

**Funktionelle neuroanatomische Analyse eines  
nahrungsabhängigen Schaltkreises in *Drosophila  
melanogaster***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Marc Peters**

aus

Bad Friedrichshall

Bonn 2013



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Pankratz

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Hoch

Tag der Promotion: 18.04.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Diese Dissertation ist 2014 auf dem Hochschulschriftenserver der

ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.



## Zusammenfassung

Eine weltweit zunehmende Fehlernährung und die damit verbundenen Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes haben die Aufklärung neuropeptiderger Systeme vorangetrieben, die an einer Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind. Das zentrale Nervensystem übernimmt eine übergeordnete Rolle bei der Koordination dieser Systeme. In *Drosophila melanogaster* wurde eine Gruppe von 20 Neuronen identifiziert, die an der Steuerung des Fressverhaltens beteiligt sind. Diese Neurone exprimieren *hugin*, das für zwei Neuropeptide, Hugin $\gamma$  und Pyrokinin-2, kodiert. Aus *In vitro* Untersuchungen war bekannt, dass beide Neuropeptide zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, CG8795 und CG8784, aktivieren. Die Analyse der potentiellen Hugin-Rezeptoren ermöglichte im Verlauf dieser Arbeit eine Aufklärung der Morphologie und der nahrungsabhängigen Funktion des Hugin-Schaltkreises.

Die bisher unbekanntes Expressionsmuster von CG8795 und CG8784 konnten in *Drosophila*-Larven durch die Erzeugung transgener Fliegen visualisiert werden. CG8795 wurde in einer Subpopulation der Hugin-Neurone exprimiert, woraus eine autokrine Funktion von Hugin gefolgert wurde. *In vivo* Aufnahmen zeigten eine Expression von CG8784 in sensorischen Rezeptorneuronen der Geschmacksorgane. Gustatorische Informationen werden im Suboesophagialganglion, einem Areal des Gehirns, prozessiert. Mit Hilfe der GRASP-Methode (*GFP reconstitution across synaptic partners*) konnte eine Kontaktaufnahme gustatorischer Rezeptorneurone mit den Hugin-Neuronen nachgewiesen werden. Für Pyrokinin-2 war eine muskelstimulatorische Funktion bekannt und ausgehend vom ventralen Nervensystem war die Verbindung der CG8784-Neurone mit Muskeln des Hautmuskelschlauchs erkennbar. Durch die optogenetische Untersuchung der neuronalen Aktivität im ventralen Nervensystem konnte eine CG8784-vermittelte modulatorische Funktion von Hugin auf die larvale Fortbewegung angenommen werden. Neuronale Projektionen einer Subpopulation der Hugin-Neurone führen in den übergeordneten Hirnbereich, das Protocerebrum. Entlang dieser Projektionsbahnen wurde ein direkter Kontakt mit neurosekretorischen Zellen nachgewiesen, die eine Expression von CG8784 zeigten und als Insulin-produzierende Zellen identifiziert wurden. Nach der Aufnahme proteinreicher Nahrung wird aus diesen Zellen das Insulin-Homolog *Drosophila Insulin-like peptide* Dilp2 freigesetzt, was eine erhöhte systemische Insulin-Signalkaskade zur Folge hat. Unter Hungerbedingungen wird Dilp2 im Wildtyp zurückgehalten. Durch die lokale Überexpression von CG8784 in den Insulin-produzierenden Zellen konnte in dieser Arbeit eine erhöhte Freisetzung von Dilp2 induziert werden. Mittels einer Deletion der genregulatorischen Region wurde eine Nullmutante von CG8784 erzeugt, die eine weiterführende funktionelle Untersuchung des potentiellen Hugin-Rezeptors ermöglicht. Aus den vorliegenden Analysen konnte eine nahrungsabhängige, regulatorische Funktion der Hugin-Signalkaskade auf die Energiehomöostase abgeleitet werden.



# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Neuroendokrine Systeme in Wirbeltieren und Insekten . . . . .            | 1         |
| 1.2      | Das Insulin-abhängige System in <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . . | 3         |
| 1.3      | Chemosensorik in <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .                | 5         |
| 1.4      | Anatomie der chemosensorischen Organe . . . . .                          | 5         |
| 1.5      | Wahrnehmung von Süß- und Bitterstoffen . . . . .                         | 7         |
| 1.6      | Morphologie der Hugin-Neurone . . . . .                                  | 8         |
| 1.7      | Funktion der Hugin-Neurone auf das Fressverhalten . . . . .              | 9         |
| 1.8      | Die potentiellen Hugin-Rezeptoren CG8795 und CG8784 . . . . .            | 11        |
| 1.9      | Zielsetzung . . . . .  | 13        |
| <b>2</b> | <b>Material</b>  | <b>15</b> |
| 2.1      | Stämme und Linien . . . . .  | 15        |
| 2.1.1    | Bakterienstämme . . . . .  | 15        |
| 2.1.2    | Fliegenstämme . . . . .  | 15        |
| 2.2      | Antikörper . . . . .   | 17        |
| 2.3      | Oligonukleotide . . . . .  | 18        |
| 2.3.1    | PCR-Primer . . . . .   | 18        |
| 2.3.2    | qPCR-Primer . . . . .  | 19        |
| 2.3.3    | Sonden . . . . .   | 19        |
| 2.4      | Vektoren und Plasmide . . . . .  | 20        |
| 2.5      | Enzyme . . . . .   | 21        |
| 2.6      | Kits . . . . .   | 21        |
| 2.7      | Puffer und Medien . . . . .  | 22        |
| 2.8      | Reagenzien . . . . .   | 23        |
| 2.9      | Geräte und Werkzeuge . . . . .   | 25        |
| 2.10     | Verbrauchsmaterialien . . . . .  | 26        |
| 2.11     | Computerprogramme . . . . .  | 27        |
| <b>3</b> | <b>Methoden</b>  | <b>29</b> |
| 3.1      | Fliegenhaltung . . . . .   | 29        |
| 3.2      | molekularbiologische Methoden . . . . .                                  | 29        |
| 3.2.1    | DNS-Extraktion aus <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .              | 29        |

## Inhaltsverzeichnis

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.2.2  | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 29 |
| 3.2.3  | Klonierung und Transformation   | 31 |
| 3.2.4  | Plasmidisolierung aus Bakterien   | 32 |
| 3.2.5  | Restriktionsverdau von Plasmid-DNS  | 33 |
| 3.2.6  | Aufreinigung von Plasmid-DNS durch Alkohol-Fällung  | 33 |
| 3.2.7  | Agarosegel-Elektrophorese   | 33 |
| 3.2.8  | Isolierung von DNS aus Agarosegelen   | 34 |
| 3.2.9  | Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien  | 34 |
| 3.2.10 | Sondenherstellung durch <i>In vitro</i> Transkription   | 35 |
| 3.2.11 | Isolierung von RNS  | 35 |
| 3.2.12 | cDNS-Synthese durch Reverse Transkription   | 35 |
| 3.2.13 | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)   | 36 |
| 3.3    | <i>In vivo</i> und <i>Ex vivo</i> Aufnahmen und Färbemethoden   | 37 |
| 3.3.1  | <i>In vivo</i> Aufnahmen von Larven   | 37 |
| 3.3.2  | <i>Ex vivo</i> Aufnahmen von Larvengehirnen   | 37 |
| 3.3.3  | <i>Ex vivo</i> Aufnahmen pharyngealer Nerven  | 38 |
| 3.3.4  | Fixierung von Geweben   | 38 |
| 3.3.5  | Fluoreszenz <i>In situ</i> Hybridisierung (FISH) und histochemische <i>In situ</i> Hybridisierung                       | 39 |
| 3.3.6  | Immunhistochemische Färbungen   | 40 |
| 3.4    | <i>In silico</i> Methoden zur Fluoreszenzauswertung   | 41 |
| 3.4.1  | Quantitative Bestimmung der intrazellulären <i>Drosophila Insulin-like peptide</i> Dilp2-Konzentration                  | 41 |
| 3.4.2  | Optische Auswertung von Aktionspotentialen  | 43 |
| 3.5    | Gentechnische Methoden  | 44 |
| 3.5.1  | Erzeugung von transgenen Linien   | 44 |
| 3.5.2  | Probenvorbereitung  | 45 |
| 3.5.3  | Injektion   | 45 |
| 3.5.4  | Selektion von Transgenen  | 46 |
| 3.5.5  | Chromosomenlokalisierung  | 47 |
| 3.5.6  | Fliegenkreuzungen   | 48 |
| 3.5.7  | Genexpression durch Verwendung binärer Systeme  | 48 |
| 3.5.8  | Aufklärung der Verbindung neuronaler Subpopulationen durch GRASP ( <i>GFP-reconstitution across synaptic partners</i> ) | 50 |



*Inhaltsverzeichnis*

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.5.9    | Erzeugung einer Deletionsmutante durch eine Hitzeschock-induzierte Trans-Rekombination . . . . .                | 52         |
| 3.5.10   | Identifizierung einer Deletionsmutante durch PCR . . . . .  | 53         |
| 3.5.11   | Selektion von Deletionsmutanten mit letalem Phänotyp . . . . .  | 55         |
| 3.5.12   | Fliegenkreuzungen zum Austausch eines letalen Allels durch Crossover . . . . .                                  | 55         |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>59</b>  |
| 4.1      | Untersuchung des Expressionsmusters der Hugin-Rezeptoren . . . . .  | 60         |
| 4.1.1    | Insulin-produzierende Zellen sind Teil des CG8784-Expressionsmusters . . . . .                                  | 63         |
| 4.1.2    | CG8795 wird in einer Subpopulation der Hugin-Neurone exprimiert . . . . .                                       | 65         |
| 4.1.3    | Ein Hitzeschock-Minimalpromotor verändert das Expressionsmuster von CG8795 . . . . .                            | 68         |
| 4.1.4    | Zielgewebe der Hugin-Neurone zeigen eine CG8784-Expression . . . . .  | 70         |
| 4.1.5    | Die Körperwandmuskulatur wird von CG8784-Neuronen innerviert . . . . .  | 72         |
| 4.1.6    | CG8784 wird in gustatorischen Rezeptorneuronen exprimiert . . . . .   | 75         |
| 4.2      | Aufklärung der Konnektivität des Hugin-abhängigen neuronalen Netzwerks . . . . .                                | 79         |
| 4.2.1    | Das Expressionsmuster der Hugin-LexA Promotorlinien . . . . .   | 80         |
| 4.2.2    | Kontakt der Hugin-Neurone mit gustatorischen Rezeptorneuronen . . . . .   | 83         |
| 4.2.3    | Projektionen der Hugin-Neurone stellen eine Verbindung zu den medianen neurosekretorischen Zellen her . . . . . | 83         |
| 4.3      | Deletion des potentiellen Promotorbereichs der Hugin-Rezeptoren . . . . .                                       | 86         |
| 4.3.1    | Verminderte CG8784-Expression in der Deletionsmutante Del49 . . . . .   | 89         |
| 4.4      | Die ubiquitäre Überexpression von CG8784 verursacht Entwicklungsdefekte . . . . .                               | 92         |
| 4.5      | Überexpression von CG8784 in Hugin-Neuronen und den IPCs . . . . .  | 93         |
| 4.6      | CG8784-Überexpression in den IPCs beeinflusst die Dilp2-Konzentration . . . . .                                 | 95         |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>101</b> |
| 5.1      | Expressionsmuster von CG8795 und CG8784 . . . . .   | 102        |
| 5.2      | Hinweis auf eine Hugin-abhängige Regulation der larvalen Fortbewegung durch CG8784 . . . . .                    | 103        |
| 5.3      | Potentieller Einfluss von Hugin auf das Verdauungssystem aufgrund der CG8784-Expression . . . . .               | 104        |
| 5.4      | Kontakt der Hugin-Neurone mit gustatorischen GR66a-Rezeptorneuronen . . . . .                                   | 106        |
| 5.5      | CG8784-vermittelte Funktion der Hugin-Neurone auf die Insulin-produzierenden Zellen . . . . .                   | 107        |

*Inhaltsverzeichnis*

|   |            |
|---|------------|
| 5.6 Funktion des neuronalen Hugin-Schaltkreises . . . . . | 109        |
| <b>Literaturverzeichnis</b>                               | <b>111</b> |
| <b>Danksagung</b>   | <b>127</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.1  | Das Projektionsmuster der Insulin-produzierenden Zellen . . . . .                                      | 4  |
| 1.2  | Das cephalo chemosensorische System in <i>Drosophila</i> -Larven . . . . .                             | 6  |
| 1.3  | Das Expressionsmuster der Hugin-Neurone in <i>Drosophila</i> -Larven . . . . .                         | 9  |
| 1.4  | Modell von Hugin als Modulator des Fressverhaltens . . . . .   | 10 |
| 1.5  | Der Genbereich von CG8795 und CG8784 . . . . .   | 12 |
| 3.1  | Bestimmung der Immunfluoreszenz . . . . .  | 42 |
| 3.2  | Kreuzungsschema der Chromosomenlokalisierung . . . . .   | 47 |
| 3.3  | Die binären Expressionssysteme Gal4-UAS und LexA-LexAop . . . . .                                      | 49 |
| 3.4  | Kreuzungsschema für GRASP (GFP reconstitution across synaptic partners) . .                            | 50 |
| 3.5  | Kreuzungsschema zur Erzeugung einer Deletionsmutante . . . . .   | 52 |
| 3.6  | Screen der Deletionsmutanten . . . . .   | 54 |
| 3.7  | Austausch des Letalfaktors Del49 <sup>letal</sup> . . . . .  | 56 |
| 4.1  | Der Promotorbereich von CG8795 und CG8784 . . . . .  | 60 |
| 4.2  | Übersicht der Vektorkonstrukte und des untersuchten Expressionsmusters . . . .                         | 62 |
| 4.3  | Das Expressionsmuster von CG8784 im larvalen Gehirn . . . . .  | 64 |
| 4.4  | Das Expressionsmuster von CG8795 im larvalen Gehirn . . . . .  | 66 |
| 4.5  | Vergleich der Expressionsmuster von Hugin und CG8795 . . . . .   | 67 |
| 4.6  | Das Expressionsmuster von hugR95.6hsp-Gal4 im larvalen Gehirn . . . . .                                | 69 |
| 4.7  | Vergleich des Expressionsmusters der drei 6kb-Promotorkonstrukte . . . . .                             | 70 |
| 4.8  | Das vollständige Expressionsmuster von CG8784 in Larven . . . . .                                      | 71 |
| 4.9  | Der genetisch kodierte Ca <sup>2+</sup> Indikator GCamp3 . . . . .                                     | 73 |
| 4.10 | CG8784-Neurone im VNS vermitteln Kontakt zur Muskulatur des Hautmuskelschlauchs . . . . .              | 74 |
| 4.11 | Das Expressionsmuster von CG8784 im larvalen Kopfbereich . . . . .                                     | 76 |
| 4.12 | Das Projektionsmuster von CG8784 in den pharyngealen Nerven . . . . .                                  | 78 |
| 4.13 | GRASP (GFP-reconstitution across synaptic partners) . . . . .  | 79 |
| 4.14 | Untersuchung des Expressionsmusters der Hugin-LexA Promotorlinien . . . . .                            | 81 |
| 4.15 | Kontakt der GR66a-Rezeptorneurone mit Hugin-Neuronen im Suboesophagealganglion . . . . .               | 84 |
| 4.16 | Untersuchung der Konnektivität der Hugin-Neurone mit den medianen neurosekretorischen Zellen . . . . . | 85 |
| 4.17 | Konnektivität der Hugin-Neurone im Protocerebrum . . . . .   | 87 |
| 4.18 | Erzeugung einer Deletionsmutante des Promotorbereichs der Hugin-Rezeptoren .                           | 88 |

## Abbildungsverzeichnis

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.19 | Quantitative Analyse der Expression von CG8784 und CG8795 . . . . .                              | 89  |
| 4.20 | Bestätigung der Deletion des intergenen Bereichs der Hugin-Rezeptoren . . . . .                  | 90  |
| 4.21 | Untersuchung der Deletionsmutanten auf Expression von CG8784 und CG8795 . . . . .                | 91  |
| 4.22 | Untersuchung der Funktionalität der CG8784-Überexpressionslinie . . . . .                        | 93  |
| 4.23 | Untersuchung der lokalen Überexpression von CG8784 durch <i>In Situ</i> Hybridisierung . . . . . | 94  |
| 4.24 | Nahrungsabhängige Veränderung der Dilp2-Konzentration in den IPCs . . . . .                      | 96  |
| 4.25 | Die Überexpression von CG8784 in den Insulin-produzierenden Zellen . . . . .                     | 97  |
| 4.26 | Einfluss der CG8784-vermittelten Hugin-Signalkaskade auf die Dilp2-Sekretion . . . . .           | 98  |
| 5.1  | Der Hugin-abhängige neuronale Schaltkreis . . . . .  | 109 |
| 5.2  | CG8784-vermittelte nahrungsabhängige Funktion der Hugin-Signalkaskade . . . . .                  | 110 |

# Abkürzungsverzeichnis

|  |   |
|--|---|
| °C   | Grad Celsius  |
| <i>adh</i> (AUG)   | Startcodon einer Alkoholdehydrogenase   |
| AEL  | nach der Eiablage (engl.: <i>after egg laying</i> )   |
| AKH  | Adipokinetisches Hormon   |
| AN   | Antennalnerv  |
| At   | Aorta   |
| BAC  | künstliches Bakterienchromosom (engl.: <i>bacterial artificial chromosome</i> )                 |
| BDSC   | Bloomington Drosophila Stock Center   |
| BPRC   | BACPAC Resource Center  |
| bp   | Basenpaare  |
| CA   | <i>Corpora allata</i>   |
| CaM  | Calmodulin  |
| CC   | <i>Corpora cardiaca</i>   |
| cDNS   | komplementäre DNS   |
| cm   | Zentimeter  |
| CPM  | Cephalopharyngeale Muskulatur   |
| CPS  | Cephalopharyngeales Skelett   |
| CyO/Cy   | Balancerchromosom (engl.: <i>Curly of Oster</i> ) mit Marker <i>Curly</i>                       |
| Dr   | Marker <i>Drop</i>  |
| dATP   | Desoxy-Adenosintriphosphat  |
| Dilp   | Insulin-Homolog in <i>Drosophila</i> (engl.: <i>Drosophila insulin-like peptide</i> )           |
| DGRC   | Drosophila Genome Research Center   |
| DNS  | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTP   | Desoxy-Nukleosidtriphosphat   |
| DO   | Dorsalorgan   |
| DOG  | Dorsalorganganglion   |
| DPS  | Dorsales pharyngeales Sinnesorgan   |
| e  | Marker <i>ebony</i>   |
| eYFP   | verbessertes gelb fluoreszierendes Protein (engl.: <i>enhanced yellow fluorescent protein</i> ) |
| F  | Foramen   |
| F <sub>0</sub>   | Parentalgeneration  |
| F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub> /F <sub>3</sub> /F <sub>4</sub> | erste/zweite/dritte/vierte Filialgeneration   |
| F <sub>G</sub>   | Grundfluoreszenz  |
| F <sub>I</sub>   | Fluoreszenzintensität   |
| FK   | Frontalkonnektiv  |
| FNV  | Frontale Nervenverbindung   |
| FRT  | FLP-Rekombinase-Zielsequenz   |
| g  | Vielfaches der Erdbeschleunigung  |
| GABA   | γ-Aminobuttersäure  |

|  |   |
|--|---|
| GECI   | Genetisch kodierter Ca <sup>2+</sup> -Indikator   |
| GFP  | grün fluoreszierendes Protein (engl.: <i>green fluorescent protein</i> )                          |
| GPCR   | G-Protein-gekoppelter Rezeptor  |
| GR   | Gustatorischer Rezeptor   |
| GRASP  | engl.: <i>GFP reconstitution across synaptic partners</i>   |
| GRN  | gustatorisches Rezeptorneuron   |
| h  | Stunde(n)   |
| hsFLP  | Hitzeschock-aktivierbare Flp-Rekombinase  |
| IGF  | Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (engl.: <i>insulin-like growth factor</i> )                     |
| IIS  | Signalkaskade von Insulin und Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren<br>kurz: Insulin-Signalkaskade  |
| Imp-L2   | engl.: <i>imaginal morphogenesis-protein-late 2</i>   |
| IPC  | Insulin-produzierende Zelle   |
| kb   | Kilobasenpaar(e)  |
| L1/L2/L3   | Bezeichnung des ersten, zweiten und dritten Entwicklungsstadiums von<br><i>Drosophila</i> -Larven |
| LAL  | larvaler Antennallobus  |
| μl   | Mikroliter  |
| LBN  | Labialnerv  |
| LN   | Labralnerv  |
| M13  | leichte Kette einer Myosinkinase  |
| μm   | Mikrometer  |
| min  | Minute(n)   |
| ml   | Milliliter  |
| MN   | Maxillarnerv  |
| mNSC   | Mediane neurosekretorische Zelle  |
| mRNS   | Boten-RNS   |
| NmU  | Neuromedin U  |
| NMU1R/NMU2R  | Neuromedin U-Rezeptor 1/2   |
| NSC  | Neurosekretorische Zelle  |
| nt   | Nukleotid(e)  |
| Oe   | Oesophagus  |
| OR   | olfaktorischer Rezeptor   |
| ORN  | olfaktorisches Rezeptorneuron   |
| P <sub>D</sub> /P <sub>L</sub> /P <sub>M</sub> /P <sub>V</sub> | Zellgruppen im Protocerebrum mit Lage: dorsal, lateral, medial oder ventral                       |
| PaN  | Akzessorischer Prothorakalnerv  |
| PC (IPC/rPC)   | Protocerebrum (linke/rechte Hemisphäre)   |
| PCR  | Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )                              |
| PI   | <i>Pars Intercerebralis</i>   |
| PK-2   | Hugin-Spaltprodukt Pyrokinin-2  |
| PL   | <i>Pars lateralis</i>   |
| PPS  | Posteriores pharyngeales Sinnesorgan  |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| qPCR                           | quantitative PCR  |
| RD                             | Ringdrüse   |
| RFP                            | rot fluoreszierendes Protein (engl.: red fluorescent protein) |
| RN                             | Rekurrenter Nerv  |
| RNS                            | Ribonucleinsäure  |
| RT                             | Raumtemperatur  |
| S <sub>L</sub> /S <sub>V</sub> | Zellgruppen im SOG mit Lage: lateral oder ventral             |
| Sb                             | Marker <i>Stubble</i>   |
| sek                            | Sekunde(n)  |
| sNPF                           | engl.: <i>short Neuropeptide F</i>                            |
| SNS                            | Stomatogastrisches Nervensystem                               |
| SOG                            | Suboesophagialganglion  |
| Sp                             | Marker <i>Sternopleural</i>                                   |
| t                              | Zeit (engl.: <i>time</i> )                                    |
| Tb                             | Marker <i>Tubby</i>   |
| T <sub>M</sub>                 | Schmelztemperatur   |
| TM2/TM3/TM6                    | Balancerchromosomen (engl.: <i>Third Multiple 2/3/6</i> )     |
| TO                             | Terminalorgan   |
| TOG                            | Terminalorganganglion   |
| Upm                            | Umdrehungen pro Minute  |
| VNS                            | Ventrales Nervensystem  |
| VO                             | Ventralorgan  |
| VPS                            | Ventrales pharyngeales Sinnesorgan                            |
| ZNS                            | Zentrales Nervensystem  |





# 1 Einleitung

Tiere sind in der Lage die Nahrungsaufnahme und entsprechende nahrungsabhängige Verhaltensmuster an die körperlichen Bedürfnisse anzupassen. Auf diese Weise stellen sie die energetische Versorgung des Organismus sicher, die für Bewegung, Wachstum, Reproduktion und verschiedene metabolische Vorgänge benötigt wird. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase werden interne Informationen über die Nährstoffanforderungen des Organismus mit externen Informationen über mögliche Futterquellen abgeglichen. Die Qualität der zur Verfügung stehenden Nahrung und der interne Energiebedarf sind ausschlaggebend darüber, ob eine Nahrungsquelle akzeptiert oder abgelehnt wird. Darüberhinaus ist der energetische Zustand ein entscheidender Faktor das Risiko der Nahrungssuche und -aufnahme einzugehen, da stets die Gefahr besteht selbst ein Opfer möglicher Raubfeinde zu werden oder toxische Substanzen aufzunehmen.

Neuronale Netzwerke im zentralen Nervensystem verarbeiten die verschiedenen externen und internen Informationen und setzen sie in spezifische Verhaltensmuster um. Hochkonservierte, neuropeptiderge Systeme spielen dabei eine übergeordnete Rolle.

