDRGRFG----D 363

QUERY: 316 RFGREDQGRFGREDQGRFGREDLAKEDQGRF 346
R G G R+D+ R + + ++ F
SBJCT: 364 RGGGGGGGGHRRDRRRSRSRERSPRERRNF 394

CG7564

MSAPSNKMSATDQMRAMLQDLGTTTRNGDERQLKFS DPRVCKSFLLDCCP
HDILASTRMDLGECPKVHDLAFRADYESA AKTRDYDYDI EAMEHLQAFIA
DCDRRTDSAKQRLKETQEELTAEVAEKANAVHGLAEEIGKKLAKAEALGE
AGEVEDSMELMKEIEELRAKKIKAEHEYRTSMPASTYQQQKLRVCEVCSA
YLGIRHNDIRLADHFGGKHLGFLTIREKLI ELEKTAAPRKAELKRTGKM
TDREDEGRGRNRYFVGGRELD RR-SRVHRSRSRERQRNRDGDRERPNNGRG
PEEKGSERPKEAADGP ERAERAPDRGRRDRDRDNHGRDHRERERDRRRDR
DRHGRNDRGRFGDRGGGGGGGGHRRDRRRSRSRERSPRERRNFHFRDG
GGGGNQKRKRSYSRENYRR

• **ATRIAL GLAND PEPTIDE A (APLYSIA)**

MKANTMFIIIL CLSLSTLCVVS SQSTSVHGKI FVPNRAVKLS SDGNYPFDLS KEDGAOPYFM
TPRLRFYPIG KRAAGEMEQS EGQNPETKSH SWRKRSVLTP SLSSLGESLE SGISKRISIN
QDLKAITDML LTEQIQARRR CLDALRQRL DLGKRSDVVS LFNGLDLPNG RCS

QUERY: 118 SINQDLKAITDMLLTEQIQARRRCLDALRQRLDLGKR-DSDVSLFNGLDLPNGR 171
+I+ D+ I DM T+ I RR L RLL + KR SD+S F GDLL +
SBJCT: 75 AIDVDIDEILDMD-TDDI--RRSHLI----RLLSVCKRPQSDISKFIGDLDLDRAK 122

CG17124
MQCGLEQMNDYCERSFNRTNLRVNFNEKGAEVKERREKFLTAKYGSHQMSL
IRKRLAVEMWLYDELOKLFDPPEAIDVDIDEILDMDTDDIRSHLIRLL
SVCKRPQSDISKFIGDLDLDRAKTL

• **ADIPOKINETIC HORMONE II PRECURSOR - VAGRANT GRASSHOPPER.**

MRQGCALTM LLVVCAALS AAQLNFSTGW GRRYADPNAD PMAFLYKLIQ IEARKLAGCS
N

QUERY: 25 NFSTGWGRRYADPNADPMAFLYKLIQIEAR 54
N TG GR+ P+ P + L+K ++E +
SBJCT: 51 NAFTGCGRKRTPSYPPFFS-LFKRNEVEEK 79

CG4910 / CCAP
MRISLRLALLACAICSQASLERENNEGTMANHKLSGVIQWKYEKRPFC
NAFTGCGRKRTPSYPPFFSLFKRNEVEEKPYNNEYLSGLSDLIDINAE
AVENVQKQIMSQAIFEAIKEASKEIFRQKNKQKMLQNEKEMOQLEERES
K

QUERY: 30 WGRRYA 35
WGRRY+
SBJCT: 45 WGRRYS 50

CG7682 / L(3)05284 + NLS
MSSCPAAATRSAGRRSSRPAPTTCYSGRRTVSSDPTRLPSKRRTWGRYS
ANWASRGSRCYAPRAAWRTPIRICPNRGSFSGS

• **NEUROPEPTIDE GRB-AST B1 - TWO-SPOTTED CRICKET.**

GWQDLNGGW

• **NEUROPEPTIDE GRB-AST B2 - TWO-SPOTTED CRICKET.**

GWRDLNGGW

QUERY: 2 WQDLNGG 8
WQDLNGG
SBJCT: 315 WQDLNGG 321

CG2761
MYSNQDRDVISTPNRGTHPPRTRPTLKPSTIVSKAQEFVDIYRPPSRP
DPIYPQMPDKTAAKCRKDVCLLPDCYCGGRDIPGGLNASETPOFVLMTF
DDAVNTINIDLIEELFNNKSRKNPNCGSWRGTFYLSHEWTDYVMIVLLTF
DDSVNDLNKQLYTDLFEKGRVNPNGCPIATTFYVSHWTDYSQVQNLAD
GHEMASHTVSFGEQFSQKKTREIAGQREILAA YGGVMSDVRGMRAPFL
SVGGNKMYKMLYDSNFTYDSSMPVYENRPPSWPYTLDYKIFHDCMIPPCP
TRSYPGVWQVPMVMWQDLNGGRCMGMGDACSNDPSDADGVTMIMKNFERHY
TTNR