Die Aufklärung von Neuropeptiden und -hormonen, die einen Einfluss auf das Verhalten zur Nahrungsaufnahme und die Energiehomöostase haben, ist in Zeiten einer weltweit zunehmenden Fehlernährung deutlich in den Vordergrund gerückt. Sie bieten eine Möglichkeit, die Ursachen moderner Zivilisationskrankheiten, wie Adipositas, aufzuklären und zu therapieren, deren Folgen Herz- und Lungenerkrankungen, Krebs und Diabetes sein können.

## 1.1 Neuroendokrine Systeme in Wirbeltieren und Insekten

In allen Lebewesen mit Nervensystem findet man neurosekretorische Zellen (NSCs), eine ursprüngliche Form spezialisierter Nervenzellen, in denen Neuropeptide und -hormone gebildet und als Reaktion auf eingehende neuronale Reize freigesetzt werden. Die Freisetzung kann in den Synapsen, aber auch entlang der Zellkörper und der Nervenbahnen erfolgen, so dass umliegende Zellen und Gewebe direkt adressiert werden (Hartenstein [2006]).

In höher entwickelten Organismen sind die NSCs Teil neuroendokriner Systeme und nehmen eine wichtige Bindestelle zwischen neuronalen und hormonellen Regulationsmechanismen ein (Shiga [2003]). Die NSCs stehen über neuronale Projektionsbahnen mit Neurohämälorganen in Verbindung. In diese verdickten, axonalen Strukturen werden die Neurosekrete gespeichert und bei Bedarf in die Blutbahn oder das Hämolympsystem abgegeben. So können auch entfernte, Hormon-produzierende Drüsen oder Zielgewebe adressiert werden (De Velasco et al. [2004]; Shiga [2003]; Eckert et al. [2000]).

## 1 Einleitung

In Wirbeltieren findet man neuroendokrine Zellen als Teil des autonomen Nervensystems. Eine zentrale, übergeordnete Funktion erfüllt allerdings das Hypothalamus-Hypophysen-System des zentralen Nervensystems (ZNS). Die NSCs liegen in verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus und stehen über den Hypophysenstiel mit dem Hypophysenhinterlappen, der Neurohypophyse, in Verbindung, die als Neurohämalorgan fungiert. Die Adenohypophyse, der anteriore Teil der Hypophyse, ist ein endokrines Organ, dessen Hormonsekretion über Neurohormone aus dem Hypothalamus inhibiert oder angeregt werden kann (De Velasco et al. [2004]; Munk [2002]; Eckert et al. [2000]; Hartenstein [2006]).

Bei Insekten übernimmt ein Komplex aus paarig angelegten neuroendokrinen Organen diese übergeordnete Funktion. Sie werden als *Corpora Cardiacia* (CC) und *Corpora Allata* (CA) bezeichnet. Ähnlich wie die Hypophyse fungieren auch sie als Neurohämalorgan und als Hormondrüse. Der CC/CA-Komplex liegt außerhalb des ZNS und steht mit NSCs in verschiedenen Bereichen des Gehirns über die *nervi corporis cardiaci* in Verbindung. Als anatomische Besonderheit sind in Dipteren-Larven CC und CA mit Zellen eines dritten endokrinen Organs, der Prothoraxdrüse, zu einem großen neuroendokrinen Organ fusioniert, das als Ringdrüse (RD) bezeichnet wird (Abbildung 1.1). Sie liegt dorsal zwischen den beiden Hemisphären des ZNS, dem Protocerebrum (PC), und umschließt die anteriore Spitze der dorsal liegenden Aorta (King et al. [1966]; Siegmund und Korge [2001]; Shiga [2003]; de Velasco et al. [2007]).

Die meisten NSCs des ZNS liegen in einem dorsomedialen Bereich des PCs. Sie sind in diesem Bereich als Cluster angeordnet und in zwei morphologisch unterscheidbaren Bereiche, *Pars Intercerebralis* (PI) und *Pars Lateralis* (PL), unterteilt. Die Verbindung von PI/PL mit dem CC/CA-Komplex in Insekten ist in ihrer Organisation und ihrer Funktion als übergeordnetes, neuroendokrines System mit dem Hypothalamus-Hypophysen-System in Vertebraten vergleichbar (De Velasco et al. [2004]; Shiga [2003]; Buch und Pankratz [2009]; de Velasco et al. [2007]; Hartenstein [2006]; Siegmund und Korge [2001]; Altstein und Nässel [2010]). Insekten stellen somit wichtige Modellorganismen dar, mit deren Hilfe es möglich ist die komplexen Zusammenhänge biochemischer Interaktionen neuronaler und neurohormonaler Netzwerke und deren Wirkung in biologischen Systemen zu untersuchen. Insbesondere der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* ist dabei in jüngster Zeit, nicht zuletzt aufgrund seiner einfachen genetischen Zugänglichkeit, stark in den Vordergrund gerückt.

## 1.2 Das Insulin-abhängige System in *Drosophila melanogaster*

Das System aus PI/PL und CC/CA spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Metabolismus und wird auch als Analog zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen der Langerans Inselzellen des Pankreas angesehen. In Säugetieren und in Insekten übernehmen Insuline und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (engl.: *Insulin-like growth factors* (IGFs)) eine wichtige übergeordnete Funktion. Sie regulieren verschiedene biologische Vorgänge, wie Wachstum, Metabolismus, Lebensdauer und Fressverhalten. Während in Säugetieren die Funktionen der Insuline und der IGFs getrennt sind, werden sie in *Drosophila* durch eine einzige Insulin/IGF-Signalkaskade (IIS) koordiniert. Dennoch sind beide Systeme auf molekularer Ebene und in ihrer Funktion hochkonserviert (Rulifson et al. [2002]; Lee und Park [2004]; Ikeya et al. [2002]; Broughton et al. [2005]; Wu und Brown [2006]; Baker und Thummel [2007]; Porte et al. [2005]).

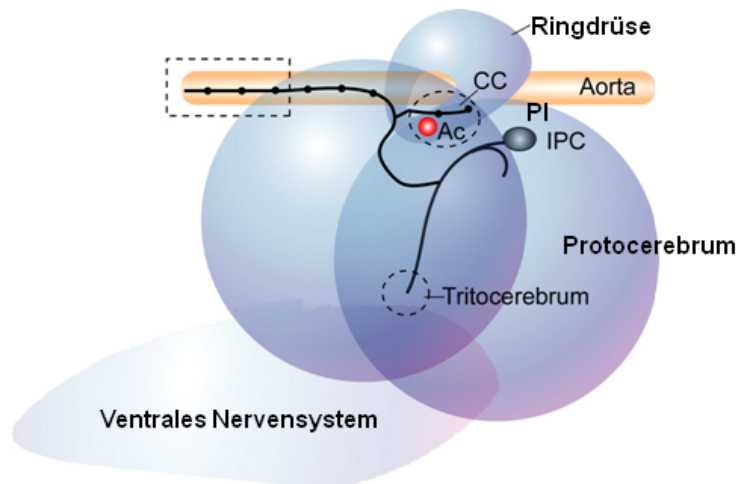
In *Drosophila* konnten bislang acht Homologe des menschlichen Insulins bzw. der IGFs durch Sequenzvergleiche nachgewiesen werden. Sie werden als Dilps (*Drosophila insulin-like peptides*) bezeichnet und sind entwicklungspezifisch in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Für alle Dilps ist in *Drosophila* bislang nur ein Insulin-Rezeptor bekannt, der die IIS intrazellulär vermittelt (Brogiolo et al. [2001]; Ikeya et al. [2002]; Rulifson et al. [2002]; Colombani et al. [2012]; Garelli et al. [2012]).

Drei der Insulin-Homologe, Dilp2, 3 und 5, werden in den medianen neurosekretorischen Zellen (mNSCs) des *Pars Intercerebralis* (PI) gebildet. Diese Insulin-produzierenden Zellen (IPCs) sind im larvalen Gehirn bilateralsymmetrisch als Cluster von je sieben Zellen pro Hemisphäre angeordnet. Die IPCs sind mit den CC-Zellen der Ringdrüse und der Aorta verbunden, über die eine Freisetzung der Dilps in die Hämolymphe möglich ist und auf eine endokrine Funktion schließen lässt. Ausgehend von den Zellkörpern führen neuronale Projektionen überdies in das Protocerebrum und in einen Grenzbereich des SOGs, der auch als larvales Tritocerebrum bezeichnet wird (Abbildung 1.1). Eine Zerstörung der IPCs in Larven führt zu Wachstumsdefekten, kleinwüchsigen Adulten, einem erhöhten Zuckerspiegel in der Hämolymphe und zu erhöhten Glykogen- und Lipidwerten (Rulifson et al. [2002]; Brogiolo et al. [2001]; Ikeya et al. [2002]; Bader et al. [2007a]; Belgacem und Martin [2006]; Broughton et al. [2005]; Nässel und Winther [2010]).

In den CC-Zellen der Ringdrüse wird das adipokinetische Hormon (AKH) gebildet (Abbildung 1.1). Bei der Regulation des Blutzuckerspiegels fungiert dieses antagonistisch zu den Dilps und ist damit in seiner Funktion mit dem Glukagon der Säugetiere vergleichbar. Ein weiterer Faktor, der ebenfalls in den CC-Zellen exprimiert wird, ist Imp-L2 (*imaginal morphogenesis protein-late 2*), das bei schlechten Nahrungsbedingungen negativ auf die IIS in der Peripherie wirkt

## 1 Einleitung

Schematische Darstellung des Projektionsmusters einer Insulin-produzierenden Zelle (IPC) aus einem Cluster von sieben IPCs im zentralen Nervensystem (ZNS) einer Larve von *Drosophila melanogaster* (geändert nach Nässel und Winther [2010]). Das larvale ZNS ist durch die beiden Hirnhemisphären des Protocerebrums und das ventrale Nervensystem vereinfacht abgebildet. Dorsal zwischen den Hemisphären ist das neuroendokrine Organ, die Ringdrüse, lokalisiert. Der Zellkörper der IPC liegt in einem dorsomedialen Bereich des Protocerebrums, dem *Pars Inter-cerebralis* (PI). Axone führen in das Protocerebrum, das larvale Tritocerebrum, zu den neuroendokrinen Zellen der *Corpora Cardiacia* (CC) und in die Aorta. Eine Zelle der CC (Ac), die den Insulin-Antagonisten AKH produziert, ist rot angefärbt.



**Abbildung 1.1: Das Projektionsmuster der Insulin-produzierenden Zellen**

(Honegger et al. [2008]; Kim und Rulifson [2004]; Wu und Brown [2006]; Lee und Park [2004]; Van der Horst [2003]).

Dilp3 und 5 werden, im Gegensatz zu Dilp2, auf Transkriptionsebene nahrungsabhängig reguliert. Für Dilp2 konnte dagegen eine Sekretion aus den IPCs in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme festgestellt werden. Es wird angenommen, dass die Freisetzung durch humorale Faktoren des Fettkörpers vermittelt wird, zu denen man auch das Zytokin-ähnliche Unpaired2 zählt (Rajan und Perrimon [2012]; Ikeya et al. [2002]; Géminard et al. [2009]; Colombani et al. [2003]). Es ist außerdem bekannt, dass verschiedene neuronale Signale, Neurotransmitter und Neurohormone an der Dilp-Freisetzung beteiligt sind, zu denen unter anderem GABA, Serotonin und das *short Neuropeptide F* gehören (Luo et al. [2012]; Enell et al. [2010]; Kaplan et al. [2008]; Lee et al. [2008]).

In gehungerten Larven ist die Expression und die Freisetzung der Dilps und damit die systemische IIS vermindert, gleichzeitig ist die Suche nach Nahrung und die Futteraufnahme erhöht. Eine induzierte Erhöhung der IIS in den gehungerten Larven unterdrückt dagegen diese Verhaltensmuster (Wu et al. [2005]; Porte et al. [2005]). Die IIS ist somit Teil eines homöostatischen Systems, das an der Kontrolle bestimmter Verhaltensmuster zur Nahrungsaufnahme, in Abhängigkeit vom Energiebedarf des Organismus, beteiligt ist. Die Nahrungsaufnahme hängt allerdings auch von der Verfügbarkeit und Qualität einer Futterquelle ab. Nahrungsabhängige Verhaltensmuster werden daher auch durch afferente Informationen aus der Umwelt beeinflusst.

### 1.3 Chemosensorik in *Drosophila melanogaster*

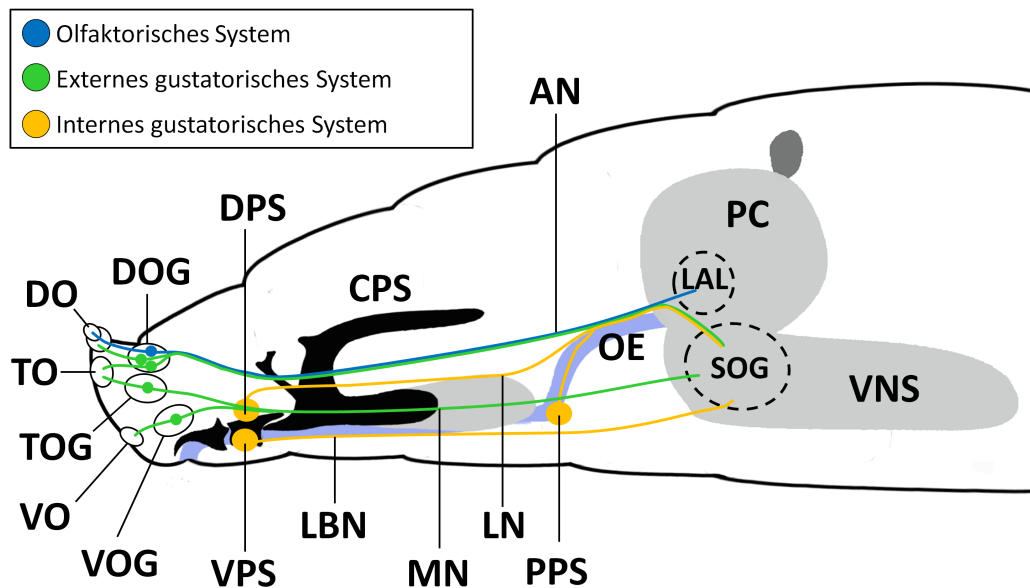
Geruchsinformationen werden durch flüchtige Substanzen in der Luft übertragen und können über weite Strecken über olfaktorische Organe wahrgenommen werden. Geschmacksstoffe werden dagegen durch Kontaktchemorezeptoren gustatorischer Organe identifiziert. In *Drosophila melanogaster* werden zwei motile Entwicklungsstadien unterschieden werden. Diese weisen, entsprechend ihrer Lebensweise, deutliche Unterschiede sowohl in ihrem nahrungsabhängigen Verhalten, als auch in der Anatomie der ausgebildeten chemosensorischen Organe auf.

Flugfähige Adulte haben die Möglichkeit größere Distanzen zu überbrücken, wobei die olfaktorische Wahrnehmung viele Verhaltensmuster bestimmt. Adulte Fliegen haben eine hohe Beweglichkeit, was ihnen die Möglichkeit zur Evaluation und Selektion beim Auffinden möglicher Geschlechtspartner und geeigneter Futterquellen für sich und ihre Nachkommen gibt. Larven dagegen leben direkt auf ihrer Nahrungsquelle. Sie sind in ihrem Bewegungsradius eingeschränkt und haben nicht die Möglichkeit sich neue, entfernte Nahrungsquellen zu erschließen. Larven durchlaufen in ihrer Entwicklung drei Larvenstadien (L1-L3), die durch eine Häutung voneinander getrennt sind. Ihr Organismus ist während dieser kurzen Entwicklungszeit darauf ausgelegt ständig Nahrung zu sich zu nehmen, zu wachsen und genügend Energie zu gewinnen, um die Transition zum fortpflanzungsfähigen Adultstadium sicherzustellen (Gerber und Stocker [2007]; Shingleton [2010]). Es konnte gezeigt werden, dass Larven in der Lage sind verschiedene chemische Substanzen wahrzunehmen und diese aktiv zu suchen oder zu meiden. Entsprechend ihrer Lebensweise sind die chemosensorischen Organe in den Larven zwar anatomisch und funktionell weniger komplex, aber dennoch mit den adulten Systemen vergleichbar. (Heimbeck et al. [1999]; Fishilevich et al. [2005]; Scott et al. [2001]; Gomez-Marin et al. [2011]; Schipanski et al. [2008]).

### 1.4 Anatomie der chemosensorischen Organe

Chemosensorischen Informationen werden über olfaktorische Rezeptorneurone (ORNs) und gustatorische Rezeptorneurone (GRNs) an das Gehirn weitergeleitet. Das olfaktorische System ist in Adulten komplex verschaltet und weist etwa 1300 ORNs auf. Im Gegensatz dazu findet man im Kopfbereich der Adulten nur etwa 300 GRNs. In Larven ist das gustatorische System auf etwa 80 GRNs reduziert. Vergleicht man die Anzahl der GRNs allerdings mit den 21 ORNs des olfaktorischen System lässt sich erkennen, dass in Larven das gustatorische System deutlich besser ausgebildet ist als in Adulten (Python und Stocker [2002]; Heimbeck et al. [1999]; Matsunami und Amrein [2003]; Singh [1997]).

Die Rezeptorneurone zeichnen sich durch einen bipolaren Aufbau aus: Ihre Dendriten enden



**Abbildung 1.2: Das cephalen chemosensorische System in *Drosophila*-Larven**

Schematische Darstellung chemosensorischer Rezeptorneurone im larvalen Kopfbereich mit Projektionen zu Zielregionen im Gehirn in Lateralansicht (verändert nach Gerber und Stocker [2007] und Python und Stocker [2002]). Extern liegen drei chemosensorische Organe: Dorsalorgan (DO), Terminalorgan (TO) und Ventralorgan (VO). Das DO erfüllt zwei unterschiedliche chemosensorische Funktionen. Der zentral gelegene Teil, der Dom, wird von olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORNs) innerviert, der periphere Bereich dagegen von gustatorischen Rezeptorneuronen (GRNs). TO und VO und die intern gelegenen dorsalen, ventralen und posterioren pharyngealen Sinnesorgane (DPS, VPS, PPS) enthalten hauptsächlich GRNs. Die Zellkörper der bipolaren Rezeptorneurone von DO, TO und VO liegen in den entsprechenden Ganglien (DOG, TOG und VOG). ORNs projizieren über den Antennalnerv (AN) in die primären, geruchsverarbeitenden Zentren, die larvalen Antennalloben (LAL). GRNs im DOG innervieren nicht nur das DO, sondern auch das TO. Sie projizieren über den AN in das Gehirn und enden im primären Geschmackszentrum, dem Suboesophagialganglion (SOG). Dieses liegt ventral eines Foramens, durch den der Oesophagus (OE, blau dargestellt) zieht, im Übergang vom Protocerebrum (PC) zum ventralen Nervensystem (VNS). GRNs von TO und VO projizieren über den Maxillarnerv (MN), von DPS und PPS über den Labialnerv (LN) und von VPS über den Labialnerv (LBN) in das SOG. Das Cephalopharyngeale Skelett (CPS) ist schwarz eingezeichnet.

in den Sensillen der chemosensorischen Organe und enthalten gustatorische oder olfaktorische Rezeptoren (ORs/GRs), die Axone innervieren dagegen im Gehirn die primären, informationsverarbeitenden Zentren für Geschmack und Geruch. Die Zellkörper der Rezeptorneurone liegen in Ganglien direkt unterhalb der entsprechenden chemosensorischen Organe (Abbildung 1.2). In *Drosophila*-Larven liegen rezeptive olfaktorische Strukturen terminal im Kopfbereich in einer zentral gelegenen Erhebung des Dorsalorgans (DO), der als Dom bezeichnet wird. Er weist eine poröse Feinstruktur auf und wird von den ORNs innerviert. Olfaktorische Informationen werden über den Antennalnerv (AN) in das Gehirn in die larvalen Antennalloben (LAL), lateral des Oesophagus, transportiert. Von hier aus erfolgt die Signalweiterleitung in die höheren olfaktorischen Zentren (Gerber und Stocker [2007]; Python und Stocker [2002]; Vosshall und Stocker [2007]).

Das gustatorische System ist hauptsächlich im Kopfbereich konzentriert und liegt eng mit dem

## 1 Einleitung

olfaktorischen System zusammen. Gustatorische Sensillen sind distal durch eine einzelne Öffnung unterbrochen, die von den GRNs innerviert werden. Ihre Axone führen in das primäre, geschmacksverarbeitende Zentrum im ZNS, in das Suboesophagialganglion (SOG). Hier werden die gustatorischen Informationen prozessiert und an die höheren Hirnzentren weitergegeben (Eckert et al. [2000]; Python und Stocker [2002]; Yarmolinsky et al. [2009]).

Rund um den Dom liegen im DO zusätzlich sechs gustatorische Sensillen. Zwei weitere externe chemosensorische Organe, das Terminalorgan (TO) und das Ventralorgan (VO), sowie die drei internen pharyngealen Organe enthalten hauptsächlich gustatorische Sensillen. GRNs im Dorsalorganganglion (DOG) innervieren sowohl DO, als auch Teile des TO und leiten chemosensorische Informationen über den AN in das Gehirn. Gustatorische Informationen der restlichen Sensillen des TOs und von Sensillen im VO werden über den Maxillarnerv transportiert. GRNs des dorsalen pharyngealen Sinnesorgans (DPS) und posterioren pharyngealen Sinnesorgans (PPS) innervieren das SOG über den Labralnerv (LN). Das ventrale pharyngeale Sinnesorgan (VPS) steht über den Labralnerv (LBN) mit dem SOG in Verbindung (Python und Stocker [2002]; Liu et al. [2003]; Gendre et al. [2004]; Heimbeck et al. [1999]).

### 1.5 Wahrnehmung von Süß- und Bitterstoffen

Der Geschmacksinn ermöglicht es den Tieren Nahrung auf ihre Qualität zu überprüfen und hat eine wichtige übergeordnete Funktion bei der Regulation verschiedener nahrungsabhängiger Verhaltensweisen. Säugetiere sind in der Lage, Geschmackswahrnehmungen entsprechend ihrer Qualität in Kategorien einzuteilen, die süß, sauer, bitter, salzig und umami (wohlschmeckend) umfassen. Umami und süß werden positiv wahrgenommen und führen zur Nahrungsaufnahme, da sie kohlenhydrat- und proteinreiche Nahrung in Aussicht stellen. Bitter und sauer dagegen warnen vor gefährlichen Substanzen, wie z.B. Toxinen, in der Nahrung und führen zu einer Verweigerung der Nahrungsaufnahme (Scott et al. [2004]; Amrein und Thorne [2005]; Lindemann [2001]; Yarmolinsky et al. [2009]; Meadows [2009]).

In *Drosophila melanogaster* konnte ein analoges System bestehend aus 68 verschiedenen gustatorischen Rezeptoren (GRs) identifiziert werden. Sie dienen als Marker zur Identifizierung unterschiedlicher Subpopulationen der Rezeptorneurone, die an der Geschmackswahrnehmung beteiligt sind (Clyne [2000]; Scott et al. [2001]; Dunipace et al. [2001]; Robertson et al. [2003]). Der Trehaloserezeptor GR5a ist in Neuronen exprimiert über die süße Nährstoffe, wie verschiedene Zucker, wahrgenommen werden. Diese zeigen keine Überschneidung mit Neuronen, die den Koffeinrezeptor GR66a exprimieren und die Wahrnehmung von bitteren Substanzen ermöglichen. Die beiden Subpopulationen vermitteln unterschiedliche Verhaltensweisen. Die

## 1 Einleitung

Aktivierung GR5a-positiver Rezeptoren führt zur Akzeptanz und Aufnahme von Nährstoffen, GR66a-positiver Zellen zu einer Ablehnung und Vermeidung (Wang et al. [2004]; Thorne et al. [2004]; Marella et al. [2006]; Chyb et al. [2003]; Dahanukar et al. [2001]; Moon et al. [2006]). Verschiedene Experimente zeigten, dass die spezifischen Verhaltensmuster, die durch eine Geschmackswahrnehmung ausgelöst werden, nicht durch die Eigenschaften der GRs festgelegt sind. Vielmehr spielt die Identität der Rezeptorzelle, in denen eine Anregung stattfindet eine Rolle. Die ektopische Expression eines Capsaicin-Rezeptors (Marella et al. [2006]) oder von olfaktorischen Rezeptoren (Hiroi et al. [2008]) in GR5a- oder GR66a-positiven GRNs führt entweder zu einem Annäherungs- oder einem Aversionsverhalten der Fliegen. Ähnliches konnte durch die Expression eines durch Blaulicht aktivierbaren Reportergens *Channel-Rhodopsin 2* gezeigt werden (Gordon und Scott [2009]). Bisher ist jedoch noch unklar, wie diese Verhaltensmuster im Gehirn gesteuert werden. Die Axone der GRNs enden in verschiedenen Bereichen des SOGs. Die Vermutung ist daher, dass das SOG in vier verschiedene Bereiche eingeteilt ist, die sowohl die Qualität als auch den Ort der Geschmackswahrnehmung widerspiegeln (Scott et al. [2001]; Wang et al. [2004]; Thorne et al. [2004]; Colomb et al. [2007]; Kwon et al. [2011]).