• **PIGMENT-DISPERSING HORMONE I PRECURSOR - BLUE CRAB.**

MRSSVIVAVL VVVALAALLT QGQELKYQER EMVAELAQOI YRVAQAPWAA AVGPHKRNSE
LINSILGLPK VMNDAGR

QUERY: 56 KRNSSELINSILGLPKVMNDAGR 77
KRNSSELINS+L LPK MNDAG+
SBJCT: 81 KRNSSELINSLSLPKNMNDAGK 102

CG6496 / PDF
MARYTYLVALVLLAICQWGYCGAMAMPDEERYVRKEYNRDLDWFNNVG
VGQFSPGQVATLCRYPLILENSLGPSVPIKRNSSELINSLSLPKNMNDA
GK

QUERY: 21 QGQELKYQE--REMVA----ELAQQIYRVAQAPWAAAVGPHKR--NSELINSILGLPKV 71
 QG++ ++ R+ VA + ++ Y+ A W H+ N+E+INSILG PKV
 SBJCT: 121 QGKQYDFRPSIRDCAVALGEHKFKREDYQRASM-WFRVAIKHEPEGNAEIIINSILGDPKV 178

CG18231
 MEEIFITNIKAYTNKLAEKVKNLQAYIDSVDYEFQOSFEDREKYVGNPIN
 AFSLVRRTHQDLPKWHNYSQQIVGMEELFALEEIIAKVPDKKDMAYSLGE
 MHRIEQIYDLAEIELARGRIQKQYDFRPSIRDCAVALGEHKFKREDYQRA
 SMWFRVAIKHEPEGNAEIIINSILGDPKVNLTYLYAKSMLIFGMIKSNPSM
 TIAEAKKISYEALNKASLADIKSLLNELLSQTDDEIVYEMNVNKTGPSDY
 EIGCRGQFLRRRNHVCTYNFTITEFLKLAPLKQEVLNWDPIYIVYHDVNLN
 DDEIDKLNHLNDTDAVEVNPKEKRIFQRINELTRLSFEHSDQQIVSKNG
 PRTHKHKKEYLKGTLFFVSTVYMCNFWLHLVLQYKILF

• **PHEROMONE BIOSYNTHESIS ACTIVATING NEUROPEPTIDE PRECURSOR - SILKWORM.**

MYKTNIVFNV LALALFSIFF ASCTDMKDES DRGAHSERGA LWFGPRLGKR SMKPSTEDNR
 QTFLRLLEAA DALKFYDQL PYERQADEPE TKVTKKIIFT PKLGRSVAKP QTHESLEFIP
 RLGRRLESDM PATPADQEMY QDPPEMESR TRYFSPRLGR TMSFSPRLGR ELSYDYPTKY
 RVARSVNKTM DN

QUERY: 32 RGAHSERGA LWFGPRLGKRSM 52
 R S LWFGPRLGKRS+
 SBJCT: 82 RTGPSASSGLWFGPRLGKRSV 102

CG15520 / CAPA

• **MELANIN-CONCENTRATING HORMONE PRECURSOR - RAT.**

MAKMSLSSYM LMLAFSLFSH GILLSASKSI RNVEDDIVFN TFRMGKAFQK EDTAERSVVA
 PSLEGYKNDK SGFMKDDDDK TTKNTGSKQN LVTHGLPLSL AVKPYLALKG PAVFPAENGV
 QNTESTQEKR EIGDEENSAK FPIGRRDFDM LRCMLGRVYR PCWQV

QUERY: 97 PLSLAVKPYLALKGPAVFPAN--GVQNT 124
 PLSLA+ P + G A AE G NT+
 SBJCT: 27 PLSLALPPSVGEVGVAGEGAEGDGGTNTD 56

CG13600
 MLKKNLKMKRRNTEPTMMVAGSAAPPLSLALPPSVGEVGVAGEGAEGDG
 GTNNTDF

• **PROENKEPHALIN A (CAT)**

WETCKEFLKL SQLEIPQDGT SALRESSPEE SHALRKKYGG FMKRYGGFMK KMDLYPQEP
 EEEAPAEILA KRYGGFMKKD AEEEEEDALAS SSDLLKELLG PGETETAAAP RGRDDEDVSK
 SHGGFMRALK GSPQLAQEAK MLQKRYGGFM RRVGRPEWWM DYQKRYGGFL KRFADSLPSD
 EEGESYS