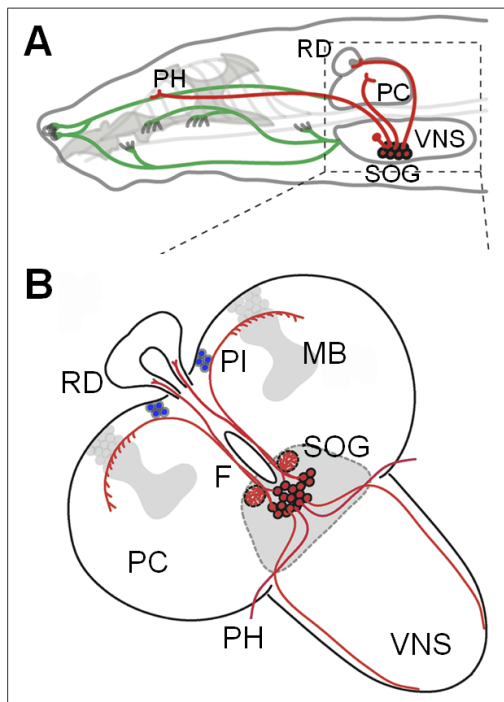
### 1.6 Morphologie der Hugin-Neurone

Die zentrale Verarbeitung von Geschmacksinformationen führt zu nahrungsabhängigen Verhaltensweisen, die entscheidend für eine Aufnahme oder Ablehnung von Nährstoffen sind. Eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung bestimmter gustatorischer Informationen an höhere geschmacksverarbeitende Zentren im Gehirn konnte Interneuronen zweiter Instanz zugeordnet werden, die das Gen *hugin* exprimieren (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a]; Melcher et al. [2007]).

Hugin ist, beginnend im Embryo, in allen Entwicklungsstadien von *Drosophila* nachweisbar und beschränkt sich auf 20 neuronale Zellen im SOG (Meng et al. [2002]; Melcher und Pankratz [2005]). Einzellzellfärbungen zeigen, dass diese Hugin-Neurone aufgrund ihrer primären Projektionsziele innerhalb und außerhalb des Gehirns in mindestens vier Subpopulationen unterschieden werden können, die detailliert in Larven untersucht wurden (Bader et al. [2007a]). Projektionen enden zum einen in der Ringdrüse (RD) und zum anderen im Protocerebrum (PC), dem übergeordnete Funktionen, wie Lernen und Gedächtnis, zugeordnet werden. Im PC besteht außerdem die Möglichkeit der Kontaktaufnahme mit den neuroendokrinen Zellen des PI. Weitere Projektionen führen anteriorwärts und innervieren eine Muskelgruppe der cephalopharyngealen Muskulatur (CPM) (Bader, R., Schoofs, A.; persönliche Kommunikation). Die vierte Projektion adressiert das ventrale Nervensystem (VNS), das hauptsächlich an der Kon-



## 1 Einleitung



Schematische Darstellung der Lage der Zellkörper und des Projektionsmusters der Hugin-Neurone (geändert nach Melcher und Pankratz [2005]). A) Lateralsicht des larvalen Kopfbereichs mit Projektionen der internen und externen gustatorischen Organe (grün) in den Bereich des Suboesophagialganglions (SOG) in dem die Zellkörper der Hugin-Neurone (rot) liegen. B) Schemazeichnung eines dorsoventral abgeflachten, larvalen Gehirns. Projektionen der Hugin-Neurone führen, ausgehend von den Zellkörpern im SOG, in das neuroendokrine Organ (RD), zur cephalopharyngealen Muskulatur im Bereich des Pharynx (PH), in das ventrale Nervensystem (VNS) und in das Protocerebrum (PC). Stark verzweigte glomeruläre Dendriten liegen ventrolateral des oesophagealen Foramens (F). Die Pilzkörper (MB), Sitz höherer Funktionen, wie Gedächtnis und Lernen, und das SOG sind dunkelgrau markiert. Neuroendokrine Zellen im *Pars Intercerebralis* (PI) sind blau angeudet.

Abbildung 1.3: Das Expressionsmuster der Hugin-Neurone in *Drosophila*-Larven

trolle des Bewegungsapparats beteiligt ist (Bader et al. [2007a]). Das Expressionsmuster der Hugin-Neurone ist in Abbildung 1.3 schematisch zusammengefasst.

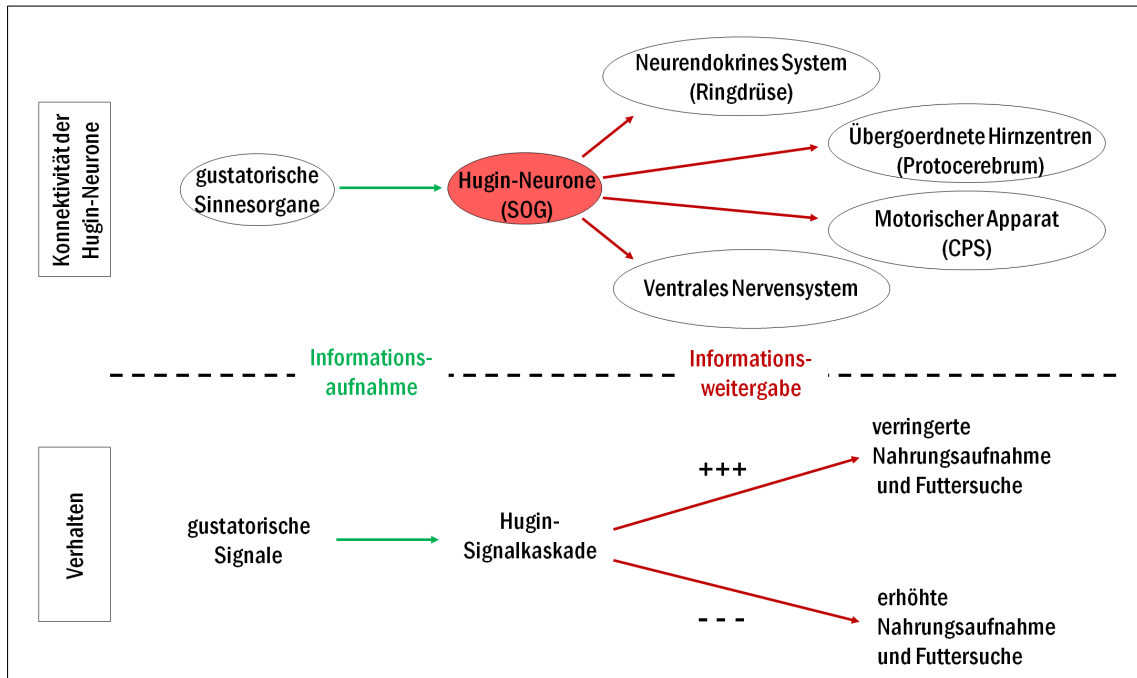
Die vier Subpopulationen haben ein gemeinsames fünftes Projektionsziel im SOG ventrolateral des Foramens, das durch dendritische Projektionen innerviert wird. Im SOG enden die Axone gustatorischer Rezeptorneurone, was eine Möglichkeit zur Kontaktaufnahme mit den stark verzweigten Dendriten der Hugin-Neurone bietet. Das Hugin-abhängige Netzwerk stellt damit eine Bindestelle zwischen der gustatorischen Reizeaufnahme, dem neuroendokrinen System und den Hirnarealen höherer Funktion dar (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a]).

### 1.7 Funktion der Hugin-Neurone auf das Fressverhalten

Hugin ist an der Kontrolle des Fressverhaltens beteiligt und wird selbst nahrungsabhängig reguliert. *Microarray*-Analysen an Larven der Mutanten *klumpfuss* und *pumpless* hatten eine erhöhte Expression von Hugin gezeigt. Diese Larven unterbrachen die Nahrungsaufnahme und verließen bereits in einem frühen Entwicklungsstadium das Futter. Dieses Aversionsverhalten ist ungewöhnlich, da Larven kontinuierlich fressen und erst kurz vor der Verpuppung die Nahrungsaufnahme einstellen (Zinke et al. [1999, 2002]; Melcher und Pankratz [2005]). Durch die ubiquitäre Überexpression von Hugin konnte ein ähnlicher Phänotyp festgestellt werden.

## 1 Einleitung

Blockiert man dagegen in Adulten die Signalweiterleitung der Hugin-positiven Neurone zeigt sich eine beschleunigte Initiation der Nahrungsaufnahme. Dieses Verhalten kann sonst nur bei



**Abbildung 1.4: Modell von Hugin als Modulator des Fressverhaltens**

Schematisch dargestellt ist die Konnektivität der Hugin-Neurone und der Einfluss von Hugin auf das Fressverhalten (geändert nach Melcher und Pankratz [2005]). Die Hugin-Neurone im SOG modulieren das Fressverhalten durch Weiterleitung gustatorischer Information in das Protocerebrum, in das neuroendokrine Organ, zu einer Muskelgruppe assoziiert mit dem Cephalopharyngealen Skelett (CPS) und zum ventralen Nervensystem. Eine erhöhte Hugin-Signalkaskade führt zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und Futtersuche, eine verminderte Hugin-Signalkaskade führt dagegen zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und Futtersuche.

gehungerten Tieren festgestellt werden. Gefütterte Kontrollfliegen dagegen evaluieren zunächst eine neue Futterquelle, um sie möglicherweise auf Nährstoffgehalt oder toxischen Substanzen zu testen (Melcher und Pankratz [2005]). Die Konnektivität der Hugin-Neurone und der Einfluss von Hugin auf das Fressverhalten sind in Abbildung 1.4 schematisch zusammengefasst.

*Hugin* kodiert für ein Präpropeptid, das in die zwei Neuropeptide, Pyrokinin-2 (PK-2) und Hugin $\gamma$ , gespalten wird. Das Oktapeptid PK-2 enthält einen hochkonservierten C-terminalen Sequenzabschnitt, der für die Rezeptoraktivierung wichtig ist (Meng et al. [2002]; Melcher et al. [2007, 2006]). Homologe zu Hugin konnten anhand konservierter Sequenzabschnitte und Spaltstellen des Präpropeptids in verschiedenen *Phyla* nachgewiesen werden. In Säugetieren wurde NeuromedinU (NmU) identifiziert. Übereinstimmungen zeigen sich nicht nur auf der Peptidebene, sondern auch in der Funktion. NmU wird in einem Bereich im Hypothalamus exprimiert, der analog zum SOG, an der Verarbeitung gustatorischer Information beteiligt ist. Die Ex-

pression von NmU in diesem Bereich ist ebenfalls nahrungsabhängig reguliert (Howard et al. [2000]). Durch gezielte Injektion von NmU in das zentrale Nervensystem von Nagetieren kommt es zu einer verminderten Futterraufnahme, zu Gewichtsverlust und einem Anstieg im Energieverbrauch. Mäuse, die kein NmU bilden können, sind dagegen hyperphagisch und fettleibig (Nakazato et al. [2000]; Howard et al. [2000]; Hanada et al. [2004]).

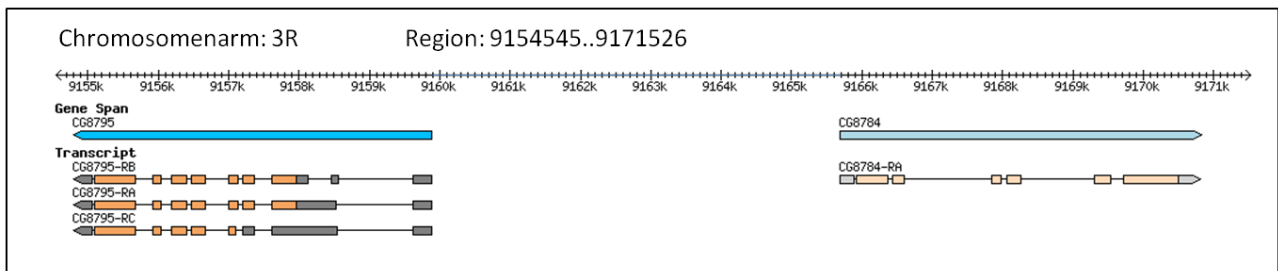
### 1.8 Die potentiellen Hugin-Rezeptoren CG8795 und CG8784

Für NmU konnten zwei Rezeptoren, NMU1R und NMU2R, identifiziert werden. NMU1R ist hauptsächlich in verschiedenen Organen der Peripherie exprimiert, darunter auch in endokrinen Organen wie dem Pankreas. NMU2R wird dagegen hauptsächlich im ZNS exprimiert. Die beiden Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Diese zeichnen sich durch sieben transmembrane Domänen aus, die aus hydrophoben  $\alpha$ -helikalen Strukturen bestehen und durch alternierend angeordnete intra- bzw. extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-Terminus liegt extrazellulär, die C-terminale Domäne dagegen intrazellulär und stellt die Verbindung zu einem heterotrimeren G-Protein her, über das die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden oder eine Aktivierung von Ionenkanälen vermittelt wird. (Funes et al. [2002]; Howard et al. [2000]; Nakazato et al. [2000]; Raddatz et al. [2000]; Szekeres et al. [2000]; Hosoya et al. [2000]; Fujii et al. [2000]).

Das Genom von *Drosophila* kodiert für  $\sim 200$  G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Durch Sequenzanalysen auf genomischer und Peptidenebene konnten in *Drosophila melanogaster* bisher 44 GPCRs für Peptide bzw. Neuropeptide identifiziert werden. Zwei dieser Peptid-GPCRs mit der Bezeichnung CG8795 und CG8784 werden der Gruppe der NmU-Rezeptoren zugewiesen. Ihre Peptidsequenz ist stark konserviert und zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu den beiden NmU-Rezeptoren NMU1R und NMU2R der Säugetiere (Hewes und Taghert [2001]; Brody und Cravchik [2000]; Park et al. [2002]; Kim et al. [2008]; Choi et al. [2003]).

CG8795 und CG8784 zeichnen sich durch eine hohe Sequenzidentität aus und sind vermutlich aus einer paralogen Entwicklung hervorgegangen. Sie liegen direkt aufeinanderfolgend auf dem dritten Chromosom und werden in entgegengesetzter Richtung transkribiert (Hewes und Taghert [2001]). In Abbildung 1.5 ist schematisch die Lage der beiden Rezeptoren mit ihren Exon- und Intronsequenzen dargestellt. Zuvor als Rezeptoren mit unbekannter Funktion beschrieben, konnte durch *In vitro* Untersuchungen zweier Arbeitsgruppen an *Xenopus* Oozyten und Ovarialzell-Linien des Chinesischen Zwerghamsters gezeigt werden, dass beide durch die Hugin-Spaltprodukte Hugin $\gamma$  und PK-2 aktiviert werden (Park et al. [2002]; Rosenkilde et al. [2003]). Für CG8795 konnte eine Aktivierung durch NmU gezeigt werden und NMU2R konnte

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.5: Der Genbereich von CG8795 und CG8784**

Schematische Darstellung eines ausgewählten Chromosomenabschnitt von 16,98kbp auf dem Chromosomenarm 3R, mit der Genregion (*gene span*) der beiden Hugin-Rezeptoren *CG8795* und *CG8784* (geändert nach <http://www.flybase.org>). Von *CG8795* sind drei (unterbrochener dunkelgrauer Pfeil) und von *CG8784* ein Transkript (unterbrochener hellgrauer Pfeil) bekannt. Exons sind dick und Introns dünn eingezeichnet. Die entsprechenden kodierenden Bereiche sind orange bzw. rosa dargestellt. Die Orientierung der Gene ist durch die jeweilige Pfeilrichtung angedeutet.

durch das Hugin-Spaltprodukt  $\text{Hug}\gamma$  aktiviert werden. Dies ließ auf eine funktionelle Homologie der beiden Systeme schließen (Terhzaz et al. [2012]).

Die Expression von *CG8795* und *CG8784* beginnt im Embryo und setzt sich in allen Entwicklungsstadien fort. Die höchste Expression konnte im späten Embryonalstadium, in Larven kurz vor der Verpuppung und in frisch geschlüpften Adulten nachgewiesen werden. *Microarray*-Analysen von *CG8784* zeigten in Larven eine erhöhte Expression im zentralen und ventralen Nervensystem, im Verdauungsapparat und im Hautmuskelschlauch. Eine erhöhte Expression von *CG8795* wurde im Gehirn und im Hautmuskelschlauch gezeigt (Chintapalli et al. [2007]; Graveley et al. [2011]). Die Lage und das Expressionsmuster der Rezeptor-positiven Zellen wurde allerdings noch nicht beschrieben.

## 1.9 Zielsetzung

Das Neuropeptid Hugin wird in 20 Zellen des Suboesophagialganglions im Gehirn von *Drosophila* exprimiert. Die Hugin-Neurone werden aufgrund ihrer Projektionsziele in vier Subpopulationen unterteilt. Die Zielzellen dieser Projektionen waren bisher unbekannt. In vorhergehenden Arbeiten wurden zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch *In vitro* Analysen als potentielle Hugin-Rezeptoren identifiziert. Die bisher unbekanntenen Expressionsmuster der beiden Rezeptoren sollten morphologisch aufgeklärt werden. Neuroanatomische Untersuchungen sollten die Verbindung der Hugin-Neurone mit den so identifizierten Zielzellen zu einem neuronalen Schaltkreis zeigen. Dieser Hugin-abhängige Schaltkreis sollte funktionell untersucht werden.



## 2 Material

### 2.1 Stämme und Linien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

| Bezeichnung (Art)   | Genotyp  |
|---|--|
| <i>ccdB</i> Survival <sup>TM</sup> 2T1 <sup>R</sup> Chemically Competent ( <i>E. coli</i> ) | siehe Herstellerangaben in One Shot <sup>®</sup> <i>ccdB</i> Survival <sup>TM</sup> 2 T1 <sup>R</sup> Chemically Competent Cells                                   |
| DH5 $\alpha$ ( <i>E. coli</i> )   | F- $\varphi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 <math>\lambda</math>-thi-1 gyrA96 relA1</i> |
| StrataClone <sup>TM</sup> Solo Pack <sup>®</sup> Competent Cells ( <i>E. coli</i> )         | siehe Herstellerangaben in Handbuch zu StrataClone PCR Cloning Kit   |
| Top10 ( <i>E. coli</i> )  | siehe Herstellerangaben in TOPO <sup>TM</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit  |

#### 2.1.2 Fliegenstämme

| Bezeichnung                         | Genotyp   | Bezugsquelle/<br>Bestellnummer |
|-------------------------------------|---|--------------------------------|
| actin-Gal4                          | actin-Gal4/CyO  | Huber, A.                      |
| attP40                              | y <sup>1</sup> v <sup>1</sup> P{nos-phiC31/int.NLS}X;P{CaryP}attP40                             | BDSC Indiana #25709            |
| CyO/Bl; TM2,e/TM6B, Tb              | w <sup>1118</sup> /Dp(1;Y)y <sup>+</sup> ;CyO/Bl <sup>1</sup> ; TM2/TM6B, Tb <sup>1</sup>       | BDSC Indiana #3704             |
| Del49                               | w <sup>1118</sup> ::;Df(3R) pBac95/84 Del49/TM3, Sb   | eigene Linie                   |
| Del49 <sup>1c-2</sup>               | w <sup>1118</sup> ::;Df(3R) pBac95/84 Del49 <sup>1c-2</sup> /TM3, Sb                            | eigene Linie                   |
| Del49 <sup>6c-2</sup>               | w <sup>1118</sup> ::;Df(3R) pBac95/84 Del49 <sup>6c-2</sup> /TM3, Sb                            | eigene Linie                   |
| Del49 <sup>11c-2</sup>              | w <sup>1118</sup> ::;Df(3R) pBac95/84 Del49 <sup>11c-2</sup> /TM3, Sb                           | eigene Linie                   |
| Del49 <sup>12c-2</sup>              | w <sup>1118</sup> ::;Df(3R) pBac95/84 Del49 <sup>12c-2</sup> /TM3, Sb                           | eigene Linie                   |
| Df(3R)Exel6168                      | w <sup>1118</sup> ::;Df(3R)Exel6168, P{XP-U}Exel6168/<br>TM6B, Tb <sup>1</sup>                  | BDSC Indiana #7647             |
| Df(3R)Exel8158                      | w <sup>1118</sup> ::;Df(3R)Exel8158/TM6B, Tb <sup>1</sup>                                       | BDSC Indiana #7974             |
| Df(3R)ED5613                        | w <sup>1118</sup> ::;Df(3R)ED5613,<br>P{3'RS5+3.3'}ED5613/TM6C, cu <sup>1</sup> Sb <sup>1</sup> | BDSC Indiana #9089             |
| Dilp2-Gal4                          | w; dilp2-Gal4/CyO;  | Rulifson, E.                   |
| Dilp2-Gal4/CyO <sub>twist</sub> GFP | erzeugt aus Dilp2-Gal4 und Gla/CyO <sub>twist</sub> GFP   | laborinterne Linie             |
| G2-Gal4                             | G2-Gal4;;   | Mz-1032.hx / Paro, R.          |
| Gla/CyO <sub>twist</sub> GFP        | w <sup>1118</sup> ; In(2LR)Gla, wgGla-1/CyO, PGAL4-<br>twi.G2.2, PUAS-2xEGFPAH2.2               | BDSC Indiana #6662             |
| Gr66a-Gal4                          | w; GR66a/CyO; TM2/TM6   | Scott, K., Berkeley            |
| hsFLP;;Dr/TM3Sb                     | P{hsFLP}1, y <sup>1</sup> w <sup>1118</sup> ::; Dr <sup>1</sup> /TM3, Sb <sup>1</sup>           | BDSC Indiana #26902            |
| hug1.2-Gal4 L2.3                    | w <sup>1118</sup> ;P{hug1,2kb Gal4}L2.3   | eigene Linie                   |

## 2 Material

| Bezeichnung                             | Genotyp  | Bezugsquelle/<br>Bestellnummer     |
|---|--|------------------------------------|
| hug1.2-LexA 86Fb L3                     | w <sup>1118</sup> ::P{hug1.2-LexA}ZH-86Fb L3   | eigene Linie                       |
| hug1.2-LexA 86Fb L5                     | w <sup>1118</sup> ::P{hug1.2-LexA}ZH-86Fb L5   | eigene Linie                       |
| hug1.2-LexA 86Fb L10                    | w <sup>1118</sup> ::P{hug1.2-LexA}ZH-86Fb L10  | eigene Linie                       |
| hug1.2-LexA 86Fb L12                    | w <sup>1118</sup> ::P{hug1.2-LexA}ZH-86Fb L12  | eigene Linie                       |
| hug1.2-LexA attP40 L2                   | w <sup>1118</sup> ;P{hug1.2-LexA}attP40 L2   | eigene Linie                       |
| hug1.2-LexA attP40 L6                   | w <sup>1118</sup> ;P{hug1.2-LexA}attP40 L6   | eigene Linie                       |
| hug1.2-LexA attP40 L20                  | w <sup>1118</sup> ;P{hug1.2-LexA}attP40 L20  | eigene Linie                       |
| hugR84.6-Gal4 L1.1                      | w <sup>1118</sup> , P{hugR84.6-Gal4}L1.1   | eigene Linie                       |
| hugR84.6-Gal4 L1.2                      | w <sup>1118</sup> :: P{hugR84.6-Gal4}L1.2  | eigene Linie                       |
| hugR84.6-Gal4 L1.3                      | w <sup>1118</sup> ::P{hugR84.6-Gal4}L1.3   | eigene Linie                       |
| hugR84.6-Gal4 L1.4                      | w <sup>1118</sup> , P{hugR84.6-Gal4}L1.4   | eigene Linie                       |
| hugR95.6-Gal4 L16.5                     | w <sup>1118</sup> ;P{hugR95.6-Gal4}L16.5   | eigene Linie                       |
| hugR95.6-Gal4 L18.3                     | w <sup>1118</sup> ::P{hugR95.6-Gal4}L18.3  | eigene Linie                       |
| hugR95.6hsp L1-Gal4                     | w <sup>1118</sup> ;P{CG8795.6-Gal4.hsp}L1  | eigene Linie                       |
| hugR95.6hsp L3-Gal4                     | w <sup>1118</sup> ;P{CG8795.6-Gal4.hsp}L3  | eigene Linie                       |
| hugR95.6hsp L4-Gal4                     | w <sup>1118</sup> ;P{CG8795.6-Gal4.hsp}L4  | eigene Linie                       |
| hugR84.6-LexA 86Fb L8                   | w <sup>1118</sup> ::P{hugR84.6-LexA}ZH-86Fb L8   | eigene Linie                       |
| hugR84.6-LexA 86Fb L15                  | w <sup>1118</sup> ::P{hugR84.6-LexA}ZH-86Fb L15  | eigene Linie                       |
| hugR84.6-LexAattP40 L7                  | w <sup>1118</sup> ;P{hugR84.6-LexA}attP40 L7   | eigene Linie                       |
| hugR84.6-LexAattP40 L9                  | w <sup>1118</sup> ;P{hugR84.6-LexA}attP40 L9   | eigene Linie                       |
| hugS3-Gal4                              | w <sup>1118</sup> ::hugS3-Gal4   | laborinterne Linie;<br>Melcher, C. |
| hugulin-Gal4                            | w <sup>1118</sup> ;Dilp2-Gal4/CyO;hugS3-Gal4   | laborinterne Linie;<br>Bader, R.   |
| hugYFP;UAS-mRFP                         | y <sup>1</sup> w*;Pw[+mC]=YFP-hugS;PUAS-mCD8.mRFP.LG10b  | laborinterne Linie;<br>Bader, R.   |
| LexA0kb L15                             | w <sup>1118</sup> ::P{LexA0kb}ZH-86Fb L15  | eigene Linie                       |
| LexA0kb L18                             | w <sup>1118</sup> ::P{LexA0kb}ZH-86Fb L18  | eigene Linie                       |
| LexAop2-mCD8::GFP                       | w*;P{13xLexAop2-mCD8::GFP}attP2  | BDSC Indiana #32203                |
| LexAop-CD4::spGFP11                     | w <sup>-</sup> ;LexAop-CD4::spGFP11/CyO;TM6,Tb/TM2,e   | Scott, K., Berkeley                |
| PBacWHCG8784                            | w <sup>1118</sup> ; PBac{WH}CG8784 <sup>f01901</sup>   | BDSC Indiana #18486                |
| PBacWHCG8795                            | w <sup>1118</sup> ; PBac{WH}CG8795 <sup>f02573</sup>   | BDSC Indiana #18563                |
| TM3KrGFP                                | y <sup>1</sup> w* ; D* gl <sup>3</sup> /TM3, P{w[+mC]=GAL4-Kr.C}DC2, P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}DC10, Sb <sup>1</sup> | BDSC Indiana #5195                 |
| tubP-Gal4                               | tubP-Gal4/ser-GFP  | Wahlström, G.                      |
| UAS-CD4::spGFP1-10                      | w <sup>-</sup> ;Bl/CyO;UAS-CD4::spGFP1-10/TM2  | Scott, K., Berkeley                |
| UAS-IVS-mCD8::RFP,<br>LexAop2-mCD8::GFP | w* P{10xUAS-IVS-mCD8::RFP}attP18,<br>P{13xLexAop2-mCD8::GFP}su(Hw)attP8;;  | BDSC Indiana #32229                |



## 2 Material

| Bezeichnung                          | Genotyp  | Bezugsquelle/<br>Bestellnummer     |
|--------------------------------------|--|------------------------------------|
| UAS-Cam2.1                           | w <sup>1118</sup> ; P{w[+mC]=UAS-Cameleon.2.1}   | Thum, A., Fribourg                 |
| UAS-eYFP                             | y <sup>1</sup> w <sup>*</sup> ; P{UAS-2xEYFP}AH3   | BDSC Indiana #6660                 |
| UAS-Gal4                             | y <sup>1</sup> w <sup>1118</sup> ; P{UAS-Gal4.H}12B  | BDSC Indiana #5939                 |
| UAS-GCamP3attP2                      | w <sup>*</sup> ; P20XUAS-GCaMP3attP2   | BDSC Indiana #32236                |
| UAS-Gal4;UAS-mCD8::GFP               | generiert aus BDSC #5939 & BDSC #5130  | eigene Linie                       |
| UAS-hugR84C (6214-1-1M/CyO)          | w <sup>1118</sup> ;P{UAS-CG8784C}ZH-51C L1/CyO   | eigene Linie                       |
| UAS-mCD8::GFP                        | P{UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E <sup>LL4</sup> ,y <sup>1</sup> w <sup>*</sup> ; Pin <sup>Yt</sup> /CyO | BDSC Indiana #5136                 |
| UAS-mCD8::GFP                        | y <sup>1</sup> w <sup>*</sup> ; Pin[Yt]/CyO; P{UAS-mCD8::GFP.L}LL6                             | BDSC Indiana #5130                 |
| w <sup>1118</sup>                    | w <sup>1118</sup>  | BDSC Indiana #3605                 |
| w <sup>1118</sup> ;Dr/TM3, Sb        | w <sup>1118</sup> ;+iso;Dr/TM3, Sb   | laborinterne Linie;<br>Richter, D. |
| w <sup>1118</sup> ;Sp/CyO            | w <sup>1118</sup> ;sp/CyO;+iso   | laborinterne Linie;<br>Richter, D. |
| w <sup>1118</sup> ;Sp/CyO;Dr/TM3, Sb | w <sup>1118</sup> ;sp/CyO;Dr/TM3, Sb   | laborinterne Linie                 |
| Wildtyp (WT)                         | Oregon-R-S   | BDSC Indiana #4269                 |
| ZH-51C                               | y <sup>1</sup> M{vas-int.Dm}ZH-2Aw <sup>*</sup> ;M{3xP3-RFP.attP'}ZH-51C                       | BDSC Indiana #24482                |
| ZH-86Fb                              | y <sup>1</sup> M{vas-int.Dm}ZH-2Aw <sup>*</sup> ;M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb                       | BDSC Indiana #24749                |

## 2.2 Antikörper

| Bezeichnung        | Antigen                 | Wirt            | Konz.  | Bezugsquelle                           |
|--------------------|-------------------------|-----------------|--------|--|
| primäre Antikörper |                         |                 |        |  |
| α-Dig AP sh        | Digoxigenin             | Schaf           | 1:500  | Roche, Mannheim                        |
| α-Dig POD sh       | Fluorescein             | Schaf           | 1:150  | Roche, Mannheim                        |
| α-Dilp2 gp         | α-chain                 | Meerschweinchen | 1:1000 | laborintern; Bader, R.                 |
| α-GFP rb           | Rekombinantes GFP       | Kaninchen       | 1:1000 | Abcam, Cambridge UK<br>ab#6556         |
| α-GFP ch           | Rekombinantes GFP       | Huhn            | 1:500  | Abcam, Cambridge UK<br>ab#13970        |
| α-GFP m            | GFP gekoppelte Proteine | Maus            | 1:500  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim #G6539 |
| α-hug rb           | PK-2                    | Kaninchen       | 1:500  | Bader, R., Laborintern                 |
| α-nc82             | Bruchpilot              | Maus            | 1:200  | A. Hofbauer                            |

## 2 Material

| Bezeichnung          | Antigen         | Wirt  | Konz. | Bezugsquelle                             |
|----------------------|-----------------|-------|-------|--|
| sekundäre Antikörper |                 |       |       |  |
| $\alpha$ -rb A488    | Kaninchen       | Ziege | 1:500 | Life Technologies,<br>Darmstadt          |
| $\alpha$ -rb Cy3     | Kaninchen       | Ziege | 1:500 | Jackson ImmunoResearch,<br>Suffolk UK    |
| $\alpha$ -rb Cy5     | Kaninchen       | Ziege | 1:500 | Jackson ImmunoResearch,<br>Suffolk UK    |
| $\alpha$ -m A488     | Maus            | Ziege | 1:500 | Life Technologies,<br>Darmstadt          |
| $\alpha$ -m Cy3      | Maus            | Ziege | 1:500 | Jackson ImmunoResearch,<br>Suffolk UK    |
| $\alpha$ -m Cy5      | Maus            | Ziege | 1:500 | Jackson ImmunoResearch,<br>Suffolk UK    |
| $\alpha$ -gp A633    | Meerschweinchen | Ziege | 1:500 | Life Technologies,<br>Darmstadt ‡ A21105 |
| $\alpha$ -gp Cy3     | Meerschweinchen | Esel  | 1:500 | Jackson ImmunoResearch,<br>Suffolk UK    |
| $\alpha$ -gp Cy5     | Meerschweinchen | Esel  | 1:500 | Jackson ImmunoResearch,<br>Suffolk UK    |
| $\alpha$ -ch A633    | Huhn            | Ziege | 1:500 | Life Technologies,<br>Darmstadt          |

## 2.3 Oligonukleotide

### 2.3.1 PCR-Primer

| Gen /<br>Fragment                  | Bezeichnung       | Primersequenz 5' → 3'                  | Produkt-<br>länge[bp] | Zyklen | T <sub>M</sub><br>[°C] |
|------------------------------------|-------------------|--|-----------------------|--------|------------------------|
| CG8784<br>& CG8795<br>6kb Promotor | hugR84/95 6kb fw  | AAT ATC TTG GCA ACG AAG TCC            | 5988                  | 28     | 57                     |
|                                    | hugR84/956kbrevII | AGC TGT CGT CGA TTA ATT GTG            |                       |        | 57                     |
| CG8784 OE<br><br>cDNS              | hugR84CDS for1    | ATG TTG CAA GGC GTC GCC ATC<br>ACC     | 1983                  | 36     | 69                     |
|                                    | hugR84CDS rev1    | TCA CTG GGA TTT GGG TGA GCC<br>ATA GGT |                       |        | 70                     |
| <i>actin</i>                       | Actin5C F1        | CAC GGT ATC GTG ACC AAC TG             | 467                   | 19     | 60                     |
|                                    | Actin5C R1        | GCC ATC TCC TGC TCA AAG TC             |                       |        | 60                     |
| pBacCG8795<br>Deletion PCR1        | 95 del genom fw1  | ACA AGG CTG AGA AGG ACA GG             | 1073                  | 30     | 60                     |
|                                    | WH5' left rev     | TCC AAG CGG CGA CTG AGA TG             |                       |        | 63                     |

## 2 Material

| Gen /<br>Fragment           | Bezeichnung                         | Primersequenz 5' → 3'                                    | Produkt-<br>länge[bp] | Zyklen | T <sub>M</sub><br>[°C] |
|-----------------------------|-------------------------------------|--|-----------------------|--------|------------------------|
| pBacCG8795<br>Deletion PCR2 | WH3' right for<br>95 del genom rev1 | CCTCGATATACAGACCGATAAAAC<br>GCA GAG AAC CGA AAA GCA AC   | 528                   | 30     | 62<br>58               |
| pBacCG8784<br>Deletion PCR3 | 84 del genom fw1<br>WH5' left rev   | CGCAAGAAACAACACTAAACGAAC<br>TCC AAG CGG CGA CTG AGA TG   | 733                   | 30     | 62<br>63               |
| pBacCG8784<br>Deletion PCR4 | WH3' right for<br>84 del genom rev1 | CCTCGATATACAGACCGATAAAAC<br>GGC ACA TAG CCG ATA ACG AG   | 425                   | 30     | 60                     |
| DW_A                        | DW_A for<br>DW_A rev                | GGT GTG TGT CTT TGT GTG TG<br>CTG GCT CGT TTC ATT CGT TT | 718                   | 30     | 58<br>56               |
| DW_C                        | DW_C for<br>DW_C rev                | TGC GGA CAG TGA TTA TTT GG<br>TGG GAG TTT TGA GCG ACT TT | 1302                  | 30     | 56<br>56               |
| DW_D                        | DW_D for<br>DW_D rev                | AAA CTC CCA AGC CAT TTT CC<br>CAG CAT CAC AGC GAC ATC TT | 717                   | 30     | 56<br>58               |
| DW_E                        | DW_E for<br>DW_E rev                | CGC AAA GGA TAC GAC AGA CA<br>TGA GAG CGA GGC AAT AAC AC | 953                   | 30     | 58<br>58               |

### 2.3.2 qPCR-Primer

| Gen          | Bezeichnung                  | Primersequenz 5' → 3'                                     | Produkt-<br>länge[bp] | Zyklen | T <sub>M</sub><br>[°C] |
|--------------|------------------------------|---|-----------------------|--------|------------------------|
| <i>actin</i> | actinRT R<br>actinRT F       | GGC CAT CTC CTG CTC AAA GTC<br>GAT CTG GCT GGT CGC GAT T  | 150                   | 40     | 60                     |
| CG8784       | RealT84 for3<br>RealT84 rev2 | ACC GAG TGG TTC AGT TTC GT<br>CTG TTG CTG TTT ATC GTC GTG | 100                   | 40     | 60                     |
| CG8795       | RealT95 for1<br>RealT95 rev1 | GTAACCTTTGGCTAGACACTTTGG<br>GCA GTG AAC CCG TTT GAT TAC   | 100                   | 40     | 60                     |
| <i>rp49</i>  | rp49RT R<br>rp49RT F         | CAC GTT GTG CAC CAG GAA CT<br>TCC TAC CAG CTT CAA GAT GAC | 125                   | 40     | 60                     |

### 2.3.3 Sonden

| Gen /<br>Sonde     | Bezeichnung                   | Primersequenz von 5' → 3'                                 | Produkt-<br>länge[bp] | Zyklen | T <sub>M</sub><br>[°C] |
|--------------------|-------------------------------|---|-----------------------|--------|------------------------|
| CG8784<br>hugR2    | hugR2for<br>hugR2rev          | GGC AGC ACA CCA TGT CAA AA<br>CGC GTT GTT GTT TAC ACT GCA | 701                   | 30     | 58<br>59               |
| CG8784<br>shugRIII | shugR III fw<br>shugR III rev | AGC CCT CAC CGT TTG TTA TG<br>GCG ACA ATT TTG ACA TGG TG  | 347                   | 30     | 58<br>56               |

## 2.4 Vektoren und Plasmide

| Bezeichnung              | Erzeugung/Bezugsquelle  |
|--------------------------|---|
| BACR05K08                | BPRC, California, USA   |
| BACR06H18                | BPRC, California, USA   |
| CDS3                     | 1983bp PCR-Produkt aus cDNA von Oregon-R Männchen mit Primern hugR84CDS for1 und hugR84CDS rev1 (CG8784 OE) in pCRII-TOPO   |
| ChsHR95.6                | <i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> II Fragment aus hugR95.6 in pBluescript in pChs-Gal4 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> II geschnitten)  |
| $\Delta$ 2-3             | Helferplasmid für P-Element Vektor (Laski et al. [1986])  |
| hug1.2kb in pBPnlsLexA   | <i>Eco</i> RV/ <i>Kpn</i> I Fragment aus mhug1.2kb in TOPOII ligiert mit pBPnls-LexA::p65Uw (klebrige Enden wurden nach <i>Eco</i> RI-Verdau aufgefüllt und der linearisierte Vektor mit <i>Kpn</i> I verdaut)  |
| hugR6kb in TOPOII K4     | 5988 bp PCR-Produkt aus Bac-Klon BAC05K8 mit den Primern hugR84/95 6kb fw und hugR84/95 6kb rev II in pCRII-TOPO  |
| hugR6kb in TOPOII K1     | 5988 bp PCR-Produkt aus Bac-Klon BAC05K8 mit den Primern hugR84/95 6kb fw und hugR84/95 6kb rev II in pCRII-TOPO  |
| hugR84.6 in pBPnlsLexA   | <i>Eco</i> RV/ <i>Kpn</i> I Fragment aus hugR6kb in TOPOII K4 ligiert mit pBPnls-LexA::p65Uw (klebrige Enden wurden nach <i>Eco</i> RI-Verdau aufgefüllt und der linearisierte Vektor mit <i>Kpn</i> I verdaut) |
| hugR84.6 in pCaSpeR K4C1 | <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I Fragment aus hugR6kb in TOPOII K4 in pCaSpeR-AUG-Gal4-X ( <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I geschnitten)  |
| hugR95.6 in pBluescript  | <i>Spe</i> I/ <i>Not</i> I Fragment aus hugR6kb in TOPO II K1 in pBluescript2 KS(-) ( <i>Spe</i> I/ <i>Not</i> I geschnitten)   |
| hugR95.6 in pCaSpeR K1C2 | <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I Fragment aus hugR6kb in TOPOII K1 in pCaSpeR-AUG-Gal4-X ( <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I geschnitten)  |
| pUAST-attB               | Bischof et al. [2007]   |
| pBluescript2 KS(-)       | Agilent Technologies, Waldbronn   |
| pBPnlsLexA::p65Uw        | Pfeiffer et al. [2010], Addgene plasmid #26230  |
| pBPnlsLexA 0kb           | hug1.2kb in pBPnlsLexA <i>Eco</i> RI-geschnitten und Leervektor religiert   |
| pCaSpeR-AUG-Gal4-X       | P-Element Vektor; Vosshall et al. [2000]; Addgene plasmid #8378   |
| pChs-Gal4                | Apitz, H., Universität Freiburg   |
| pCRII-TOPO               | pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup> -Vektor, Life Technologies  |
| UAS-hugR84C              | <i>Kpn</i> I/ <i>Not</i> I Fragment aus CDS3 in pUAST-attB ( <i>Kpn</i> I/ <i>Not</i> I geschnitten)  |

## 2.5 Enzyme

| Bezeichnung  | Hersteller/Bezugsquelle   |
|--|---|
| GoTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase                  | Promega, Mannheim   |
| KOD Hot Start DNA Polymerase                       | Novagen <sup>®</sup> Merck KGaA, Darmstadt                      |
| Lysozym  | Roche Diagnostics, Mannheim                                     |
| Restriktionsendonukleasen                          | Life Technologies, Darmstadt; NEB, Frankfurt; Promega, Mannheim |
| RNasin <sup>®</sup> Ribonuklease Inhibitor         | Promega, Mannheim   |
| SuperScript <sup>™</sup> III Reverse Transcriptase | Life Technologies, Darmstadt                                    |
| T3 RNA Polymerase                                  | Promega, Mannheim   |
| T4 DNA Polymerase                                  | Promega, Mannheim   |
| T7 RNA Polymerase                                  | Promega, Mannheim   |

Reaktionspuffer und andere Komponenten für die Enzymaktivität wurden bei den meisten Enzymen bereits mitgeliefert. Reaktionsbedingungen und deren Zusammensetzung sind jeweils in den Herstellerangaben nachzulesen.

## 2.6 Kits

| Bezeichnung  | Hersteller/Bezugsquelle                        |
|--|--|
| DIG RNA labeling Mix   | Roche Diagnostics, Mannheim                    |
| dNTP Set 100mM   | Life Technologies, Darmstadt                   |
| NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II                           | Macherey-Nagel, Düren                          |
| NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II                               | Macherey-Nagel, Düren                          |
| PCR Grade Nucleotide Mix                                     | Roche Diagnostics, Mannheim                    |
| peqGOLD TriFast <sup>™</sup>                                 | peqLab, Erlangen                               |
| Precellys Keramik Kit 1.4 mm                                 | peqLab, Erlangen                               |
| PureLink <sup>™</sup> HiPure Plasmid Filter Purification Kit | Life Technologies, Darmstadt                   |
| QuantiTect <sup>®</sup> Reverse Transcription Kit            | Qiagen, Hilden                                 |
| Qiagen Plasmid Maxi Kit                                      | Qiagen, Hilden                                 |
| Quick Blunting Kit   | NEB, Frankfurt                                 |
| Rapid DNA Dephos & Ligation Kit                              | Roche Diagnostics, Mannheim                    |
| SensiMix SYBR No-Rox Kit                                     | Bioline, Luckenwalde                           |
| StrataClone PCR Cloning Kit                                  | Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien |
| SYBR <sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain                         | Life Technologies, Darmstadt                   |
| TSA <sup>™</sup> Plus Fluorescein System                     | PerkinElmer, Boston, USA                       |

## 2 Material

### 2.7 Puffer und Medien

| Bezeichnung            | Zusammensetzung   |
|------------------------|---|
| Apfelsaftagar          | 2,1% (w/v) Agar, 25% (v/v) Apfelsaft, 2,5% (w/v) Saccharose, 10mM Nipagin, 1% (v/v) EtOH  |
| AP-Puffer              | 100mM Tris pH 9,5, 50mM MgCl <sub>2</sub> , 100mM NaCl, 0,1% Tween20, 50mM Levamisol; auf pH 9,5 einstellen   |
| Fliegenfutter 2xY      | 13,3l H <sub>2</sub> O, 330g Bierhefe, 815g Maismehl, 80g Fadenagar, 1l Zuckerrübensirup, 20g Nipagin in 0,2l 100% EtOH gelöst  |
| Fliegenfutter Standard | 13,3l H <sub>2</sub> O, 165g Bierhefe, 815g Maismehl, 80g Fadenagar, 1l Zuckerrübensirup, 20g Nipagin in 0,2l 100% EtOH gelöst  |
| Hybe                   | 50% (v/v) Formamid, 5 x SSC, 200µg/ml ssDNA, 100µg/ml tRNA, 25µg/ml Heparin, pH 5,0   |
| HybeB                  | 50% (v/v) Formamid, 5 x SSC   |
| Injektionspuffer       | 5mM KCl, 0,1mM Phosphatpuffer (pH 6,8)  |
| Klebstofflösung        | 4cm <sup>2</sup> 3M Scotch 465 in 1 ml n-Heptan lösen   |
| LB-Agar                | 10g LB-Medium-Pulver, 6g Agar-Agar, 400ml ddH <sub>2</sub> O  |
| LB-Medium              | 10g LB-Medium-Pulver gelöst in 400ml ddH <sub>2</sub> O   |
| Lysispuffer            | 100mM TrisHCl pH7,5, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 0,5% SDS   |
| MESAB                  | 0,4g Tricain, 100ml 10mM Tris pH 7,0  |
| Mowiol                 | 12ml Glycerin, 9,6g Mowiol40-88, 24ml H <sub>2</sub> O, 48ml 0,2M TrisHCl, pH 8,5   |
| PBS 10x                | 2g KCl, 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 11,5g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 80g NaCl mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen; mit HCl oder NaOH auf pH 7,4 einstellen; sterilfiltrieren |
| 0,1 PBT                | 0,1%(v/v)Triton X-100 in PBS  |
| 0,5 PBT                | 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS  |
| Phosphatpuffer 1M      | 49,7ml 1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 50,3ml 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen   |
| RF I                   | 100mM RbCl, 50mM MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O, 30mM KAc (pH 7,5), 10mM CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O, 15% (v/v) Glycerol, pH 5.8 mit 0,2M Essigsäure einstellen, steril filtrieren |
| RF II                  | 10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O, 15% (v/v) Glycerol, pH 5.8 mit 0,2M Essigsäure einstellen, steril filtrieren   |
| Ringerlösung           | 182mM KCl, 46mM NaCl, 3mM CaCl <sub>2</sub> , 10mM Tris   |
| Ringerlösung B         | 140mM NaCl, 3mM KCl, 2mM CaCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O, 4mM MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O, 10mM Sucrose, 5mM HEPES; pH-Wert mit NaOH auf 7,2 einstellen                             |
| SOC                    | 20g Trypton, 5g Hefeextrakt, 0,5g NaCl, 10ml 0,25M KCl, 5ml 2M MgCl <sub>2</sub> , 20ml 1M Glucose; mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l; auf pH 7,0 mit NaOH einstellen; autoklavieren                  |
| SSC 20x                | 3M NaCl, 300mM Trinatriumcitrat pH 7,0  |
| TAE 50x                | 242g Tris, 27,5g Borsäure, 20ml 0,5M EDTA pH 8,0; mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen   |
| TELT                   | 50mM Tris pH8,0, 62,5mM EDTA, 2,5M LiCl, 0,4% (v/v) Triton X-100  |
| Wasseragar             | 300ml ddH <sub>2</sub> O, 8,5g Agar-Agar  |