QUERY: 9 KLSQLEIPQDGT SALRESSPEESHALRKKYGGFMKRYGG 47
 K++ LE+ GT+ LR+S+P++ LR+ + F +RY G
 SBJCT: 32 KMTLLEML--GTNLRKSTPKDYRILREIFNSF-ERYSG 67

CG10143 /GROWTH FACT. + NLS
 MTVLLSHRMLLAGWARRATPTAAQWIHNNPEKMTLLEMLGTTNLRKSTPK
 DYRILREIFNSFERYSVGVNDIQLTLPERAANELIMCEKKREYKIMDP
 SKFAPGHHIFQVLTQVTKVKSPLFQILRRMPKGAALKAHDTSMCSSRVVIEI
 TYRDNLWVCTQNGCRVEEFRFAKDKPKDVSFENGWQPMKELRELGRGE
 NLRKYLQMRFSMYPLASFTTNAHAWRHMMGIFGLLDGLLQYAPVWGDYDY
 NALKEFYADGVQYLEVRVLPQLYSLDGSRMPKRETVQIYKDTLRFKKE
 HPGFIDSKLIYAPIRHVQPELVGEYI KECTELNKEFPFVGVGFDLVGQED
 VGHPLSNFAAELLKLPDHIHFYFHAGQTNWYGSVDQNLDAIVLGTKRI
 GHGYTITKHPVLMRLAKYLNIALEVCVSNQVQLGSDYRSHPAATLIAE
 NVPMVIASGSPGFWRAPLSHDFYMAFLGIAPMNADLFLKRTAKNSIKY
 SSLKDEAKAEAMEKWKQWDKVENIVRQRKKDSETEK

• **NEUROPEPTIDE CALLATOSTATIN 1 - BLUEBOTTLE FLY**

DPLNEERRAN RYGFGL

QUERY: 22 LNEERRANR 30
L + RRANR
SBJCT: 283 LRQRRRANR 291

QUERY: 3 LNEERRANR 11
LN+ RRA R
SBJCT: 235 LNKRRRALR 243

CG14422 / NLS
MKIFYGALLVLGTALIAQAAVARSNDESAQDTAQOSKYRLFQPVQIEAR
SLOQLMSLKNPPCPAATTTTSVPTTTTPTTSPGPTTTTGTSTTTTPT
TTSTNPTTARRSFNQNLLVDGNEEDDDDEEFDQDVEEEKYLKDEDEVQED
DQDDDDNEDDGFQLVAPKASASSSSSIRRRNSASSSYGSSGNKLSNSEL
MREIELRRQKELNEQLRKQLASSRRRSNQSRRRALNKRRRALRRQQQKRR
RLSRRQQQKRRSQNRHRNARRRQRNNRLSRLRQRRRANRRR

• **PERISULFAKININ - AMERICAN COCKROACH.**

EQFDDYGHMRF

• **LEUCOSULFAKININ II, NON-SULFATED - AMERICAN COCKROACH.**

QSDDYGHMRF

QUERY: 1 EQFDDYGHMRFXXX----QSDDYGHMRF 24
++FDDYGHMRF Q DDYGHMRF
SBJCT: 99 KRFDDYGHMRFGKRGDDQFDDYGHMRF 126

CG18090 / DSK
MPLWALAFCLVFLVPIPAQTSLQNAKDRRLQELSKIGGEIDQPIANL
VGPSFSLFGDRRQKTMSPGRRVPLISRPIIPIELDLLMDNDERTKAKR
FDDYGHMRFGKRGDDQFDDYGHMRFGR

• **ATRIAL GLAND PEPTIDE B (APLYSIA)**

MKANTMFIIIL CLTLSTLCVVS SQFTSVLGKI FVTNRAVKSS SYEKYPFDLS KEDGAQPYFM
TPRLRFYPIG KRAAGGMEQS EQONPETKSH SWRERSVLTP SLLSLGESLE SGISKRISIN
QDLKAITDML LTEQIQARQR CLAALRQRL DLGKRSDSVS LFNGDLLPNG RCS

QUERY: 3 LRFYPIGKRAAGG---MEQSEGONPETKSHSWRERSVLT 38
L FY K+A G +E+ E + + + ++W+ ++ LT
SBJCT: 24 LEFYGYKQATVGDNCNIEEPEDEEKARYNAWKSKAGLT 62