## 2.8 Reagenzien

| Bezeichnung   | Abkürzung   | Hersteller/Bezugsquelle                  |
|---|---|--|
| 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure  | MOPS  | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid                             | X-Gal   | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat   | BCIP/X-Phos   | Roche, Penzberg                          |
| Agar-Agar, Kobe I   | Agar  | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Agarose   |   | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Ampicillin Natriumsalz  | Amp   | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Apfelsaft   |   | Lidl Dienstleistung, Neckarsulm          |
| Bierhefe  |   | Gewürzmühle Brecht, Eggenstein           |
| Borsäure  | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | Merck, Darmstadt                         |
| Calciumchlorid  | CaCl <sub>2</sub>                                     | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Calciumchlorid-Dihydrat   | CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O                  | Merck, Darmstadt                         |
| Calciumchlorid-Hexahydrat   | CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O                  | Acros Organics N.V., Geel, Belgium       |
| Chloramphenicol   |   | Calbiochem <sup>®</sup> Merck, Darmstadt |
| Dimethylsulfoxid  | DMSO  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim          |
| Dinatriumhydrogenphosphat   | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| DNA-Längenmarker, 100bp DNA ladder  | 100bp-Leiter  | Life Technologies, Darmstadt             |
| DNA-Längenmarker, DNA ladder mix  | DNA-Leiter Mix  | Life Technologies, Darmstadt             |
| Ethanol, p.A.   | EtOH  | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| 3-Aminobenzoessäureethylester<br><i>Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt</i> | Tricain, MS-222 <sup>®</sup>                          | Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim   |
| Ethylendiamintetraessigsäure, Titrierkomplex 3                                      | EDTA  | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure                      | EGTA  | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Fadenagar   |   | Gewürzmühle Brecht, Eggenstein           |
| Formaldehyd 37%   |   | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Formamid  |   | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim          |
| Glycerin/Glycerol   |   | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Halocarbonöl 700  |   | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim          |
| Hefeextrakt   |   | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Heparin   |   | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Hering-Sperma Einzelstrang-DNA  | ssDNA   | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim          |
| 2-Propanol/Isopropanol  |   | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Kaliumacetat  | KAc   | AppliChem, Darmstadt                     |
| Kaliumchlorid   | KCl   | Carl Roth, Karlsruhe                     |
| Kaliumhexacyanoferrat (III)   | K <sub>3</sub> (Fe <sup>III</sup> (CN) <sub>6</sub> ) | Merck, Darmstadt                         |

## 2 Material

| Bezeichnung                              | Abkürzung                        | Hersteller/Bezugsquelle              |
|--|----------------------------------|--------------------------------------|
| Kaliumhexacyanoferrat (II)               | $K_4(Fe^{II}(CN)_6)$             | Merck, Darmstadt                     |
| Kanamycinsulfat                          |                                  | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| LB-Medium-Pulver (Luria/Miller)          |                                  | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Lebendhefe                               |                                  | Lidl, Neckarsulm                     |
| Levamisol-Hydrochlorid                   |                                  | AppliChem, Darmstadt                 |
| Lithiumchlorid                           | LiCl                             | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Magnesiumchlorid                         | $MgCl_2$                         | Acros Organics N.V., Geel, Belgium   |
| Magnesiumsulfat                          | $MgSO_4$                         | Grüssing, Filsum                     |
| Manganchlorid-Tetrahydrat                | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$             | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Maismehl                                 |                                  | Broicher Mühle, Bedorf               |
| Methanol                                 | MetOH                            | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Methyl-4-Hydroxybenzoat                  | Nipagin                          | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim      |
| Mowiol40-88(Polyvinylalkohol)            |                                  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim      |
| Natriumacetat, p.A.                      | NaAc                             | AppliChem, Darmstadt                 |
| Natriumchlorid                           | NaCl                             | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| tri-Natriumcitrat                        | $C_6H_5Na_3O_7$                  | Merck, Darmstadt                     |
| Natriumdihydrogenphosphat                | $NaH_2PO_4$                      | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Natriumhypochlorit (12% in $H_2O$ )      | NaClO                            | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| n-Heptan                                 |                                  | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid            | NBT                              | Roche, Penzberg                      |
| Rubidiumchlorid                          | RbCl                             | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Saccharose                               |                                  | VWR International, Darmstadt         |
| Silica Gel Orange 2-5mm                  |                                  | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Silikonkautschuk                         | Elastosil <sup>®</sup> RT601 A/B | Wacker Chemie AG, Stuttgart          |
| Sodium-Dodecyl-Sulfat                    | SDS                              | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan           | Tris/Tris-Base                   | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Triton X-100                             |                                  | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Trockenhefe                              |                                  | Lidl, Neckarsulm                     |
| Trypton/Pepton                           |                                  | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Tween20                                  |                                  | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Triton X 100                             |                                  | Carl Roth, Karlsruhe                 |
| Ziegenserum                              |                                  | Life Technologies, Darmstadt         |
| Zuckerrübensirup (Grafschafter Goldsaft) |                                  | Grafschafter Krautfabrik, Meckenheim |



## 2.9 Geräte und Werkzeuge

| Gerätebeschreibung                          | Fabrikat  | Hersteller/Bezugsquelle                         |
|---|---|---|
| Drehrad                                     | Stuart <sup>®</sup> SB3                               | Bibby Scientific Limited, Stone, UK             |
| Elektrophoresekammer<br>mit Stromversorgung | Owl<br>PowerPac Basic, 10 - 300 V                     | Thermo Scientific, Bonn<br>Bio-Rad, München     |
| Gasbrenner                                  | Fuego SCS basic                                       | WLD-TEC, Göttingen                              |
| Farbkamera                                  | AxioCam MR3   | Carl Zeiss, Jena                                |
| Federschere                                 | Vannas Spring Scissors<br>#15002-08                   | Fine Science Tools, Heidelberg                  |
| Fluoreszenz-Stereomikroskop                 | SZX12 + SZX-ILLD200                                   | Olympus, Hamburg                                |
| Gefrierschrank -80°C                        | Innova U535   | New Brunswick Scientific, Eppendorf,<br>Hamburg |
| Gefrierschrank -20°C                        | G5216   | Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen               |
| Geldokumentationskammer                     | Dark Hood DH-40/50                                    | Biostep, Jahnsdorf                              |
| Heiz-Thermomixer                            | MHR11   | HLC BioTech, Bovenden                           |
| Homogenisator                               | Precellys24   | peqLab, Erlangen                                |
| Inkubationsschüttler                        | Innova 42   | New Brunswick Scientific, Eppendorf,<br>Hamburg |
| Kaltlichtquelle                             | CL 1500 ECO   | Zeiss, Jena                                     |
| Kaltlichtquelle                             | KL200 LED   | Schott, Mainz                                   |
| Kaltlichtquelle                             | KL2500 LCD  | Zeiss, Jena                                     |
| Konfokalmikroskop                           | LSM780  | Zeiss, Jena                                     |
| Kühl-Brutschrank                            | 3001 und 3101   | RUMED, Laatzen                                  |
| Kühlschrank                                 | KT1730  | Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen               |
| Kühl-Thermomixer                            | MKR13   | HLC BioTech, Bovenden                           |
| Lumar-Stereomikroskop                       | SteREO Lumar.V12                                      | Carl Zeiss, Jena                                |
| Magnetheizrührer                            | M82   | Hartenstein, Würzburg                           |
| Mikroninjektionssystem                      | Transjector 5246                                      | Eppendorf, Hamburg                              |
| Mikroskop                                   | CK40  | Olympus, Hamburg                                |
| Mikroskopkamera                             | AxioCam ICc 1   | Zeiss, Jena                                     |
| Mikrowelle                                  | HGM25   | MDA, MHA Haushaltswaren, Barsbüttel             |
| Mikrozentrifuge                             | 5424  | Eppendorf, Hamburg                              |
| Mikrozentrifuge, gekühlt                    | 5415R   | Eppendorf, Hamburg                              |
| Mini-Zentrifuge                             | Sprout <sup>®</sup> HD1000BC                          | Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA          |
| Minuziennadeln                              | #26002-10   | Fine Science Tools, Heidelberg                  |
| pH-Meter                                    | HI 221  | Hanna Instruments, Smithfield RI                |
| Photometer                                  | BioPhotometer plus                                    | Eppendorf, Hamburg                              |
| Pinzetten                                   | Dumont #5   | Fine Science Tools, Heidelberg                  |
| Pipetten                                    | Pipetman Neo <sup>®</sup> P2N, P20N,<br>P200N, P1000N | Gilson, Inc. Wi, USA                            |

## 2 Material

| Gerätebeschreibung       | Fabrikat   | Hersteller/Bezugsquelle              |
|--------------------------|--|--------------------------------------|
| Präzisionswaage          | KERN PCB 1000-2  | Kern & Sohn, Balingen-Frommern       |
| Vortexer                 | Vortex Genie 2   | Scientific Industries, New York, USA |
| Quecksilberlichtquelle   | U-RFL-T  | Olympus, Hamburg                     |
| Real-Time System         | C1000 Thermal Cycler<br>CFX96™ Real-Time PCR<br>Detection System | Bio-Rad, München                     |
| Schüttelwasserbad        | SW22   | Julabo, Seelbach                     |
| Spektrophotometer        | NanoDrop ND-1000   | peqlab, Erlangen                     |
| Stereomikroskop          | Stemi2000  | Carl Zeiss, Jena                     |
| Thermocycler             | C1000 Thermal Cycler 185-<br>1048EDU                             | Bio-Rad, München                     |
| Thermomixer              | Thermomixer comfort  | Eppendorf, Hamburg                   |
| Tischzentrifuge, gekühlt | 5810R  | Eppendorf, Hamburg                   |
| Wasserbad                | 1002   | GFL, Burgwedel                       |

### 2.10 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung                  | Artikel   | Hersteller/Bezugsquelle                             |
|------------------------------|---|---|
| 96-Loch-Mikrotiterplatte     | PCR 96-Well TW-MT-Plate farblos                   | Biozym Scientific, Oldendorf                        |
| Combitips                    | 2,5 ml, 5 ml                                      | Eppendorf, Hamburg                                  |
| Deckgläser                   | 24 x 24 mm, 24 x 40 mm                            | Carl Roth, Karlsruhe                                |
| Fliegenröhrchen, Zuchtgefäße | 50 ml, 68 ml                                      | Greiner, Frickenhausen & Nerbe<br>plus, Winsen/Luhe |
| Injektionsnadeln             | Femtotips®II                                      | Eppendorf, Hamburg                                  |
| Klebstoff-Film ohne Träger   | Scotch 3M465                                      | Conrad Electronic SE, Hirschau                      |
| Laborgeschirr                |   | Schott, Mainz                                       |
| Mikrozentrifugenröhrchen     | 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml                              | Eppendorf, Hamburg                                  |
| Objektträger                 | 76 x 26 mm  | Carl Roth, Karlsruhe                                |
| Parafilm                     | Parafilm M®                                       | Pechiney Plastic Packaging,<br>Menasha WI           |
| PCR-Reaktionsgefäße          | Thermowell®Gold PCR 0,2ml                         | Corning, NY   |
| Petrischale                  | 60 x 15 mm, 92 x 16 mm genockt                    | Sarstedt, Nümbrecht                                 |
| Pipettenspitzen              | passend für Pipetman Neo®,<br>mit und ohne Filter | Corning, NY   |
| Silikonschlauch              | #228-0708   | VWR International,<br>Darmstadt                     |
| Skalpell                     | SK22  | Hartenstein, Würzburg                               |
| Spritzen                     | 5 ml, 50 ml                                       | Hartenstein, Würzburg                               |
| Spritzenvorsatzfilter        | Syringe 0,45 µm, 0,2 µm                           | Whatman,  |

## 2 Material

| Bezeichnung                | Artikel   | Hersteller/Bezugsquelle         |
|----------------------------|---|---------------------------------|
| Stopfen aus PU-Schaumstoff |   | K-TK, Retzstadt                 |
| Wägeschalen                | Rotilabo <sup>®</sup> -Einmal-Wägeschalen 41 x 41 x 8 mm, 89 x 89 x 25 mm | Carl Roth, Karlsruhe            |
| Wolfram-Draht              | 30 $\mu\text{m}$ - 250 $\mu\text{m}$                                      | Goodfellow,<br>Bad Nauheim      |
| Zellsieb                   | Nylonsieb mit 100 $\mu\text{m}$ Porengröße, steril                        | VWR International,<br>Darmstadt |
| Zentrifugenröhrchen        | 25 ml, 50 ml  | Sarstedt, Nümbrecht             |

### 2.11 Computerprogramme

| Bezeichnung                       | Version  | Hersteller/Bezugsquelle   |
|-----------------------------------|--|---|
| Adobe Photoshop CS4 Extended      | 11.0.2   | Adobe Systems, München  |
| AxioVision LE                     | AxioVs40 V 4.8.1.0                                       | Carl Zeiss, Jena  |
| CFX Manager <sup>™</sup> Software | 2.1  | Bio-Rad Laboratories, München   |
| Excel                             | Microsoft <sup>®</sup> Office<br>Excel <sup>®</sup> 2007 | Microsoft Corporation, USA  |
| ImageJ                            | 1.46a  | Wayne Rasband, National Institutes of Health,<br>USA  |
| Mendeley Desktop                  | 1.1.2  | Mendeley Ltd., London UK  |
| MiKTeX                            | 2.9  | <a href="http://www.miktex.org">http://www.miktex.org</a> ; Schenk, C., Berlin                  |
| NanoDrop ND-1000                  | V 3.5.2  | peqLab, Erlangen  |
| Primer 3                          | 0.4.0  | Whitehead Institute for Biomedical Research,<br>Steve Rozen, Helen Skaletsky                    |
| Prism 5                           | 5.01   | GraphPad Software Inc., La Jolla, CA  |
| TEXnicCenter                      | 1.0  | <a href="http://www.TeXnicCenter.org">http://www.TeXnicCenter.org</a>                           |
| SerialCloner                      | 2.1  | <a href="http://www.serialbasics.com">http://www.serialbasics.com</a> ;<br>F.Perez/SerialBasics |
| Zeiss LSM Image Browser           | 4.0.0.157  | Carl Zeiss, Jena  |
| Zen                               | Zen 2010B SP1<br>& 2009 Light Edition                    | Carl Zeiss MicroImaging, Jena   |



## 3 Methoden

### 3.1 Fliegenhaltung

Die Haltung der Fliegenlinien erfolgte in Anzuchtröhrchen mit Standard-Fliegenfutter bei 18°C oder 25°C. Alle 18-25 Tage wurden die adulten Fliegen in neue Röhrchen mit frischem Futter umgesetzt. Durch die Wahl der Umgebungstemperatur war es möglich die Entwicklungszeit der Tiere zu bestimmen.

Für Embryo- und Larvensammlungen wurden adulte Tiere in Populationskäfige überführt, deren Boden aus einer auswechselbaren Apfelsaftagarplatte bestand. Eine Spatelspitze Lebendhefuspension auf der Platte sollte die Weibchen zur Eiablage stimulieren und diente gleichzeitig als Futterquelle für geschlüpfte Larven.

### 3.2 molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 DNS-Extraktion aus *Drosophila melanogaster*

Die Extraktion genomischer DNS aus Adulten wurde an 2-4 Fliegen durchgeführt. Für die Extraktion genomischer DNS aus Embryonen wurden 25-30 Tiere verwendet. Alle Schritte wurden, falls nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. In einem 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen wurden pro Extraktionsansatz 200  $\mu$ l Lysispuffer A vorgelegt, die Tiere ins Gefäß überführt und anschließend für zwei Minuten (min) mit einem Pistill homogenisiert. Es wurden zusätzlich 100  $\mu$ l Lysispuffer zugefügt und das Gewebe für weitere drei min homogenisiert. Das Lysat wurde für 30 min bei 65°C auf dem Heiz-Thermomixer unter Schütteln inkubiert. Pro Ansatz wurden 200  $\mu$ l 5M KAc-Lösung und 500  $\mu$ l 6M LiCl-Lösung gemischt, zum Lysat gegeben und gevortext. Das Gemisch wurde für 15 min auf Eis inkubiert und dann für 15 min bei 13.000 g abzentrifugiert. Der Überstand mit der DNS wurde abgenommen und in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Zum Fällern der DNS wurden 600 $\mu$ l Isopropanol zum Überstand gegeben, gut gemischt und die DNS für 15 min bei 13.000 g in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde es in 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglichte *In vitro* die enzymatische Amplifikation spezifischer DNS-Abschnitte. Mit Hilfe des Programms *Primer3* wurden ge-

### 3 Methoden

eignete Primerpaare (Vorwärts und Rückwärts-Primer) für die jeweilige PCR entworfen. Die erforderlichen DNS-Sequenzen von *Drosophila melanogaster* wurden der Online-Datenbank <http://www.flybase.org> entnommen.

Zur Sondenherstellung, für den „Screen“ der Deletionsmutanten, für Kontrollen von cDNS und isolierter genomischer DNS aus Wildtypen und Mutanten von *Drosophila* wurden Standard-PCRs mit einer **GoTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase** durchgeführt. Pro Reaktionsansatz von 25  $\mu$ l wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß ddH<sub>2</sub>O, 10 - 100 ng genomische DNS bzw. cDNS als Template, 1x GoTaq<sup>®</sup> PCR-Puffer, 200  $\mu$ M dNTP-Mix, je 10 pmol/ $\mu$ l eines passenden Primerpaares und 1 U GoTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase auf Eis gemischt. Als Kontrolle der Reagenzien auf eine mögliche Kontamination mit Fremd-DNS wurde für jedes Primerpaar ein Reaktionsansatz ohne Template angesetzt. Abhängig von den jeweiligen Primerpaaren und der Produktlänge wurde ein Temperaturprofil erstellt. Initial erfolgte die Denaturierung des Templates für 3 min bei 94°C, gefolgt von mehreren Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 30 Sekunden (sek), einem Annealingschritt für 30 sek bei 4°C unter der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Primer und einem Elongationsschritt bei 72°C für 1 min pro 1kb Produktlänge. Die Reaktion wurde für 5 min bei 72°C zum Abschluss gebracht und dann auf 8°C abgekühlt. Die Produktlänge, die  $T_M$  der Primer und die Zyklenzahl sind in Tabelle 2.3.1 auf Seite 18 nachzulesen.

Für lange und möglichst fehlerfreie Fragmente, wie das 6kb Promotorfragment und das CG8784-Überexpressionskonstrukt (CG8784 OE), wurde die Amplifikation mit Hilfe einer **KOD Hot Start DNA-Polymerase** durchgeführt. Diese zeichnete sich durch eine hohe Amplifikationsrate und eine 3'  $\rightarrow$  5' Exonuklease-Funktion zur Fehlerkorrektur aus. Für einen Reaktionsansatz von 50  $\mu$ l wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß ddH<sub>2</sub>O, 20 ng eines Bac-Klons bzw. 100 ng cDNS als Template, 1x PCR-Puffer, 200  $\mu$ M dNTPs, je 5 pmol/ $\mu$ l der Primer und 1 U KOD Hot Start DNA Polymerase gemischt. Das Temperaturprofil war abhängig von den Primerpaaren und der Produktlänge. Nach der Aktivierung der Polymerase (95°C für 2 min) folgten mehrere Zyklen mit einem Denaturierungsschritt (95°C für 20 sek), einem Annealingsschritt (niedrigsten  $T_M$  der Primer für 10 sek) und einem Elongationsschritt (70°C für 20 sek bzw. 25 sek pro 1kb Fragmentlänge). Die Reaktion wurde anschließend auf 8°C abgekühlt. Nähere Angaben zum Temperaturprofil sind in der Beschreibung KOD HOT START DNA POLYMERASE nachzulesen. Die Produktlänge, die  $T_M$  der Primer und die Zyklenzahl sind in Tabelle 2.3.1 auf Seite 18 nachzulesen.

Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgt durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Die gewünschten Fragmente wurden zunächst aus dem Gel extrahiert (Kapitel 3.2.8) oder direkt nach der PCR mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit nach Herstellerangaben (NUCLEOSPIN<sup>®</sup> GEL AND PCR CLEAN-UP) aufgereinigt.

#### 3.2.3 Klonierung und Transformation

Es wurden unterschiedliche Klonierungsstrategien in Abhängigkeit vom Insertionsprodukt und dem Zielvektor angewendet.

Zwischenklonierungen von PCR-Fragmenten wurden über den TOPO<sup>®</sup>- oder pSC-A-amp/kan-Vektor durchgeführt. Bei der **TOPO<sup>®</sup>TA Klonierung** wurde eine Eigenschaft der Taq-Polymerase genutzt, bei einer PCR-Reaktion nach jedem Amplifikationsschritt an den neu synthetisierten DNS-Strängen ein dATP an das 3'-Ende anzuhängen. Dieser Adenosin-Überhang ermöglichte die Integration des Fragments in den linearisierten pCR<sup>®</sup>II-TOPO-Vektor mit entsprechenden T-Überhängen. Die KOD-Polymerase erzeugte aufgrund ihrer Lesekorrekturefunktion PCR-Fragmente mit glatten Enden. Um diese Fragmente dennoch für eine TOPO<sup>®</sup> TA Klonierung nutzen zu können wurde dem Reaktionsgemisch nach der PCR 1/2  $\mu$ l GoTaq<sup>®</sup> Polymerase zugefügt und das Gemisch noch einmal für etwa 10 min bei 72°C im Thermocycler inkubiert. Die TOPO<sup>®</sup>TA Klonierung und die Transformation in chemisch-kompetente Zellen wurde nach den Herstellerangaben für das TOPO<sup>®</sup>TA Cloning<sup>®</sup> Kit durchgeführt.

Bei der **StrataClone PCR Klonierung** wurden ebenfalls PCR-Fragmente mit A-Überhängen benötigt. Die Ligation mit dem pSC-A-amp/kan-Vektor erfolgte über Vektorarme mit modifizierten U-Überhängen, die an den entgegengesetzten Enden loxP-Erkennungssequenzen aufwiesen. Nach der Transformation in chemisch kompetente SoloPack-Zellen, die transient eine Cre-Rekombinase exprimieren, wurde eine Rekombination an den loxP-Erkennungssequenzen katalysiert und es entstand ein zirkuläres Plasmid. Die Ligation und die Transformation sind den Herstellerangaben im Handbuch für das STRATACLONE PCR CLONING KIT zu entnehmen.

Nach der Zwischenklonierung wurden die Konstrukte auf die richtige Orientierung durch geeignete Restriktionsverdau überprüft. Zusätzlich wurden die Promotorfragmente durch Ansequenzieren, das Überexpressionskonstrukt und die Sonden durch eine vollständige Sequenzierung kontrolliert. Danach erfolgte die Klonierung der Verdau-Fragmente in einen der Endvektoren pCaSpeR-AUG-Gal4-X, pUAST-attB, pBPnlsLexA::p65Uw oder pChs-Gal4. Diese wurden, durch geeigneten Verdau mit Restriktionsendonukleasen, linearisiert und im Anschluss dephosphoryliert. Die Ligation der PCR-Fragmente und den linearisierten Endvektor erfolgte mit Hilfe einer **T4 DNA Ligase**. Der Ablauf der Dephosphorylierung und die anschließende Ligation sind in den Herstellerangaben zum RAPID DNA DEPHOS & LIGATION KIT nachzulesen.

Im Anschluss wurde die Transformation in chemisch-kompetente *E.coli* Zellen durchgeführt. Nach der Ligation wurden vom Reaktionsansatz 2-4  $\mu$ l entnommen und zu den Zellen gegeben.

### 3 Methoden

Nach einer Inkubationszeit von 20 - 25 min auf Eis erfolgte die Transformation durch einen Hitzeschock bei 42°C für 45 sek. Anschließend wurden die Zellen mit 250  $\mu$ l LB- oder SOC-Medium verdünnt und bei 37°C für 30 - 50 min auf dem Thermomixer geschüttelt. 200  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden auf Agarplatten mit Selektionsmedium (z.B. 0,1% Ampicillin) ausplattiert. Bei Verwendung eines lacZ-kodierenden Vektors wurde zusätzlich 50  $\mu$ l X-Gal (4% in DMSO) für eine Blau-Weiß-Selektion auf jeder Agarplatte gleichmäßig ausgebracht. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37°C. Die Konstrukte im Endvektor wurden durch geeignete Restriktionsverdau auf Insertion und Orientierung überprüft.

#### 3.2.4 Plasmidisolierung aus Bakterien

Abhängig von der gewünschten Reinheit und Ausbeute wurde die Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien entweder durch eine **Minipräparation** (Lithium-Methode), durch eine **Midi-Präparation** mit dem PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kit oder durch eine **Maxi-Präparation** (Qiagen Plasmid Maxi Kit) durchgeführt.