CG15829/DIAZEPAM-BINDING INHIBITOR
MPTFEEIVEKAKNFKNLPSKEEFLEFYGYKQATVGDNCNIEEPEDEEKKA
RYNAWKSKAGLTADDAKAYYIEVYKKYAPQYE

• **PRE-PRO-ALLATOSTATIN. (DIPTOPTERA)**

MSGPRTCFCL PSALVVLVLS LSTSALGTAP EPSGVHEESP AGGGTDLLPH PEDLSASDNP
DLEFVKRLYD FGLGKRAYS VSEYKRLPVY NFGLGKRSM YGFGLGKRDG RMYSFGLGKR
DYDYGEEDD DDQAIGDED IEESDVGLM DKRDRLYSFG LGKRARPYSF GLGKRAPSGA
QRLYGFGLGK RGGSLYSFGL GKRGDGRLYA FGLGKRPVNS GRSSGSRFNF GLGKRSDID
FRELEEKFAE DKRYPQEHF SFGLGKREVE PSELEAVRNE EKDNSSVHDK KNTNDMHSG
ERIKRSLHYP FGIRKLESSY DLNSASSLNS EENDDITPEE FSRMVRRPFN FGLGKRIPMY
DFGIGKRSE

QUERY: 61 DLEFVKRLYDFGLGKRAYSIVSEYKR---LPVYNF--GLGKRSK 99
DLE KR DFGL R YS E K L NF G G+R +
SBJCT: 69 DLENSKRTVDFGLA-RGYSGTQEAHRMGLAAANFAGGPGRRRR 111

CG13094 / DH31
MTNRCACFALAFLLFCLLAISSIEAAPMPSQSNNGYGGAGYNELEEVDPD
LLMELMTRFGRITIRARNDLENSKRTVDFGLARGYSGTQEAHRMGLAAA
NFAGGPGRRRRSETDV

- **HUMAN COCAINE AND AMPHETAMINE REGULATED TRANSCRIPT CART (HCART)**

MESSRVRLPLLLGAAALLLMLPLLGTRAQEDAELQPRALDIYSAV
DDASHEKELIEALQEVLLKLLKSKRVPIYEKYQVPMCDAGEQC
AVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL

QUERY: 88 CAVRKGARIGKLCDCPRGTS--CNSFLLKC 115
C + G IG+LC+ G C+S++ C
SBJCT: 11 CRKQPGVAIGRLCEKDDGKVCICDSYVRPC 40

CG9548
MAKHHPDLIFCRKQPGVAIGRLCEKDDGKVCICDSYVRPCTLVRICDECN
YGSYQGRVICGGPGVSDAYYCKSCTIQEKDRDGCPIVNLGSSKTDLFY
ERKKYGFKQK

QUERY: 77 GQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCN 109
GQV C + C+++ G LC+ C+
SBJCT: 98 GQVTKCKDNKICSIKSGKYCVDLCEVGDSVECD 130

CG13311
MAVLVQGVCSQANNVKCLNETHYSFCSNDVAPNQVLQCPDNKVCTDLA
IICMDSSVVDSSCGTADGSCPTCDGNSMFVCTSR'TTFQMC DGTNLGQV
TKCKDNKICSIKSGKYCVDLCEVGDSVECDRDSPL

- **HOMO SAPIENS PROOPIOMELANOCORTIN (ADRENOCORTICOTROPIN/
BETA-LIPOTROPIN/ ALPHA-MELANOCYTE STIMULATING HORMONE/
BETA-MELANOCYTE STIMULATING HORMONE/ BETA-ENDORPHIN) (POMC)**

MPRCCSRSGALLLALLLQASMEVRGWCLESSQCQDLTTESNLL
ECIRACKPDLAETPMFPGNGDEQPLTENPRKYVMGHFRWDRFGRNRSSSSGSSGAGQ
KREDVSAGEDCGPLPEGGPEPRSDGAKPGPREGKRYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVY
PNGAEDESAAEFPLFKRELGTQRLREGDGPDPADGAGAOADLEHSLLVAAEKKDE
GPYRMEHFRWGSPPKDKRYGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAI IKNAYKKGE

QUERY: 110 GEDCGPLPEGG-PEPR 124
G C PLPEGG P+PR
SBJCT: 37 GMCCPPLPEGGIPDPR 52

CG18461
MCNGCGCCGPCNETPCCGPHSPPCGAPSPIPCSPAPGMCCPPLPEGGIPD
PRVWNYNTPTPTPCGF

QUERY: 115 PLPEGGPEPRSDGAKPGPR 133
PLP P PR G P PR
SBJCT: 22 PLPARMPAPRPPGVPPAPR 40

CG14663
MPRKLTAARNASSMLAVPGLLPLPARMPAPRPPGVPPAPRSLCRQDIPLG
EGIGNCRMShLGGTELGVLWD

- **HOMO SAPIENS AGRP PROTEIN (AGRP) GENE**

MLTAAVLSCALLLALPATRGAQMGLAPMEGIRRPDQALLPELPG
LGLRAPLKKTTAEQAEEDLLQEAQALAEVLDLQDREPRSSRRVRLHESCLGQQVPCC
DPCATCYCRFFNAFCYCRKLG TAMNPCSR