Die **Minipräparation** ist eine schnelle Methode, mit der in kürzester Zeit eine Vielzahl an Bakterienklonen hinsichtlich der Insertion und Orientierung der Fragmente im Vektor untersucht werden konnten. Die gewünschten Bakterienkolonien wurden über Nacht jeweils in 3 ml LB-Medium mit einem Selektions-Antibiotikum (abhängig vom transfizierten Vektor) bei 37°C geschüttelt. Von der Übernachtskultur wurden 1,6 ml in ein 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die Bakterien bei 13.000 g für 30 sek pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend mit 200  $\mu$ l TELT-Puffer und 20  $\mu$ l Lysozymlösung (10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte im Heiz-Thermomixer für 3 min bei 96°C, danach wurde die Lösung für 5 min auf Eis gestellt und im Anschluss bei 13.000 g für 8 min abzentrifugiert. Das Pellet aus Resten von Proteinen, Zellwand und genomischer DNS wurde entfernt. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNS wurde mit 100  $\mu$ l Isopropanol gefällt und für 15 min bei 13.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Plasmid-DNS getrocknet und in 40  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach der Identifikation positiver Klone durch Restriktionsverdau des isolierten Plasmids, wurden diese auf einer LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Für Sequenzierungen, Ligationen und Injektionen in Fliegenembryonen war eine größere Menge und hohe Reinheit der Plasmid-DNS notwendig, die durch **Midi-** oder **Maxi-Präparation** mit den jeweiligen Kits erreicht wird. Für die **Midi-Präparation** wurden 100 ml, für die **Maxi-Präparation** 200 ml selektives LB-Medium mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach den Herstel-



lerangaben (PURELINK™ HiPURE PLASMID FILTER PURIFICATION KITS FOR MIDI AND MAXI PREPARATION OF PLASMID DNA MANUAL bzw. QIAGEN PURIFICATION HANDBOOK: QIAGEN MAXI PROTOCOL). Die isolierte Plasmid-DNS wurde in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

#### 3.2.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNS

Für jeden Restriktionsansatz mit 30 µl Gesamtvolumen wurden 2 - 3 U einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen pro 1 µg DNS eingesetzt. Der Verdau erfolgte für 1 - 2 h bei idealen Temperatur- und Pufferbedingungen (siehe Herstellerangaben). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Fragmente über ein Agarosegel elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und von Protein- und Salzresten gereinigt. Das Restriktionsgemisch wurde vor dem Beladen des Agarosegels mit Ladepuffer und RNaseA (10 µg/µl) versetzt, um ein Diffundieren aus den Geltaschen zu verhindern und Reste bakterieller RNS zu entfernen.

#### 3.2.6 Aufreinigung von Plasmid-DNS durch Alkohol-Fällung

Eine Alkohol-Fällung wurde angewendet, um Plasmid-DNS nach einer enzymatischen Modifikation aufzureinigen und umzupuffern oder um sie zu konzentrieren. Zu einer DNS-Lösung wurden 1/10 Vol. 3M NaAc-Lösung und 2,5x Vol. 100%iges EtOH zugegeben, gut gemischt und die DNS für eine halbe Stunde bei -80°C oder über Nacht bei 4°C gefällt. Die DNS wurde bei 4°C für 30 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% EtOH gewaschen. Danach wurde die Lösung noch einmal für 5 min bei 4°C mit 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung erfolgte im Gefrierschrank bei -20°C.

#### 3.2.7 Agarosegel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese wurden DNS-Fragmente entsprechend ihrer Länge in einem elektrischen Feld in Richtung Anode aufgetrennt. In Abhängigkeit ihrer Länge wurden 0,8% bis 2% Agarose in TAE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben durch Erhitzen in der Mikrowelle in Lösung gebracht. Nach dem Abkühlen wurde der flüssigen Agarose SYBR®Safe in einer Verdünnung von 1:10.000 zugefügt. Dieses konnte an den DNS-Fragmenten beim Wandern durch das Gel binden und ermöglichte eine optische Identifizierung unter UV-Licht. Die Agaroselösung wurde zum Aushärten blasenfrei in einen Gelschlitten mit Kamm umgefüllt und anschließend in eine Elektrophorese-Kammer überführt. Nach dem Befüllen der Kammer mit

### 3 Methoden

TAE-Puffer wurde der Kamm aus dem Gel gezogen. In die ausgesparten Taschen wurde die DNS-Lösung mit Ladepuffer und ein Molekulargewichtsstandard (Längenmarker) geladen. Die Fragmente wurden elektrophoretisch entweder über Nacht bei einer Spannung von 15 - 25 Volt oder innerhalb von 1,5 - 2 h bei 100 - 120 Volt aufgetrennt. Die Gele wurden in einer Geldokumentationskammer mit eingebautem UV-Transilluminator ausgewertet. Durch den Vergleich der Fragmentbanden mit dem Längenmarker war eine Abschätzung der Fragmentlängen im Gel möglich.

#### 3.2.8 Isolierung von DNS aus Agarosegelen

Nach der Gelelektrophorese wurde die Bande mit der richtigen Fragmentlänge am UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Es wurde darauf geachtet möglichst wenig Gel mitzuentfernen und die DNS nur kurz der schädigenden Wirkung der ultravioletten Strahlung auszusetzen. Die DNS-Fragmente wurden mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit nach Herstellerangaben (NUCLEOSPIN<sup>®</sup> GEL AND PCR CLEAN-UP) extrahiert. Die Fragmente wurden in 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O eluiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert oder sofort weiterverwendet.

#### 3.2.9 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Von den *Escherichia coli*-Stämmen Top10, DH5 $\alpha$  und 2T1<sup>R</sup> wurden mit der Rubidiumchlorid-Methode kompetente Zellen hergestellt.

Von der Übernachtskultur auf einer LB-Platte wurden einzelne Kolonien gepickt und jeweils in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit 150 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C als Vorkultur inkubiert. Am nächsten Tag wurden in einem 1 l Erlenmeyer-Kolben mit 300 ml LB-Medium 6 ml der Vorkultur, 2 ml 1M MgCl<sub>2</sub> und 3 ml 1M MgSO<sub>4</sub> gemischt und bei 37°C im Brutschrank unter Schütteln für 2 - 3 h inkubiert, bis eine optische Dichte (OD) von etwa 600 erreicht war. Die nächsten Schritte erfolgten im Kühlraum bei 4°C. Alle Gefäße und Reagenzien wurden auf Eis vorgekühlt. Die Zellen wurden in Zentrifugenbecher überführt und für 20 min auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation bei 3.000 Upm wurden die Zellen für 7-8 min bei 4°C pellettiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 ml RF I-Lösung resuspendiert, für 30 min auf Eis gekühlt und bei 4°C und 3.000 Upm für 7-8 min pellettiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit RF II-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis gekühlt, in 1,5 ml-Ultrazentrifugenröhrchen aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff weggefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte im Gefrierschrank bei -80°C.

### 3.2.10 Sondenherstellung durch *In vitro* Transkription

Fragmente der gewünschten Sonde wurden im pCRII-TOPO-Vektor auf Orientierung und Insertion durch einen geeigneten Vektorverdau mit Restriktionsendonukleasen überprüft und anschließend sequenziert. Vektoren die eine Sondensynthese in Sinn- bzw. Gegensinn-Orientierung erlaubten, wurden linearisiert, über ein Agarosegel durch Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.7) aufgereinigt und aus dem Gel isoliert (Kapitel 3.2.8). 1  $\mu\text{g}$  der linearisierten Vektoren wurden mit 2  $\mu\text{l}$  DIG RNA labeling Mix, 2  $\mu\text{l}$  T3 oder T7 RNA Polymerase (abhängig von der Orientierung), 4  $\mu\text{l}$  5xTranskriptionspuffer und 0,5  $\mu\text{l}$  RNAsin versetzt und das Volumen auf 20  $\mu\text{l}$  mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss die Reaktion mit 2  $\mu\text{l}$  0,2M EDTA abgestoppt. Nach einer alkoholischen Fällung (Kapitel 3.2.6) wurde das trockene Pellet in 20  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Davon wurde 1  $\mu\text{l}$  über Gelelektrophorese auf eine mögliche Degradation überprüft und das Restvolumen mit 200  $\mu\text{l}$  Hybe aufgefüllt. Die Lagerung der Sonde in Hybe erfolgte bei -20°C.

### 3.2.11 Isolierung von RNS

Für die Isolierung von RNS aus Larven wurden die Tiere mit einem Spatel zusammen mit dem Futter auf ein Zellsieb überführt und vorsichtig mit ddH<sub>2</sub>O von Futter gereinigt. Larven wurden mit einer Pinzette abgesammelt und in vorbereitete Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die Isolierung der RNS erfolgt mit dem **NucleoSpin RNAII Kit** von Macherey-Nagel nach dem Protokoll TOTAL RNA ISOLATION - USER MANUAL.

Die Isolierung von RNS aus Adulten und Embryonen erfolgte mit der **TriFast-Methode**. Verwendet wurden maximal 10 Fliegen, die zunächst unter CO<sub>2</sub>-Betäubung isoliert und nach 24 h auf Fliegenfutter in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Embryonen wurde mit ddH<sub>2</sub>O gereinigt. Die Fliegen oder Embryonen wurden in Polypropylengefäße aus dem Precellys Keramik-Kit mit 700  $\mu\text{l}$  TriFast überführt. Im Homogenisator wurden die Tiere dreimal für 10 sek bei 5.500 Upm, mit einem zeitlichen Abstand von 20 sek, zerkleinert. Die RNS-Extraktion erfolgte nach dem Standardprotokoll von peqGold TriFast™ OPTIMIERTE GUANIDINISOTHIOCYANAT/PHENOL-METHODE FÜR DIE GLEICHZEITIGE EXTRAKTION VON RNA, DNA UND PROTEINEN. Nach dem Trocknen wurde die RNS in 50  $\mu\text{l}$  RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.2.12 cDNS-Synthese durch Reverse Transkription

Die cDNS-Synthese aus isolierter RNS erfolgte mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von Qiagen. 0,5  $\mu\text{g}$  RNS wurden mit 1  $\mu\text{l}$  Wipeout-Puffer versetzt, mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O

### 3 Methoden

auf 7  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und bei 42°C für 2 min inkubiert, um eventuell vorhandene DNS zu entfernen. Für die Reverse Transkription wurde ein Reaktionsansatz aus 2  $\mu\text{l}$  Puffer, 0,5  $\mu\text{l}$  Primer-Mix und 0,5  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase angesetzt, gut gemischt und zu jeder RNS-Lösung gegeben. Nähere Angaben sind dem QUANTITECT<sup>®</sup> REVERSE TRANSCRIPTION HANDBOOK zu entnehmen. Eine Kontrolle wurde ohne Wipeout-Puffer vorbereitet, ebenfalls für 2 min bei 42°C inkubiert und mit einem Reaktionsansatz ohne Reverse Transkriptase versetzt. Für die cDNS-Synthesereaktion wurden die Reaktionsansätze bei 42°C für 20 min und die Reaktion bei 95°C für 5 min abgestoppt. Die neu gebildete cDNS-Lösung wurde auf 100  $\mu\text{l}$  mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

#### 3.2.13 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Bestimmung der Expressionsmenge von Genen auf transkriptioneller Ebene wurde über eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Amplifiziert wurden Fragmente von 100 - 200 bp. Die entsprechenden Primerpaare wurden mit dem Programm *Primer3* ausgewählt. Dem verwendeten Primer-Mix wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (*Sensi-Mix SYBR No-Rox Kit*) zugefügt, der in jedem Amplifikationsschritt in die neu gebildete DNS interkaliert. Die Fluoreszenzzunahme wurde über das Real-Time System in jedem Reaktionsschritt gemessen, um damit Rückschlüsse auf die ursprünglich eingesetzte Menge der cDNS und damit des Transkripts eines Gens ziehen zu können. Verglichen wurde die Transkriptmenge des Gens in unterschiedliche Entwicklungsstadien, unter verschiedenen Futterbedingungen oder als Test auf Deletion bzw. Fehlregulation. Die relative Quantifizierung der Transkriptmenge erfolgte durch die Referenzgene *rp49* oder *actin*. Die zu untersuchenden Gene und die Referenzgene wurden doppelt pipettiert. Von jeder Versuchsbedingung wurden mindestens zwei biologische Wiederholungen durchgeführt.

Für jeden Reaktionsansatz wurden 7,5  $\mu\text{l}$  SYBR-Green und 0,75  $\mu\text{l}$  Primer-Mix mit 2  $\mu\text{l}$  cDNS in 4,75  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gemischt und jeweils in eine Reaktionskammer einer 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Die Platte wurden versiegelt, die Lösung durch Vortexen gut gemischt und für 2 min bei 4.000 g abzentrifugiert. Die quantitative PCR im Thermocycler erfolgte nach einem dreistufigen Protokoll. Die Aktivierung des SYBR-Green erfolgte durch 10 min Inkubation bei 95°C. Danach wurden folgende Reaktionsschritte 39 mal wiederholt: Denaturierung für 10 sek bei 95°C, Annealing für 10 sek bei 60°C und Elongation für 30 sek bei 72°C.

Die Steuerung des Real-Time Systems und die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der *CFX Manager<sup>TM</sup> Software* und mit *Excel*. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Daten wurde mit *GraphPad Prism* durchgeführt.

### 3.3 *In vivo* und *Ex vivo* Aufnahmen und Färbemethoden

Durch binäre Systeme, wie das Gal4-UAS-System (Duffy [2002]) bzw. das LexA-LexAop-System (Lai und Lee [2006]) konnten Fluoreszenz-Marker über regulatorische Promotorbereiche spezifisch in *Drosophila melanogaster* exprimiert werden. Aus Kreuzungen von Treiber- und Markerlinien wurden in der Folgegeneration Larven auf Fluoreszenz ohne Präparation (*In vivo*) oder durch Aufnahmen an nicht fixierten frisch präparierten Geweben (*Ex vivo*) untersucht. Fluoreszenzaufnahmen waren unter einem geringen zeitlichen Aufwand möglich, erlaubten die Messung sich verändernder Fluoreszenzintensitäten und unspezifische Immunfluoreszenz wurde vermieden.

An fixierten Geweben von Larven konnte eine Genexpression entweder auf Transkriptionsebene durch *In situ* Hybridisierungen (siehe Kapitel 3.3.5) oder auf Proteinebene durch immunhistochemische Färbungen, mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper, detektiert und visualisiert werden. Die Färbungen waren stärker, stabiler und erlaubten parallel den Nachweis mehrerer Gene. Die Aufnahmen der Präparate wurden entweder am Konfokalmikroskop über *Zen* oder am Lumar-Stereomikroskop mit *AxioVision* durchgeführt. Für eine weitere Bearbeitung und Auswertung der Bilder wurden die Programme *Zen*, *AxioVision*, *Adobe Photoshop* oder *ImageJ/Fiji* verwendet.

#### 3.3.1 *In vivo* Aufnahmen von Larven

Für *In vivo* Aufnahmen wurden Larven mit H<sub>2</sub>O aus dem Futter gewaschen und über ein Zellsieb aufgefangen. Auf einem Objektträger wurde ein Tropfen MESAB vorgelegt, ein Muskelrelaxans, das häufig bei Zebrafischen angewendet wird, aber auch auf frühe Larvenstadien von *Drosophila* wirkt (Bader, R., unveröffentlichte Daten). Die Larven wurden mit einer Pinzette in das MESAB überführt und für die Aufnahmen mit einem Deckglas bedeckt. Überschüssiges MESAB wurde vorsichtig abgesaugt und die Tiere wurden durch den Druck des Deckglases abgeflacht. Die Untersuchung der Larven erfolgte am Konfokalmikroskop oder am Lumar-Stereomikroskop.

#### 3.3.2 *Ex vivo* Aufnahmen von Larvengehirnen

Für *Ex vivo* Aufnahmen der Larvengehirne wurden die Larven zunächst in PBS gewaschen. Die Präparation der Gehirne erfolgte in gekühltem PBS in einem Glasblockschälchen. Auf einem Objektträger wurde ein Tropfen Mowiol ausgestrichen. Frisch präparierte Gehirne wurden ohne Fixierung mit wenig PBS auf das Mowiol überführt und ausgerichtet. Nach dem Eindeckeln wurde das Expressionsmuster am Konfokalmikroskop aufgenommen.

#### 3.3.3 *Ex vivo* Aufnahmen pharyngealer Nerven

Das Expressionsmuster der Linie UAS-eYFP;hugR84.6-Gal4 wurde in den pharyngealen Nerven im Kopfbereich von Larven im dritten Entwicklungsstadium untersucht. Durch die gezielte Präparation der Nerven konnte *Ex vivo* die promotorspezifische Expression des Fluoreszenzmarkers eYFP unter dem Konfokalmikroskop betrachtet werden. Es war möglich sowohl die Identität der Nerven, als auch ihre Verbindung mit den gustatorischen Organen und dem ZNS festzustellen. Die Präparation der pharyngealen Nerven wurde in Zusammenarbeit mit A. Schoofs durchgeführt.

Die Larven wurden in Ringerlösung B gewaschen, in eine Zellkulturschale mit Silikonboden überführt und anschließend in Ringerlösung B präpariert. Die Larven wurden zunächst mit spitz-geätzten Wolframnadeln auf dem Silikonbett posterior und anterior fixiert und entlang der Körperlängsachse dorsomedial aufgeschnitten. Die Kutikula wurde mit Wolframnadeln lateral aufgespannt und dann die Fettkörper, das Tracheensystem und die Speicheldrüsen entfernt. Nach diesen Präparationsschritten konnten die ersten Aufnahmen der pharyngealen Nerven durchgeführt werden.

In der weiterführenden Präparation wurde zusätzlich der Verdauungstrakt entfernt und der Hautmuskelschlauch zwischen dem Metathorakalsegment und dem ersten Abdominalsegment durchtrennt. Die Abdominalsegmente des Hautmuskelschlauchs wurden nach posterior verschoben und mit einer Nadel fixiert. Der anteriore Bereich wurde bis auf das Pseudocephalon entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Augenimaginalscheiben von den Hemisphären des Protocerebrums abgetrennt und zusätzlich die Ringdrüse und die Aorta entfernt. Danach wurde das CPS auf die Seite gedreht und mit einer Wolframnadel fixiert. Abschließend konnten nach diesen Präparationsschritten weitere Aufnahmen der pharyngealen Nerven und ihrer Verbindung zu den gustatorischen Organen durchgeführt werden.

#### 3.3.4 Fixierung von Geweben

Für Fluoreszenz *In situ* Hybridisierungen, histochemische *In situ* Hybridisierungen und immunhistochemische Färbungen wurden larvale Gewebe in einem gekühlten Glasblockschälchen mit physiologischer 1x Ringerlösung oder mit 1x PBS präpariert und anschließend fixiert. Für jeden Versuchsansatz wurden 10 Gehirne von *Drosophila*-Larven zusammen mit den Mundhaken freipräpariert. Zur Untersuchung des Kopfbereichs der Larven wurde bei der Präparation das Gewebe posterior des VNS vollständig entfernt.

Die folgenden Schritte wurden, falls nicht anders erwähnt, auf dem Drehrad bei RT durchgeführt. Die Präparate wurden zur Fixierung in ein 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit 3,7%

(v/v) Fomaldehyd mit 0,5 PBT überführt und für 40 - 60 min inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen (5/5/15/30 min) wurden die Gewebe stufenweise (5 min 30%/ 5 min 70% MetOH in PBT) in 100% MetOH überführt und mindestens über Nacht bei -20°C gelagert. Vor der Färbung wurden die Präparate zunächst stufenweise rehydratisiert (5 min 70%/ 5 min 30% MetOH in PBT) und anschließend mehrmals (5/5/15/30/60 min) mit 0,5 PBT gewaschen, um störende Methanolreste zu entfernen.

#### 3.3.5 Fluoreszenz *In situ* Hybridisierung (FISH) und histochemische *In situ* Hybridisierung

Die histochemische *In situ* Hybridisierung bzw. Fluoreszenz *In situ* Hybridisierung (FISH) in Larvengehirnen von *Drosophila* wurde zum Nachweis der räumlichen und zeitlichen Expression von Gentranskripten genutzt. Die Grundlage beider Methoden war die intrazelluläre Hybridisierung von mRNS im Expressionsort mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten DNS-Sonde.

Je 10 Larvengehirne wurden zusammen mit den Mundhaken in Ringerlösung freipräpariert, fixiert und in MetOH gelagert (siehe Kapitel 3.3.4). Vor der Hybridisierung wurden die Gehirne rehydratisiert und die Hybridisierungslösungen HybeB und Hybe im Wasserbad auf 65°C erwärmt. Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung, wurden die Gehirne zunächst mit 250  $\mu$ l 0,5 PBT und 250  $\mu$ l Prähybridisierungspuffer HybeB, dann mit 250  $\mu$ l HybeB und zuletzt mit 250  $\mu$ l Hybe im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Die letzte Waschlösung wurde auf den Geweben belassen und mit weiteren 250  $\mu$ l Hybe ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 60 min bei 65 °C im Wasserbad wurde der Überstand abgenommen und im Restvolumen erfolgte die Hybridisierung mit 1-5 $\mu$ l Digoxigenin- markierter DNS-Sonde über Nacht bei 65°C. Am nächsten Tag wurden 300  $\mu$ l Hybe zugegeben, nach 5 min der Überstand abgenommen und nach Zugabe von weiteren 300  $\mu$ l Hybe die Gehirne für etwa 1 h posthybridisiert. Danach wurden die Gehirne stufenweise mit Hybe, zweimal mit Hybe-B und dann mit Hybe-B in 0,1 PBT bei 65°C wieder in 0,1 PBT überführt.

Für die *In situ* Hybridisierung wurden die Gehirne nach mehreren Waschschritten in 0,1 PBT bei RT mit einem AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin in 0,1 PBT für 1 h inkubiert und anschließend erneut 5 mal mit 0,1 PBT (1/1/5/15/30 min) gewaschen. Danach wurden sie in AP-Puffer überführt. Die Färbereaktion erfolgte im Dunkeln bei 37°C durch Zugabe von 4,5  $\mu$ l NBT und 3,5  $\mu$ l BCIP (X-Phospat) in 1 ml AP-Puffer. Nachdem die gewünschte Intensität der Färbung erreicht war wurde die Reaktion durch dreimaliges Waschen mit 0,5 PBT abgestoppt. Im Glasblockschälchen erfolgte die Endpräparation, bei der die Larvengehirne von den Mundhaken und zusätzlichem Gewebe, wie z.B. den Augenimaginalscheiben und Kutiku-

### 3 Methoden

laresten, befreit wurden. Die Gehirne wurden in Mowiol eingedeckelt.

Für die **Fluoreszenz *In situ* Hybridisierung (FISH)** wurden die Gehirne nach der Posthybridisierung ausführlich in 0,1 PBT gewaschen und dann mit 5% Ziegen Serum in 0,1 PBT blockiert. Die Arbeitsschritte wurden nach der Arbeitsvorschrift für TSA<sup>TM</sup> PLUS FLUORESCENCE SYSTEMS angepasst. Die Gehirne wurden in ein 0,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Ein POD-gekoppelter  $\alpha$ -Digoxigenin Antikörper wurde zugegeben und die Gehirne bei 4°C über Nacht inkubiert. Für eine immunhistochemische Doppel- oder Dreifachfärbung konnten in diesem Schritt zusätzliche Antikörper zugefügt werden. Die Antikörperlösung wurde am nächsten Tag abgenommen und die Gehirne wurden ausgiebig (5/5/15/30/60 min) mit 0,1 PBT gewaschen. Danach wurden die Gehirne mit 300  $\mu$ l 1x Amplifikationslösung (*1X Plus Amplification Diluent*) gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten im Dunkeln. Der Überstand wurde abgenommen und die Gehirne wurden mit einem Fluorescein-gekoppelten Tyramid (1:100) in 250  $\mu$ l Amplifikationslösung für 7 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Gehirne in ein 1,5 ml-Ultrazentrifugenröhrchen überführt, erneut mehrfach in 0,5 PBT gewaschen und mit 5% Ziegen Serum in 0,5 PBT für 1 h blockiert. Es folgte optional eine Inkubation mit Sekundärantikörpern gegen zusätzliche Primärantikörper in 0,5 PBT für 1,5 h. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Gehirne erneut in 0,5 PBT (5/5/15 und 30 min) gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI in einer Konzentration von 1:1000 in 0,5 PBT zugegeben und nach 5 min Inkubationszeit abgenommen. Die Gehirne wurden noch zweimal für 5 min mit 0,5 PBT gewaschen. Nach der Endpräparation (Entfernung von Mundhaken und Geweberesten) im Glasblockschälchen wurden die Gehirne in Mowiol eingedeckelt. Die Untersuchung der Fluoreszenz erfolgte am Konfokalmikroskop.

#### 3.3.6 Immunhistochemische Färbungen

Das Expressionsmuster bestimmter Gene wurde auf Peptidebene durch eine indirekte Immunfluoreszenz an fixierten Geweben visualisiert. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper für diese immunhistochemischen Färbungen sind in Tabelle 2.2 auf Seite 17 zusammengefasst. Für jeden Versuchsansatz wurden entweder 10 Larvengehirne oder der Kopfbereich von 5 Larven präpariert und fixiert (siehe Kapitel 3.3.4).

Die folgenden Schritte wurden, falls nicht anders erwähnt, bei RT auf dem Drehrad durchgeführt. Für die immunhistochemische Färbung wurden die Gewebe wieder schrittweise rehydratisiert, mit 0,5 PBT gewaschen (5/15/15/30/60 min) und mit 1 ml Blockierungslösung (5% Ziegen Serum in 0,5 PBT) bei RT inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Die Blockierungslösung wurde ausgetauscht, die primären Antikörper zugegeben und über Nacht



inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen mit 0,1 PBT (5/5/15/30/60 min) entfernt und die Gewebe wurden mit 5% Ziegen Serum in 0,1 PBT blockiert. Die nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Nach Austausch der Blockierungslösung erfolgte für 90-120 min die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Dieser wurde durch erneutes Waschen mit 0,1 PBT (5/15/15/30 min) entfernt. Als Hintergrundmarker wurde optional zusätzlich eine Inkubation mit dem Zellkernmarker DAPI für 5 min durchgeführt und anschließend noch zweimal für 5 min mit 0,1 PBT gewaschen. Bei der Endpräparation der Gehirne wurde überschüssiges Gewebe, zusammen mit den Mundhaken entfernt. Der Kopfbereich der Larven und die Gehirne wurden in Mowiol eingedeckelt. Die Untersuchung der Gewebe erfolgte am Konfokalmikroskop.