QUERY: 87 CVRLHESCLGQQVPCCDPCAT---CYC 110
C +C Q C D CA C C
SBJCT: 3 CKGCGTNCKCQDTKCGDNCACNQDCKCVCKNGPKDQCKSK

CG5097
MVCKGCGTNCKCQDTKCGDNCACNQDCKCVCKNGPKDQCKSK

6.2. Primer-Sequenzen für InSitu-Sonden

Aufgelistet sind hier die CG-Nummern, Namen (falls vorhanden) und *Primer*-Sequenzen für alle bekannten und potenziellen *Drosophila*-Neuropeptide, die bei dem in 6.1 aufgeführten *in silico*-Screen gefunden wurden. Da die Klonierung und das Sonden-*Labeling* im *96 well*-Format durchgeführt wurde, sind auch die Positionen auf selbigen *96 well*-Platten (Pos. A1-H12) aufgeführt. Neben bekannten und potenziellen Neuropeptiden wurden auch einige Hungermarker (Pos. C6-D12) mitkloniert und *-gelabelt*. Die entsprechenden *Primer*-Sequenzen finden sich bei (Zinke et al., 2002).

Pos.	CG-Nr.	Name	<i>Primer</i> -Sequenzen
A1	1171	<i>akh</i>	AKH1+ GAATCCAAGAGCGAAGTC AKH1- CGCGGTGCTTGCAGTCC
A2	2346	<i>fmr</i>	FMRF1+ GGGCATTGCCTTGATGTTC FMRF1- CACTGGCCGAAGAAGTGG
A3	3302	<i>crz</i>	CRZ1+ GTTGCGCCTCCTGCTGC CRZ1- GCTAGTTTACAATAGATTTTAC
A4	4910	<i>ccap</i>	CCAP1+ GGATTTCCCTGAGGCTGC CCAP1- CGCTCCTCCAATTGCTGC
A5	5400	<i>eh</i>	EH1+ CCAGTTTCCAGCAAACAAC EH1- GTCGATATCAGCAGCCAAG
A6	6440	<i>dms</i>	CG6440+ CAAGTCCAGCAAACAGAGC CG6440- GCTAGGGAAATATAGTGTGAG
A7	6456	<i>mip</i>	MIP1+ GGTTTGCACAGCCAAC MIP1- GCTGGGCAACTGGGAGC
A8	6496	<i>pdf</i>	PDF1+ GGCTCGCTACACGTACC PDF1- CGCATCGTTTATGTTCTTG
A9	6736	<i>dilp4</i>	CG6736+ CCTGATTAGACTGGGACTG CG6736- CAGTAGTCCAGTATATCGTC
A10	8167	<i>dilp2</i>	IRP1+ GCTCGACCCAACCTTAATCC IRP1- CCATTTTCGATCATTTCGTAAG
A11	8348	<i>dh</i>	CG8348+ CGTTGTAGGATGACTTCTG CG8348- GCATAAATCGTTACATACACC
A12	10342	<i>npf</i>	NPF1+ CAGTCCGACGAACAATTGC NPF1- CCCAGCTCGTTAAACTATTG
B1	11937	<i>amn</i>	AMN1+ GAGACGATTGGTGGCTAAG AMN1- GAATCTCTAACATATTTACATAG
B2	13094	<i>dh31</i>	DH31+ GGCCTTCCTCCTTCTG DH31- CGCGATTATGCTTACACTTG
B3	13317	<i>dilp7</i>	CG13317+ CTCGGGACGCTGGACAC CG13317- GTAGTGATTGCGTCGCTTG
B4	13480	<i>leukokinin</i>	LEUKO1+ GCTCCTGGCCTTTGGCC LEUKO1- CGGTGGTTCCGGTGACC
B5	13586	<i>chgh</i>	CG13586+ CGAGATTGCGAGTATATCC CG13586- CTTGCGACCCAGGGTATC
B6	13633	<i>ast</i>	AST1+ CTCCTTCACGCCACC AST1- GTCGGCCAGGCCAAAG
B7	13968	<i>lrlrfa</i>	CG13968+ GTTTCATTTGAAGCGGGAAC