## 3.4 *In silico* Methoden zur Fluoreszenzauswertung

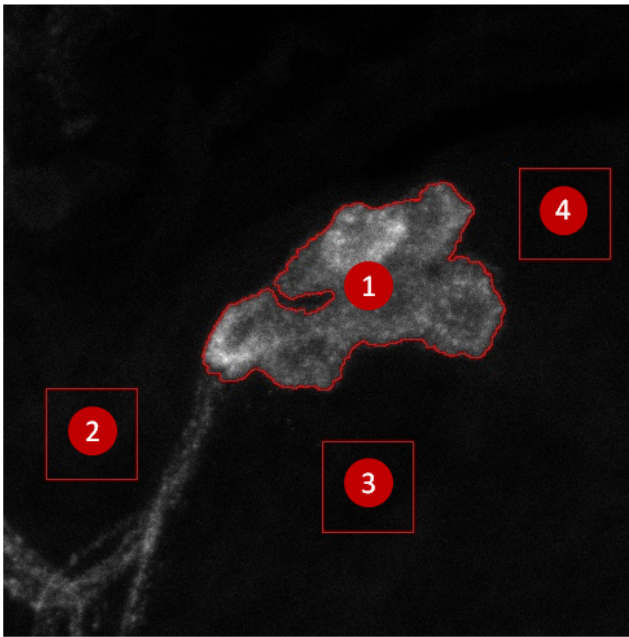
### 3.4.1 Quantitative Bestimmung der intrazellulären *Drosophila Insulin-like peptide* Dilp2-Konzentration

Die Konzentration des *Drosophila Insulin-like peptides* Dilp2 in den Insulin-produzierenden Zellen (IPCs) wurde quantitativ durch Messung der Immunfluoreszenz am Konfokalmikroskop nach einer immunhistochemischen Färbung bestimmt. Zunächst wurde als Kontrolle die nahrungsabhängige Veränderung der Dilp2-Konzentration in den IPCs in Gehirnen von Wildtyp-Larven untersucht. Anschließend wurde der Hugin-Rezeptor CG8784 durch Verwendung der Linie UAS-hugR84C in den IPCs überexprimiert und der Einfluss auf die Dilp2-Konzentration unter verschiedenen Futterbedingungen gemessen. Als Treiberlinie wurden Weibchen einer neuen etablierten Linie verwendet, in denen das Konstrukt Dilp2-Gal4 über einen CyO-Balancer mit konstitutiv aktivem GFP (CyO<sub>twist</sub>GFP) stabil eingekreuzt wurde. Tiere des Genotyps CyO<sub>twist</sub>GFP/UAS-hugR84C wurden als Kontrollgruppe verwendet.

Über einen Zeitraum von 4 h wurden Eiablagen auf Apfelsaftagar mit Hefe (AA+Y) gesammelt und die Tiere bei 25°C gehalten. 26 +/- 2 h nach der Eiablage (AEL) wurden zweimal 30 Larven, zur Kontrolle der Larvendichte, auf eine frische Platte AA+Y überführt. Der Genotyp der Tiere wurde gegebenenfalls am Fluoreszenz-Stereomikroskop bestimmt. 74 +/- 2 h AEL wurden je 30 Larven der Wildtypen entweder auf Fliegenfutter mit doppelter Hefekonzentration (Fliegenfutter 2xY) oder auf Hungermedium aus PBS-Agar mit 1% Saccharose (PBS) in Anzuchtgefäßen überführt. Larven der Kreuzung UAS-hugR84C und Dilp2/CyO<sub>twist</sub>GFP wurden entweder mit AA+Y gefüttert oder ebenfalls auf das Hungermedium überführt.

Die Präparation und Fixierung der Gehirne erfolgte 96 +/- 2 h AEL (Kapitel 3.3.4). Die immunhistochemische Färbung wurde mit dem Dilp2-Antikörper gp  $\alpha$ -Dilp2 (1:1000) und dem

Fluoreszenzmarker-gekoppelten Sekundärantikörper  $\alpha$ -gp A633 durchgeführt (Kapitel 3.3.6). Die Dilp2-Konzentration in den IPCs wurde anhand der Intensität der Immunfluoreszenz entsprechend der Publikation von Géminard et al. [2009] bestimmt. Die IPCs wurden in Gruppen von 7 Zellen in jeder Hemisphäre mit einem 63x Objektiv bei 2x Vergrößerung und der Einstellung des Photomultipliers (*Master Gain*) auf 825 Volt untersucht. Die Steuerung des Konfokalmikroskops und die Z-Stapel Aufnahmen der IPCs erfolgte mit *Zen*.



**Abbildung 3.1: Bestimmung der Immunfluoreszenz**

Aufsummierte Z-Stapel Aufnahme. Fläche 1 markiert die IPCs, die Flächen 2-4 markieren drei Bereiche zur Messung der Hintergrundfärbung.

Die Verarbeitung und Auswertung der Aufnahmen wurde mit *Fiji* durchgeführt und ist im Folgenden beschrieben.

Zunächst wurden die mit *Zen* erzeugten Z-Stapel in *Fiji* geöffnet [**File** → **Open...**]. Durch die Auswahl der Funktion *Z-Project* [**Image** → **Stacks** → **Z-Project...**] öffnete sich ein neues Fenster *Zprojection*. Durch Auswahl des ersten Bildes (**start slice**), des letzten Bildes (**stop slice**) und der Option **projection type** (**Sum Slices**) wurden die Einzelbilder der Z-Stapelaufnahmen zu einem Bild aufsummiert. Scharf abgegrenzte intrazelluläre Bereiche wurden optisch geglättet [**Process** → **Smooth**]. Die Zellbereiche wurden über den Schwellenwert der Intensität der Grauwerte bestimmt [**Image** → **Adjust** → **Threshold** → **apply**] und wurden, falls nötig, manuell

mit der Stiftfunktion [**Pencil tool**] nachkorrigiert. Einzelne Zellen oder Zellgruppen wurden mit dem Zauberstab-Werkzeug [**Wand (tracing) tool**] markiert und die Zellumrisse in den *ROI Manager* [Tastenkombination: **Strg+t**] übertragen. Das bearbeitete aufsummierte Bild wurde geschlossen. Aus dem Z-Stapel wurde eine neue Projektion generiert und der Hintergrund im Bereich der Hemisphäre wurde über drei quadratische Felder [**Rectangle Tool**] mit der Kantenlänge 70 [**Edit** → **Selection** → **Specify** → **Width: 70, Height: 70**] mit unterschiedlicher Position markiert. Alle drei wurden nacheinander in den *ROI-Manager* übertragen [Tastenkombination: **Strg+t**]. Der markierte IPC-Bereich (Fläche 1) und die Abschnitte für die Hintergrundfärbung (Fläche 2-4) sind an einem Beispiel in Abbildung 3.1 gezeigt. Im Anschluss

wurde über den *textitROI-Manager* die Messung der Grauwerte durchgeführt [*ROI Manager: Measure*]. Es öffnete sich ein neues Fenster (*Results*). Aus diesem wurden die Werte der Fläche, des durchschnittlichen Grauwerts und die durchgängige Intensität (*Area; Mean; IntDen*) der markierten Bereiche in *Excel* übertragen. Der Mittelwert der Grauwerte des Hintergrunds wurde bestimmt ( $H = (\text{Fläche } 2 + \text{Fläche } 3 + \text{Fläche } 4) / 3$ ) und vom mittleren Grauwert der Fluoreszenz innerhalb der IPCs abgezogen ( $\text{Fläche } 1 - H$ ). Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Fluoreszenz wurde in *GraphPad Prism* durchgeführt.

#### 3.4.2 Optische Auswertung von Aktionspotentialen

GCaMP3 ist ein genetisch kodierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator (GECI), der in neuronalen Zellen von *Drosophila* exprimiert und über Fluoreszenz detektiert werden konnte. Durch Aktionspotentiale kam es zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in neuronalen Zellen, welches an GCaMP3-Molekülen binden konnte. Dies führte zu einer Konformationsänderung und zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität von GCaMP3 (Abbildung 4.9). Diese *In vivo* Methode ermöglichte somit optisch die Aktivität neuronaler Zellen zu untersuchen (Tian et al. [2009]).

Die CG8784-spezifische Treiberlinie (*hugR84.6-Gal4 L1.3*) wurde mit UAS-GCamp3 gekreuzt. Aus L3-Larven der Nachkommen wurden in einer Zellkulturschale mit Siliconboden Gehirne in Ringerlösung B freipräpariert. Mit einer Spritze wurde ein Bett aus Vaseline auf das Silicon aufgebracht, ein präpariertes Gehirn mit der Ventralseite nach oben darauf gelegt und für Zeitreihen-Aufnahmen am Konfokalmikroskop ausgerichtet.

Die Aufnahme der GCaMP3-Aktivität im ventralen Nervensystem erfolgte bei weit geöffnetem *Pinhole* am Konfokalmikroskop über die Funktion **Zeitreihen** mit dem Programm *Zen*. Verwendet wurde das Objektiv LCI Plan-Neofluar 25x. Die Anregung von GCaMP3 erfolgte mit einem Laser bei 488 nm Wellenlänge und die Emission wurde bei 491-543 nm detektiert. Es wurden 250-300 Bilder aufgenommen, mit einer Aufnahme alle 0,8 s.

Die Zeitreihen wurden mit *Fiji* geöffnet und der Durchlichtkanal vom Fluoreszenzkanal getrennt [**Image** → **Color** → **Split Channels**]. Der Durchlichtkanal wurde geschlossen. Im ventralen Nervensystem wurden mit einem Rechteck [**Rectangle Tool**] aufeinanderfolgende Abschnitte markiert, die jeweils einen Abdominal- bzw. Thorakalnerv enthielten, und in den *ROI-Manager* übertragen [Tastenkombination: **Strg+t**]. Durch *Fiji* wurden automatisiert die Grauwerte in den markierten Bereichen in jedem Bild der Zeitreihe [*ROI Manager: Multi Measure*] gemessen und in einem neuen Fenster (*Results*) ausgegeben. Die Fläche (*Area*) und die mittleren Grauwerte der Fläche (*Mean*) wurden jeweils zur Auswertung in *Excel* übertragen. Die gemessenen Grauwerte in jedem Rechteck entsprachen der mittleren Fluoreszenzintensität.

### 3 Methoden

Die Auswertung der Daten erfolgte zunächst an einem Liniendiagramm in dem die mittlere Fluoreszenzintensität ( $F_I$ ) gegen die Zeit ( $t$ ) aufgetragen wurde.

In jedem markierten Bereich wurde die Grundfluoreszenz ( $F_G$ ) von GCaMP3 bestimmt. Dafür wurden Abschnitte der Zeitreihenaufnahmen anhand des Kurvendiagramms ausgewählt in denen keine  $Ca^{2+}$ -induzierte Erhöhung der GCaMP3-Fluoreszenz erkennbar war. Aus diesen Bildern wurde die mittlere Intensität der Grauwerte für jeden Bereich bestimmt und zur Normalisierung von  $F_I$  ( $\Delta F = F_I - F_G$ ) verwendet. Die zeitliche Abfolge der Veränderungen in der Fluoreszenzintensität in markierten Abschnitten konnte so bestimmt und verglichen werden.

## 3.5 Gentechnische Methoden

### 3.5.1 Erzeugung von transgenen Linien

Fremdgene können durch Erzeugung transgener Fliegenlinien dauerhaft in das Genom von *Drosophila* integriert und an die Nachkommen weitergegeben werden. Zwei Methoden, die in *Drosophila* etabliert sind, wurden im Verlauf dieser Arbeit angewendet und sind im Folgenden näher beschrieben.

#### Transposase-vermittelte genomische Integration

Bei der Transposase-vermittelten genomischen Insertion wurden Vektoren genutzt, die mit *Drosophila*-spezifischen transponierbaren Elementen, den P-Elementen, ausgestattet sind (Rubin und Spradling [1982]; Spradling und Rubin [1982]). Fremd-DNS wurde in einen Bereich dieses P-Element Vektors inkloniert, der von kurzen *Inverted Repeats* (IRs) flankiert ist. Eine Transposase erkannte die IRs, hat die zwischenliegende Sequenz ausgeschnitten und sie an beliebiger Stelle im Genom integriert. Innerhalb von 80-90 min nach der Eiablage lagen die Embryonen als syncytiales Blastoderm vor und es waren noch keine Zellwände ausgebildet. Der P-Element-Vektor wurde zusammen mit einem Helferplasmid als Transposasequelle, am posterioren Pol injiziert. In den entstehenden Polzellen, aus denen später die Keimbahnzellen hervorgingen, wurde die Fremd-DNS aufgenommen und in das Genom integriert. Für die Injektion wurden Embryonen der Linie  $w^{1118}$  verwendet, die Aufgrund eines Defekts im *white*-Lokus weiße Augen ( $w^-$ ) als Phänotyp aufweisen. War die Integration erfolgreich, konnte in der  $F_1$ -Folgegeneration auf Rettung des Markerdefekts durch ein Co-integriertes *white*-Gen ( $w^+$ ) selektiert werden (Hazelrigg et al. [1984]). Als P-Element Vektoren wurden für Treiberkonstrukte pCaSpeRAUG-Gal4-X (Vosshall et al. [2000]) und pChs-Gal4 (Apitz [2002]) verwendet.

#### **Integrase-vermittelte ortsspezifische Integration durch attB/attP-abhängige Rekombination**

Phagen besitzen die Fähigkeit ihr Genom als lysogener Phage in das Genom einer Wirtszelle einzufügen. Vermittelt wird die Integration über eine Integrase aus der Tyrosin-Rekombinasefamilie. Diese erkennt eine unidirektionale Bindestelle jeweils im Phagengenom (attP) und im Bakteriengenom (attB) und vermittelt die Integration durch eine ortsspezifische Rekombination. Die Kombinationen der beiden neu gebildeten Bindestellen werden als attL und attR bezeichnet.

In *Drosophila* wurde dieses System adaptiert und es wurden Linien mit künstlich generierten Pseudo-attP-Stellen etabliert, deren Integrationsort genau lokalisiert ist (Groth et al. [2004]). Eine endogene Integrasequelle aus dem Phagen  $\Phi$ C31 auf dem vierten oder dem X-Chromosom ermöglichte die genomische Integration (Bischof et al. [2007]).

Als Vektoren wurden für ein Überexpressionskonstrukt von CG8784 pUAST-attB (Bischof et al. [2007]) und für Promotorkonstrukte pBPnlsLexA::p65Uw (Pfeiffer et al. [2010]) verwendet. Nach der Injektion ermöglichte ein 285bp großes attB-Fragment des entsprechenden Vektors die ortsspezifische chromosomale Integration durch eine  $\Phi$ C31-vermittelte intermolekulare Rekombination. Als attP-Linien wurden attP40 (Markstein et al. [2008]), ZH-86Fb und ZH-51C (Bischof et al. [2007]) mit einem w<sup>-</sup>-Allel verwendet. Die Selektion der transgenen Linien erfolgte ebenfalls über den Co-integrierten Augenmarker *white*.

#### **3.5.2 Probenvorbereitung**

Die Maxi-Präparation des jeweiligen Vektorkonstrukts wurde für 10 min abzentrifugiert, um ungelöste DNS und Staubteilchen zu pelettieren. Vom Überstand wurden 6  $\mu$ g abgenommen und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l verdünnt. Bei P-Element-Vektoren wurden zusätzlich 2 $\mu$ g des Helferplasmids  $\Delta$ 2,3 zugefügt (Robertson et al. [1988]). Die DNS wurde mit 1/10 des Volumens 3M NaAc pH 6 und 1,5 fachem Volumen 100% EtOH gefällt, zentrifugiert und mit 70% EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 20 $\mu$ l Injektionspuffer aufgenommen. Direkt vor der Injektion wurde die Injektionslösung bei 4°C und 13.000 Upm nochmals für 25 min abzentrifugiert.

#### **3.5.3 Injektion**

Eine ausreichende Anzahl adulter Fliegen wurde im Dunkeln in Populationskäfigen mit auswechselbarer Bodenplatte aus Apfelagar gehalten. Die Bodenplatte mit Nachteiern wurde morgens verworfen und durch eine frische ersetzt, auf der über einen Zeitraum von 30 min 100-150 Eier für die Injektion der Vektorkonstrukte gesammelt wurden. Diese wurden mit einem Pinsel in ein

### 3 Methoden

Gefäß mit Netzboden überführt, in dem sie für die folgenden Behandlungsschritte verblieben. Zuerst wurden die Eier durch Waschen mit  $H_2O$  von überschüssigem Apfelagar und Hefe befreit. Anschließend erfolgte eine Dechorionierung in 6% Natriumhypochloridlösung. Der Fortschritt wurde unter dem Binokular beobachtet und nach etwa 2 min durch dreimaliges Waschen mit  $H_2O$  beendet. 60-80 Eier wurden aus dem Netzkörbchen auf ein rechteckiges Stück Apfelagar überführt und mit einer Nadel so nebeneinander aufgereit, dass die Mikropyle am anterioren Pol über den Rand des Apfelagars herausragte. Auf ein Deckglas mit 24 x 44 mm wurde an einer Längsseite eine Klebstofflösung aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden damit die aufgereiten Eier so aufgenommen, dass sie anschließend mit dem posterioren Pol zur vorderen Kante des Deckglases orientiert waren. In einer Trockenbox mit Silicagel wurden die Eier für 9-10 min getrocknet. Zum Schutz vor weiterem Austrocknen wurden sie anschließend mit Halocarbonöl überschichtet, das gleichzeitig einen Gasaustausch ermöglichte. Mit einem Tropfen Wasser wurde das Deckglas auf einem Objektträger befestigt und zur Injektion unter dem Mikroskop fixiert. Für die Injektion wurde eine Femtotip-Injektionsnadel mit  $1,2 \mu l$  der Injektionslösung befüllt, in die Injektionsvorrichtung eingespannt und ausgerichtet. Im Halocarbonöl wurde die Nadel auf Durchlässigkeit und abgegebenes Injektionsvolumen überprüft und gegebenenfalls nachreguliert. Danach erfolgte die Injektion in den posterioren Pol der Embryonen, an dem sich die Polzellen befanden. Die injizierten Embryonen wurden mit dem Deckglas auf eine Apfelagarplatte überführt und auf einer daraufliegenden Pipettenspitze ausgerichtet. Etwas Trockenhefe diente als Futter für die geschlüpften Larven. Die Entwicklung erfolgte bei  $18^\circ C$ .

#### 3.5.4 Selektion von Transgenen

Männchen und Weibchen mit injiziertem P-Element-Konstrukt, wurden einzeln mit jeweils drei Individuen der  $w^{1118}$ -Linie rückgekreuzt und die Nachkommen auf Rettung des Augenmarkers ( $w^+$ ) untersucht. Die transgenen Tiere wurden erneut einzeln mit  $w^{1118}$  rückgekreuzt.

Die injizierten Tiere der attP-Linien **ZH-86Fb** und **ZH-51C** wurden mit der  $w^{1118}$ -Linie gekreuzt. Transgene Männchen wurden nach  $w^+$  selektiert und mit Weibchen der  $w^{1118}$ -Linie gekreuzt, um die Integrase auf dem X-Chromosom zu entfernen. In der Linie **attP40** war die Integrase auf dem X-Chromosom mit einem weiteren Augenmarker *rosy* ( $ry^+$ ) markiert. Aufgrund der schwer zu unterscheidenden Färbung der Augen, wurden für die Rückkreuzung mit der Linie  $w^{1118}$  nur Männchen verwendet. In der Folgegeneration konnten  $w^+$ -Männchen als Transgene identifiziert werden, die erneut mit  $w^{1118}$ -Jungfrauen gekreuzt wurden.

Aus den transgenen Linien wurden nach Möglichkeit mehrere unabhängige homozygote Linien etabliert. Bei homozygot letalen Linien wurden Konstrukte auf dem zweiten Chromosom

mit dem Balancer CyO, Konstrukte auf dem dritten Chromosom mit dem Balancer TM3, Sb stabilisiert.

### 3.5.5 Chromosomenlokalisierung

Im Gegensatz zur ortsspezifischen Integration durch attB/attP-Rekombination war der Integrationsort der P-Element-Konstrukte im Genom unbekannt. Für spätere Kreuzungen war es wichtig das Chromosom zu bestimmen auf dem die jeweiligen Konstrukte integriert wurden. Die Bestimmung der Chromosomenlokalisierung erfolgte für alle P-Element-Konstrukte an mindestens zwei unabhängigen Linien mit Hilfe der Doppelbalancer-Linie  $w^{1118};Sp/CyO;Dr/TM3, Sb$  (kurz: Sp/CyO;Dr/TM3, Sb). Diese Linie zeichnete sich durch einen  $w^-$ -Augenphänotyp und vier Marker aus. Auf dem

zweiten Chromosom lag der Marker *Sternopleural* (Sp: erhöhte Borstenzahl unterhalb der Halteren) stabilisiert über den Balancer CyO *Curly* mit dem Marker (Cy: aufgewölbte Flügel). Auf dem dritten Chromosom lag der Marker *Drop* (Dr: verkleinerte, tropfenförmige Augen) stabilisiert über den Balancer TM3 mit einem Allel für *Stubble* (Sb: verkürzte Thorakalborsten). Die injizierten P-Element-Konstrukte kodierten für ein *white*-Gen und

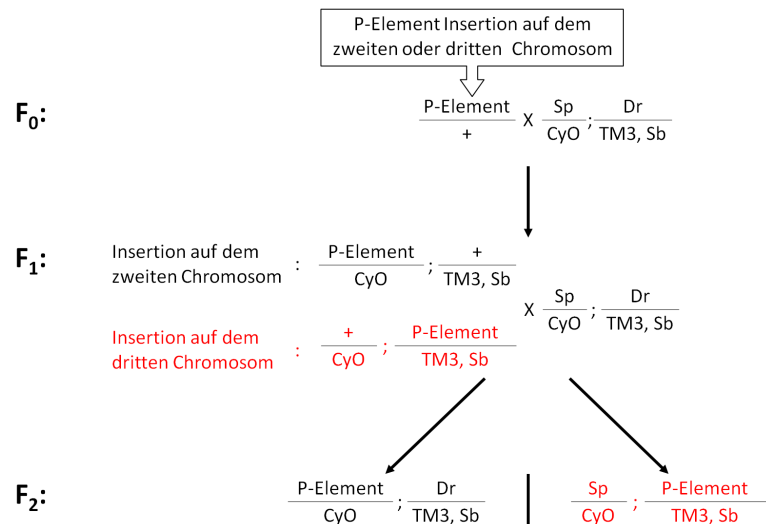


Abbildung 3.2: Kreuzungsschema der Chromosomenlokalisierung

Transgene konnten anhand der roten Augenfarbe in allen Generationen verfolgt werden. Das Kreuzungsschema ist in Abbildung 3.2 gezeigt.

Von jeder zu untersuchenden Linie wurden transgene Männchen ausgewählt und diese mit Weibchen der Doppelbalancerlinie gekreuzt. Traten in der ersten Folgegeneration (F<sub>1</sub>) nur Weibchen mit roten Augen auf, war davon auszugehen, dass das Konstrukt auf dem X-Chromosom integriert wurde. Traten nur rotäugige Männchen auf, wurde es auf dem Y-Chromosom integriert. Als Kontrolle der Insertion auf dem zweiten oder dritten Chromosom wurden Männchen und Weibchen der F<sub>1</sub>-Generation mit P-Element und den Balancern TM3, Sb und CyO selektiert

### 3 Methoden

und mit der Doppelbalancerlinie zurückgekreuzt. Trat in der Folgegeneration ( $F_2$ ) die Markerkombination Sb und Dr auf, war das Konstrukt auf dem zweiten Chromosom integriert, konnte man die Markerkombination Sp und Cy erkennen, lag es auf dem dritten Chromosom. Eine Mehrfachlokalisierung war durch Insertionen auf unterschiedlichen Chromosomen möglich. Traten alle vier Marker in Kombination auf, war eine Insertion auf dem vierten Chromosom möglich.