			CG13968- GTTCTGTGTCTTTGGTGGG
B8	14049	<i>dilp6</i>	CG14049+ CTCAAAGTGCCGACGTCC CG14049- GCAAGAGCTCCCTGTAGG
B9	14167	<i>dilp3</i>	CG14167+ GGGCATCGAGATGAGGTG CG14167- CAGCTTGTTGCATGTTACTC
B10	14173	<i>dilp1</i>	CG14173+ CGGTGCAGCAGTACATGG CG14173- GTAGACAGTAGATGGCTAAC
B11	14734	<i>tk</i>	TK1+ CCTCTGAGCGGTTTGATAG TK1- CTCGAAAAGTGCTGTGTCG
B12	14919	<i>ast2</i>	AST2+ GTGCAGATATTATTGTGCTAC AST2- GGAGATGGGATTAAGTAGC
C1	15520	<i>capa</i>	CAPA1+ CGAGGATAACATCAGACCG CAPA1- CGACATTCAGAGTGTCAAAG
C2	17673	<i>acp</i>	ACP70+ CTATTCTTGTTTCTCGTTTG ACP70- GACATTTTGGTGGGTGGG
C3	17962	<i>z600</i>	Z600+ CGTCGACAAATGAAACCAAC Z600- GATGAAATTCTTATCAGCCTC
C4	18090	<i>dsk</i>	DSK1+ GCCACTCTGGCATTAGC DSK1- CCGAAACGCATGTGACCG
C5	18105	<i>eth</i>	ETH1+ CATGAGAATCATAACAGTCC ETH1- GGACCATTTTCAAGGTTCC
C6		<i>klu</i>	
C7	18619		
C8		<i>thio</i>	
C9		<i>fasy</i>	
C10		<i>sug</i>	
C11		<i>lipt1</i>	
C12		<i>lipt2</i>	
D1		<i>ppl</i>	
D2	8721		
D3	3350		
D4	11659		
D5	8693		
D6	4427		
D7		<i>phas1</i>	
D8	14205		
D9	6113		
D10		<i>inr</i>	
D11	Rot	<i>enok</i>	
D12	Lip3	<i>lip3</i>	
E1	2761		2761+ CGACGTCACCAGTCCAAG 2761- GTAGTGTAATGACGTTCAAAG
E2	3898		3898+ GATTGTGCTCTTATGAACGG 3898- CTGGCGGACGCATCTATG
E3	4269		4269+ CCTCGTCCGGGTACTTAG 4269- GCCAATCCATGCAGGAGC
E4	4681		4681+ GCAAGAACTTAGCCACCG 4681- GTTCTGGGAAACCATG
E5	4959		4959+ CATCTATTTGTACGAC 4959- GGCATAATCTTTCATCGAAC
E6	7564		7564+ GAACATCCTCACGCACGC 7564- GCGCTCACGGGAGTAGG
E7	7606		7606+ CATCCTGGTTGCCCTGAC 7606- GAAAGTTTGCAAATGTATCAG
E8	7682		7682+ CGCTCTTTCGCCTTCTC 7682- CCTCCCTGCTCAACTTCC

E9	8192		8192+ CAGCATTAGATAGAAGAAGAG 8192- CTTCTCCGCTCGTAGAG
E10	9548		9548+ CCAAACATCATCCGATTTG 9548- CTTGCGTTCGTAGAACAGG
E11	9759		9759+ GACAACGGAGACGGAACG 9759- CTAGATTTGTCTTTCTAAAAGG
E12	9782		9782+ GAGCTATTTTTGGCAGTTTTTC 9782- GCTCAAGTTGCGCTTCCG
F1	10143		10143+ GGCAAAGCGCAGATGACG 10143- CCTTTGTCTGACTATATTCTC
F2	10624		10624+ GTATTCTGCGGTATTACCAG 10624- CGCACCAGCTCAAATCGC
F3	10918		10918+ CGTGCCTACATTGCAATTAC 10918- CTATCCCGAACCCAGTAGTG
F4	11263		11263+ GGTATTTAAAGTAACTTAAGGC 11263- CTAGATCTGCTCGAGTTCC
F5	11562		11562+ CAACACAACCCGACAGCC 11562- CAACAGCGTAAATGATGCTG
F6	12012		12012+ GGCAGATACCCGTAAAGAC 12012- CTAGAAAACCGTTCCGCAG
F7	13212		13212+ GTCCTATTCCAGCCGTAAG 13212- CATGATTGAGGGCCAGATG
F8	13315		13315+ GTCTGCCACTAAGGTGAAC 13315- CTAATCACGGATATAGCTGC
F9	13352		13352+ CAGTGCTTCGGCGGCAG 13352- CTAGCTGTTGGCGTTGTAG
F10	13461		13461+ GCGATTGGTAATTGTGCTTG 13461- CGAGGAAAAGGGGCCTTG
F11	13488		13488+ GAGCTATCAGAATTTACTAGG 13488- GATTTGACGAATTCCTCAG
F12	13494		13494+ GACGGAACATCCTCATGG 13494- GGTGCAGTCCCCACAGC
G1	13600		13600+ GAAAAAGAACAAGCTGAAAATG 13600- GAAATCCGTGTTGTTTCGTAC
G2	13767		13767+ GAGGCTACCATTGAGCTG 13767- GTAAGCAATTCGGAACGAG
G3	13799		13799+ CTGGCCCTCAAGGAGTG 13799- CTAAGTGCATATCGGGG
G4	13968		13968+ GTTTCATTTGAAGCGGGAAC 13968- GTTCTGTGTCTTTGGTGGG
G5	13994		13994+ CCATAAGCAGAGCACGAAC 13994- GAGCTGCCCGTCTGCTC
G6	14383		14383+ GCCAAACCGTTTTCTTTGAC 14383- CTACAACATCTCGTTCATAAC
G7	14422		14422+ GATCTTCTACGGAGCTCTG 14422- GTTGCGGCGACGTTGG
G8	14659		14659+ GTCGAAAAGAAATATTGGG 14659- CTGATCAGCTGTTGCTTAG
G9	14865		14865+ GCTGGCTCCTTTGGACTG 14865- GCTTCGCTGTCGTCGGC
G10	14875		14875+ GGAAACAAATGGAATACACG 14875- GCTCATCGAATTCGAAGATG
G11	15067		15067+ GCCTGACGTTATTGGCGC 15067- CGCGAATATTGCAACCGAC
G12	15829		15829+ GCCCACCCTAAGTCTTAC 15829- CGTACTGGGGAGCGTAC

H1	16803		16803+ GAGAAATACAAGAAACACATG 16803- CAAGAATCCTATTTTCTTTAATC
H2	16815		16815+ GGAGAACTCATCGAGCTAC 16815- CAGCAGTGCTGGCCACC
H3	17124		17124+ GCGCGTGCTAAGCTCCG 17124- CAGGGTTTTTGCGGATC
H4	17567		17567+ GTGTCTTACGTTTTCCGG 17567- CGTTTATTGGGACATGTTGG
H5	17706		17706+ GATGACTTCTTGGCAAATC 17706- GGTCTGCGGGCTTCCG
H6	17738		17738+ GCGTTCCGCGATTTTGTTT 17738- CGAAGCCGCCTCCGTAG
H7	17931		17931+ CGAATGCTCGAAAAGCAGC 17931- GCACTTGCTATTGCTATTGC
H8	18081		18081+ GCACGTGGACACCAGAAG 18081- CCTCCTTCAGCTCATCGG
H9	18231		18231+ GAGGAAATCTTCATAACGAAC 18231- CATTGAGTACACTGTACTTAC
H10	18337		18337+ GATCCAAGCACAACCGAAG 18337- CACAATGTGTGTGTTCTTTTG
H11	18358		18358+ CTTCTATCCGCTGTTCATTC 18358- CATACTGATTACTCACCTCC
H12	-----		

6.3. Vergleiche der Expressionsprofile von P(9036) und P(6913)

Neben den oben beschriebenen Vergleichen der Expressionsprofile von P(9036)-Mutanten, *klumpfuss*-Überexpressionsmutanten und denen von unter verschiedenen Bedingungen gehungerten Wildtyp-Larven (siehe 3.3 Microarray-Analyse von *klumpfuss*-Mutanten) sollte ein entsprechender Vergleich mit den P(6913)-Fressmutanten weitere Einblicke in betroffene Stoffwechsel-Wege der P(9036)-Mutanten liefern. Die Motivation eines solchen Experiments lag wiederum in der Tatsache, dass in den P(9036)-Mutanten der primäre Defekt im ZNS der Larve auftritt, während in den P(6913)-Mutanten der Fettkörper das primär betroffene Organ darstellt.

Da dennoch beide Mutanten denselben Fress-Phänotypen zeigen, sollten durch Vergleiche der Expressionsprofile beider Mutanten Hinweise auf gemeinsam betroffene und deregulierte Stoffwechsel-Wege oder Signalkaskaden etc. gewonnen werden. Bei ähnlicher Auswertung der Affymetrix®-Rohdaten wie oben beschrieben (nur Gene mit *Increase*- oder *Decrease*-Bewertung in allen Einzelexperimenten, aber keine zusätzlichen Kriterien wie mindestens 2-fache Regulation oder entgegengesetzte Regulation) finden sich lediglich die in Abbildung 6.1 aufgelisteten Gene als in beiden Mutanten signifikant reguliert.

Name	P(9036)	P(6913)	(potenzielle) Funktion	H 4h	Z 4h	H 12h	Z 12h
CG18179	37.97	10.21	unbekannt	2.3	nc	nc	-13.3
CG17751	22.86	21.67	Transporter	nc	nc	nc	nc
CG7377	14.79	9.65	Strukturprotein	2.3	3.0	2.9	3.3
CG3599	11.30	6.52	Zelladhäsion	nc	nc	nc	nc
CG6271	11.03	2.05	Lipase	nc	-10.3	nc	-59.0
CG10918	6.23	17.03	unbekannt	8.8	9.0	37.0	64.6
Cyp12a5	6.10	2.69	Cytochrom P450	nc	-3.3	-2.3	-3.4
CG5550	5.55	5.68	Strukturprotein	nc	nc	-2.4	-2.5
CG6839	4.63	3.47	Deoxyribonuklease	nc	nc	nc	nc
CG6762	4.36	1.92	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG18331	4.05	2.29	unbekannt	2.3	2.0	21.5	11.4
CPTI	3.79	2.72	Palmitoyltransferase	5.0	nc	nc	nc
Cyp28d1	3.55	2.76	Cytochrom P450	3.0	nc	nc	nc
CG13805	3.29	2.89	Transporter	2.0	nc	nc	nc
CG13737	3.05	2.67	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG8689	2.94	4.18	I-Maltase	nc	nc	nc	nc
CG17527	2.94	4.45	Glutathion-Transferase	nc	nc	nc	nc
CG5470	2.72	2.05	unbekannt	nc	nc	1.2	nc
CG18316	2.57	3.13	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG13315	2.49	1.77	unbekannt	nc	21.0	nc	7.0
Cyp4p2	2.47	2.83	Cytochrom P450	2.0	nc	nc	nc
CG6830	2.29	2.66	unbekannt	nc	nc	-2.8	-3.8
CG18349	2.29	4.41	unbekannt	nc	nc	-10.6	-9.6
CG5770	2.06	3.46	unbekannt	nc	nc	nc	2.8
CLIP-190	1.83	1.56	Restin	nc	nc	nc	nc
CG3106	-1.73	-1.38	Transmembran-Protein	nc	nc	-2.7	nc
CG4919	-1.83	-2.05	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG8468	-2.37	-1.79	Carboxylat-Transporter	nc	-5.7	nc	nc
CG11716	-2.58	-1.40	unbekannt	nc	-2.0	nc	nc
CG3678	-2.65	-1.75	unbekannt	nc	-3.3	-2.3	-3.4
CG3348	-2.73	-2.10	unbekannt	nc	22.7	-12.0	nc
CG3902	-2.73	-1.71	Enzym	-2.0	-3.3	nc	-3.1
CG5992	-2.76	-2.13	Enzym	-2.8	-6.3	nc	-2.6
CG12157	-3.18	-2.03	unbekannt	nc	-2.0	-6.9	nc
CT2823	-3.26	-1.91	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG11413	-3.32	-3.19	unbekannt	nc	nc	-2.0	nc
CG3819	-4.24	-28.32	unbekannt	nc	nc	nc	nc
CG3949	-4.99	-1.68	unbekannt	-12.8	-7.3	-15.5	-12.5
CG3292	-19.77	-14.69	Alkalische Phosphatase	nc	-2.0	-19.3	-15.2

Abbildung 6.1 Vergleich der Expressionsprofile von P(9036)- und P(6913)-Mutanten

Aus den Affymetrix®-Microarray-Experimenten „P(9036) gegen Wildtyp“ und „P(6913) gegen Wildtyp“ wurden alle Gene aussortiert, welche sowohl in allen P(9036)-Einzelexperimenten als auch in allen P(6913)-Einzelexperimenten eine *Increase*- oder *Decrease*-Bewertung erhalten hatten. Von diesen in P(9036) und P(6913) gemeinsam betroffenen Genen wurden entsprechende Werte aus Expressionsprofilen von Wildtypplarven unter verschiedenen Hungerbedingungen (Zinke et al., 2002) mit aufgelistet. Zahlenwerte stehen für x-fache Regulation, rote Hinterlegung bedeutet Herunterregulation, grüne Hinterlegung bedeutet Hochregulation.

Durch die Farbcodierung fällt sofort auf, dass kein einziges Gen in den beiden Fressmutanten in unterschiedliche Richtungen dereguliert ist. Dagegen finden sich einige Gene, welche in den Fressmutanten (trotz des durch den Fress-Phänotypen induzierten Hungerzustandes) entgegen der wildtypischen Regulation bei Hungern dereguliert sind. Andere Gene wiederum sind wildtypisch unter Hunger nicht reguliert, zeigen aber (wie z.B. CG17751, zweites von oben in Abb. 6.1)) deutliche Regulation in P(9036) und P(6913).

Expressionsanalysen und weiterführende Experimente wie z.B. Expressionprofil-Vergleiche auch mit der dritten Fressmutante P(9373) mögen helfen, die mutante Situation wie auch die wildtypische Regulation der Nahrungsaufnahme besser zu verstehen.