#### 3.5.6 Fliegenkreuzungen

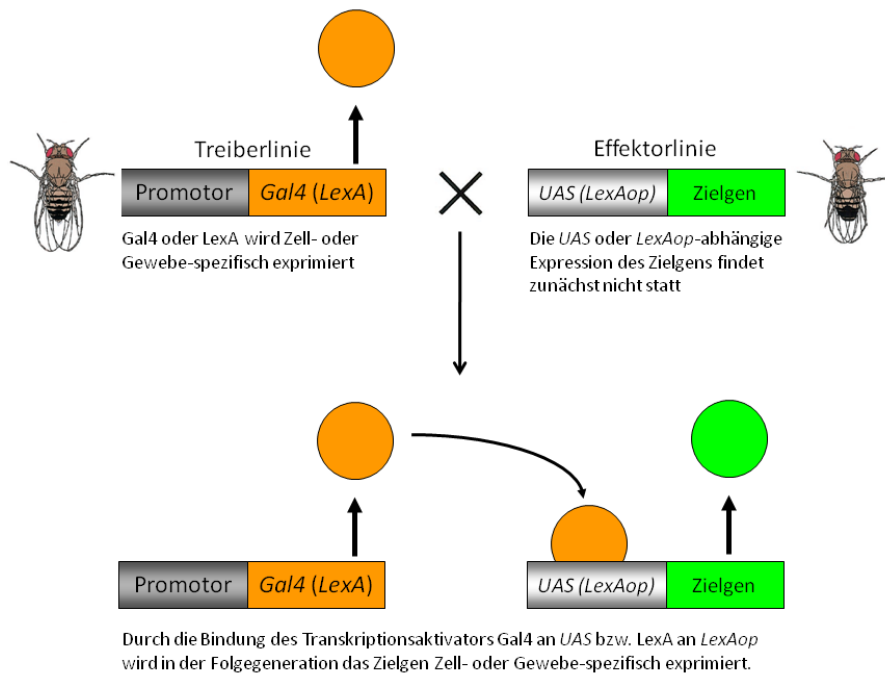
Fliegenkreuzungen wurden mit weiblichen Jungfrauen und 2-3 Tage alten Männchen durchgeführt. Für die Sammlung von Jungfrauen wurden am Morgen alle Adulten aus dem Anzuchtgefäß entfernt. In regelmäßigen Abständen von maximal 6-7 h wurden tagsüber die geschlüpften Tiere abgesammelt und die Weibchen von den Männchen getrennt. Frisch geschlüpfte Weibchen konnten leicht an noch nicht ausgebreiteten Flügeln oder einem dunkelgrünen Punkt auf der Ventralseite des Abdomens (Mekonium) erkannt werden, der als Überbleibsel der letzten Nahrungsaufnahme der Larven übrig geblieben war. Außerdem waren die frisch geschlüpften Weibchen deutlich größer und konnten durch einen helleren Hinterleib von den älteren Weibchen unterschieden werden. Um sicherzustellen, dass die Weibchen unbefruchtet waren, wurden sie vor einer Verkreuzung für 2-3 Tage in frischen Anzuchttröhrchen gehalten und das Futter auf Eier und Larven untersucht. Kreuzungen wurden, falls nicht anders erwähnt, in einem Verhältnis von etwa 3:1 von Weibchen zu Männchen angesetzt. Bei einer Haltung auf 18°C konnten die Jungfrauen für etwa zwei Wochen verwendet werden.

#### 3.5.7 Genexpression durch Verwendung binärer Systeme

Um bestimmte Zielgene kontrolliert exprimieren zu können, wurden die zwei binären Systeme Gal4-UAS und LexA-LexAop genutzt. Das Gal4-UAS-System stammt aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, besteht aus zwei Komponenten und wurde für die Verwendung in *Drosophila* angepasst (Brand und Perrimon [1993]). Durch eine transgene Treiberlinie wurde der hefespezifische Transkriptionsfaktor Gal4 unter Kontrolle eines genspezifischen Promotors in bestimmten Zellen und Geweben exprimiert. Die transgene Effektorlinie enthält eine Promotorregion, die sogenannte *upstream activating sequence* (UAS), an dem Gal4 spezifisch binden kann und damit die Transkription von einem nachgeschalteten Zielgen aktivieren konnte. Durch die Kreuzung von Treiber- und Effektorlinien wurde in der Tochtergeneration das Zielgen in den Zellen exprimiert, in denen auch der Promotor spezifisch aktiviert und damit das Protein Gal4 gebildet wurde (Brand und Perrimon [1993]; Duffy [2002]).



### 3 Methoden



**Abbildung 3.3: Die binären Expressionssysteme Gal4-UAS und LexA-LexAop**

Schematische Darstellung der Kreuzung von Treiber- und Effektorlinien zur kontrollierten Expression eines Zielgens (geändert nach Phelps und Brand [1998]; Duffy [2002]; Lai und Lee [2006]).

Das zweite binäre Expressionssystem LexA-LexAop stammt aus Bakterien und wurde ebenfalls für die Anwendung in *Drosophila* adaptiert. Es funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie das Gal4-UAS-System. In der Treiberlinie wurde LexA unter der Kontrolle eines genspezifischen Promotors exprimiert, das nach Kreuzung mit einer LexAop-Effektorlinie die Expression eines nachgeschalteten Zielgens aktivieren konnte (Lai und Lee [2006]). Der Vorteil der binären Systeme war die beliebige Kombinierbarkeit von Treiber- und Effektorlinien innerhalb eines Systems durch einfache Kreuzungen (Abbildung 3.3). Da beide Systeme unabhängig voneinander funktionieren, war es zudem möglich in einer Fliege Markergene in zwei unterschiedlichen neuronalen Subpopulationen gleichzeitig zu exprimieren (Lai und Lee [2006]; Gordon und Scott [2009]).

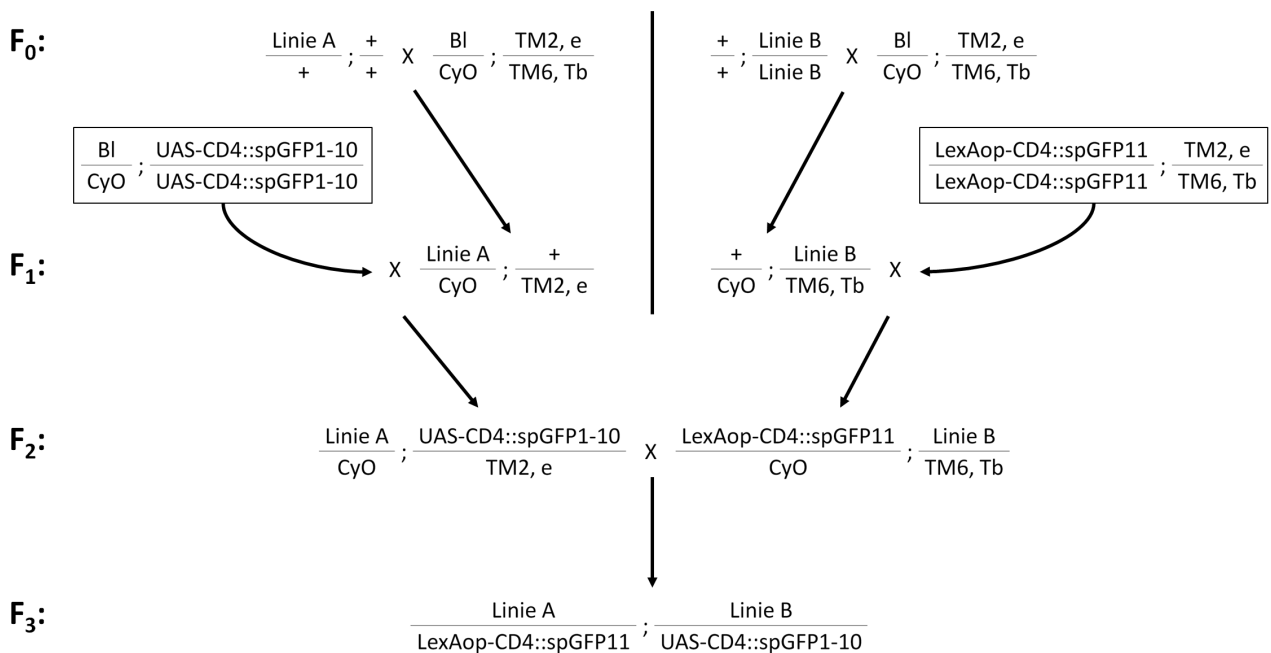
Expressionsmuster von Gal4-Treiberlinien wurden durch Kreuzungen mit den Markerlinien UAS-Cam2.1, UAS-eYFP, UAS-mCD8::GFP und UAS-Gal4;UAS-mCD8::GFP visualisiert, Expressionsmuster von LexA-Treiberlinien durch Kreuzungen mit den Effektorlinien LexAop2-mCD8::GFP #32229 und #32203. Die Fluoreszenzmarker Cameleon 2.1 (Cam2.1) und das verbesserte gelb fluoreszierende Protein (eYFP) waren cytoplasmatisch lokalisiert, das Fusionsprotein eines grün fluoreszierenden Protein mit dem Immunzell-spezifischen CD8 (*cluster of*

*differentiation* 8) membranständig. Mit allen Markern war eine Visualisierung der vollständigen Zelle möglich.

### 3.5.8 Aufklärung der Verbindung neuronaler Subpopulationen durch GRASP (GFP-reconstitution across synaptic partners)

Für die Untersuchung der Verbindung zweier neuronaler Subpopulationen wurde die GRASP-Methode verwendet (*GFP reconstitution across synaptic partners*). Diese Methode beruht auf der Expression von zwei komplementären Untereinheiten des GFP-Moleküls in jeweils einer neuronalen Subpopulation. Die beiden Untereinheiten sind an die Zellmembran gebunden und fusionieren zu einem vollständigen GFP, wenn die Neurone entlang der Zellmembran miteinander in Kontakt stehen (Abbildung 4.13).

Die erste Untereinheit CD4::spGFP11 wurde unter der Kontrolle des LexA-LexAop-Systems exprimiert, die zweite Untereinheit CD4::spGFP1-10 unter der Kontrolle des Gal4-UAS Systems.



**Abbildung 3.4: Kreuzungsschema für GRASP (GFP reconstitution across synaptic partners)**

Dargestellt sind die einzelnen Kreuzungsschritte zur Kombination der Effektorlinien LexAop-CD4::spGFP11 und UAS-CD4::spGFP1-10 mit den promotorspezifischen Treiberlinien Linie A und Linie B in einer Fliege. Eine detaillierte Beschreibung der Methode, der verwendeten Fliegenlinien und der einzelnen Kreuzungsschritte sind dem Text zu entnehmen.

Durch die Fusion der GFP-Untereinheiten mit dem Immunzellen-spezifischen Glykoprotein CD4 (*cluster of differentiation* 4) wurde die Membranlokalisierung vermittelt. Das vollständig GFP

### 3 Methoden

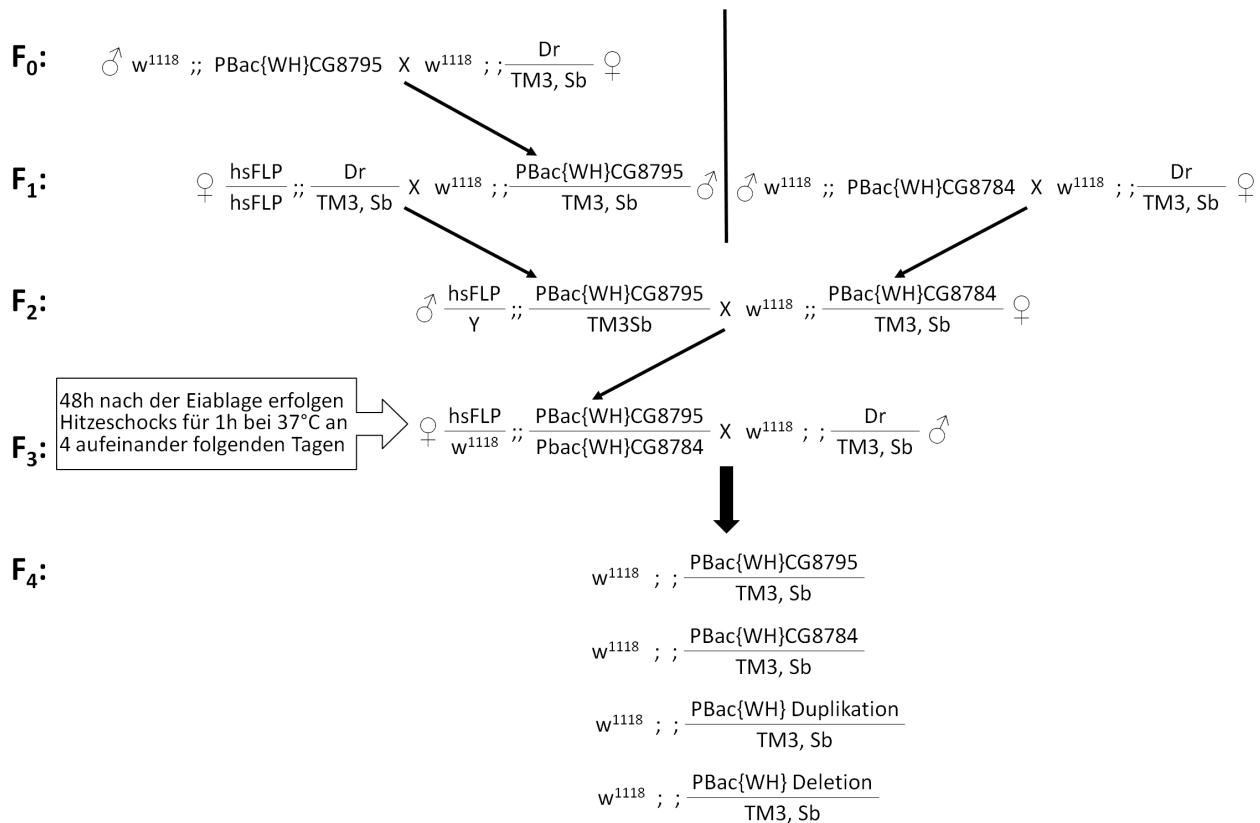
konnte durch seine Fluoreszenz unter dem Konfokalmikroskop detektiert werden. Lagen die Untereinheiten nur getrennt vor, war keine Fluoreszenz erkennbar (Feinberg et al. [2008]; Gordon und Scott [2009]).

Um die Verbindung der beiden neuronalen Subpopulationen untersuchen zu können, mussten zunächst die beiden genspezifischen Promotorkonstrukte Gal4 und LexA, zusammen mit den Effektorstrukturen LexAop-CD4::spGFP11 und UAS-CD4::spGFP1-10, in einer Fliege durch gezielte Kreuzungen kombiniert werden. Die einzelnen Kreuzungsschritte sind in der Abbildung 3.4 dargestellt.

Als Linie A (Promotorkonstrukt auf dem zweiten Chromosom) wurden die Treiberlinien Dilp2-Gal4/CyO oder hug1.2-LexA attP40 L6 verwendet. Als Linie B (Promotorkonstrukt auf dem dritten Chromosom) wurden die Treiberlinien hug1.2-LexA 86Fb L12 oder GR66a-Gal4 verwendet. Die Treiberlinien wurden zunächst mit dem Doppelbalancer CyO/Bl; TM2, e/TM6, Tb gekreuzt (Abbildung 3.4, F<sub>0</sub>). Die zwei Marker auf dem zweiten Chromosom waren *Curly* (Cy: aufgewölbte Flügel) auf dem Balancer CyO und *Bristle* (Bl: kürzere, leicht verdickte und stumpfe Borsten). Das dritte Chromosom wurde durch die Balancer TM2 und TM6 stabilisiert, die mehrere Marker aufwiesen. Tiere mit den Balancern TM2 und TM6 waren in den Kreuzungen an dem rezessiven Marker *ebony* (e: dunkle Körperfärbung) erkennbar. Fliegen mit dem Balancer TM2 wurden über das Allel *Ultrabithorax* (Ubx: vergrößerte Halteren) identifiziert, Tiere mit dem Balancer TM6 über das Allel *Tubby* (Tb: Larven zeigen einen kurzen und dicken Körper, Fliegen ein verkürztes Abdomen).

In der ersten Filialgeneration (Abbildung 3.4, F<sub>1</sub>) wurden Tiere der Linie A mit den Balancern CyO und TM2, e ausgewählt und Tiere der Linie B mit den Balancern CyO und TM6, Tb. Diese wurden jeweils mit der entsprechenden spGFP-Linie Bl/CyO;UAS-CD4::spGFP1-10/UAS-CD4::spGFP1-10 oder LexAop::spGFP11/LexAop::spGFP11; TM2, e/TM6, Tb gekreuzt. In der Folgegeneration (Abbildung 3.4, F<sub>2</sub>) wurden Tiere mit den Balancern CyO und TM2, e oder CyO und TM6, Tb ausgewählt und erneut gekreuzt. Für Untersuchungen an Larven war es notwendig durch eine Linien-interne Kreuzung zunächst die Balancer CyO und TM2, e der F<sub>2</sub>-Generation zu entfernen. In diesem Fall wurden für die weitere Kreuzung Tiere mit dem Genotyp Linie A/Linie A; UAS-CD4::spGFP1-10/UAS-CD4::spGFP1-10 und LexAop-CD4::spGFP11/LexAop-CD4::spGFP11; LinieB/ TM6, Tb verwendet. In der Folgegeneration (Abbildung 3.4, F<sub>3</sub>) wurden Tiere ohne Marker ausgewählt. Aus diesen wurde das Gehirn freipräpariert und *Ex vivo* auf das GRASP-Expressionsmuster unter dem Konfokalmikroskop untersucht. Immunhistochemische Färbungen wurden mit einem  $\alpha$ -GFP Maus-Antikörper durchgeführt, mit dem spezifisch nur das vollständige GFP detektiert werden konnte.

### 3 Methoden



**Abbildung 3.5: Kreuzungsschema zur Erzeugung einer Deletionsmutante**

Dargestellt sind die einzelnen Kreuzungsschritte zur Kombination der pBac-Konstrukte PBac{WH}CG8795 und PBac{WH}CG8784 mit einer Hitzeschock-aktivierbaren FLP-Rekombinase in der dritten Filialgeneration (F<sub>3</sub>). Die Nachkommen der vierten Filialgeneration (F<sub>4</sub>) weisen nach der Hitzeschock-Behandlung entweder die ursprünglichen pBac-Konstrukte oder ein Hybrid (PBac{WH}) der beiden Konstrukte auf. Letzteres entsteht durch eines der Hitzeschock-induzierten Rekombinationsereignisse Duplikation oder Deletion. Eine detaillierte Beschreibung der Methode, der verwendeten Fliegenlinien und der einzelnen Kreuzungsschritte sind dem Text zu entnehmen. Die gezielte Verwendung von Männchen oder Weibchen bestimmter Linien in den einzelnen Kreuzungsschritten ist symbolisch mit (♂) oder (♀) gekennzeichnet.

#### 3.5.9 Erzeugung einer Deletionsmutante durch eine Hitzeschock-induzierte Trans-Rekombination

Zur Erzeugung der Deletion zwischen den beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CG8795 und CG8784 wurden die „piggyBac“-Linien PBac{WH} CG8795 und PBac{WH} CG8784, erzeugt durch Thibault et al. [2004], zusammen mit einer Hitzeschock-aktivierbaren FLP-Rekombinase (hsFLP) in einer Fliege kombiniert. Die PBac-Konstrukte enthielten eine unipolare FLP-Rekombinase-Zielsequenz (FRT) über die eine FLP-induzierte Rekombination zwischen den homologen Chromosomen erfolgen und somit eine Deletion generiert werden konnte (Abbildung 4.18 C). Die PBac-Konstrukte enthielten außerdem den Augenmarker *white* und konnten so in Linien mit *w*-Allel an der roten Augenfarbe erkannt werden. Bei der Deletion entstand ein vollständiges „piggyBac“-Konstrukt als Hybrid der beiden Ausgangskonstrukte. Die

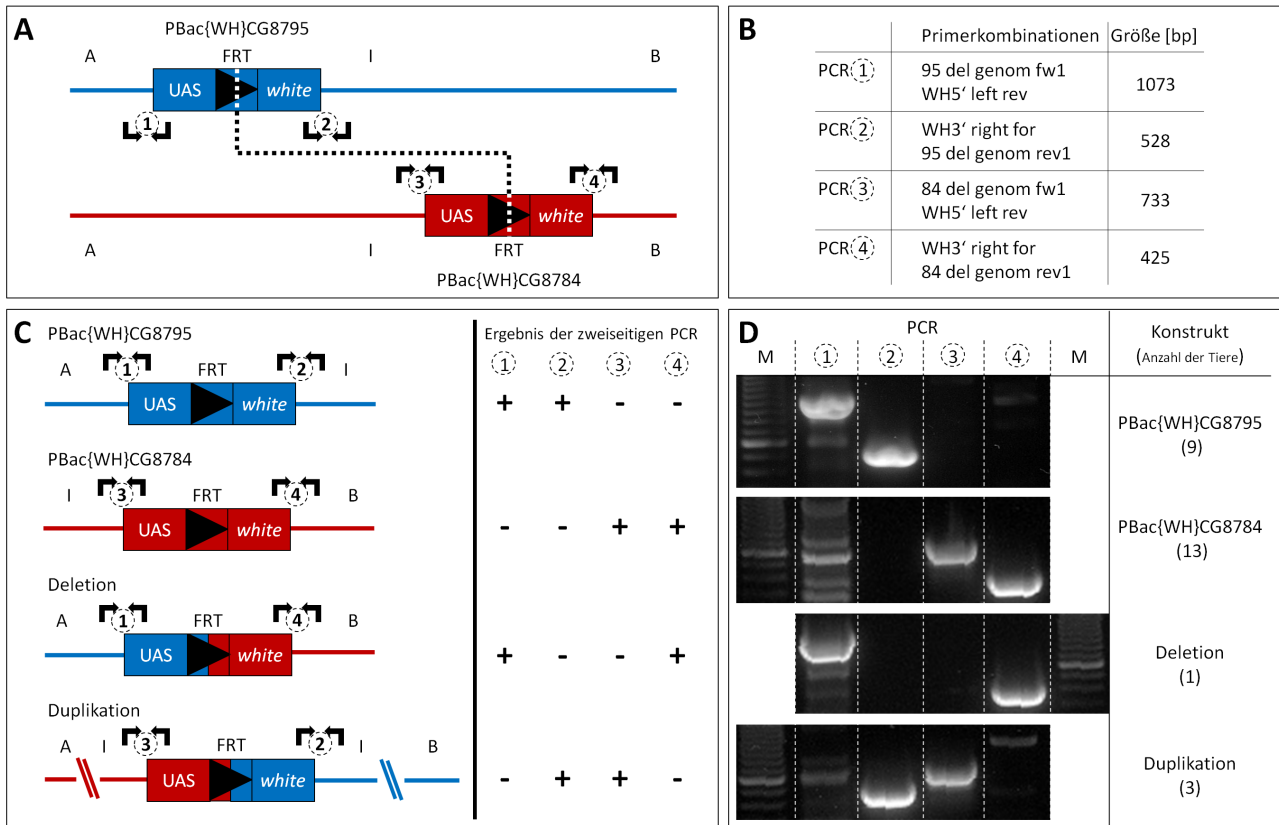
### 3 Methoden

einzelnen Kreuzungsschritte sind in Abbildung 3.5 gezeigt (nach Parks et al. [2004]). Beide „piggyBac“-Konstrukte wurden durch Kreuzen mit einer isogenisierten Balancerlinie  $w^{1118}; Dr, TM3, Sb$  stabilisiert (Abbildung 3.5  $F_0$  bzw.  $F_1$ ). Das Allel *Drop* (*Dr*) war an verkleinerten, tropfenförmigen Augen in Adulten erkennbar und der Marker *Stubble* (*Sb*) auf dem Balancer *TM3*, an verkürzten Thorakalborsten. Männchen des Genotyps  $PBac\{WH\}CG8795/TM3, Sb$  wurden in der Filialgeneration  $F_1$  mit Weibchen der Flipase-Linie  $hsFLP;; Dr/TM3, Sb$  gekreuzt. In der  $F_2$ -Generation wurden 3 Männchen des Genotyps  $hsFLP/Y;; PBac\{WH\}CG8795/TM3, Sb$  mit 10 Weibchen der Linie  $PBac\{WH\}CG8784/TM3, Sb$  gekreuzt. Die Eiablage erfolgte in Anzuchtgefäßen mit Fliegenfutter. Zwei Tage AEL wurden die Adulten weitergesetzt und die Gefäße mit den Eiern wurden im Wasserbad einem Hitzeschock für eine Stunde bei  $37^\circ C$  ausgesetzt. Dieser Hitzeschock wurde in den nächsten drei Tagen jeweils für eine Stunde/Tag wiederholt. Aus dieser  $F_3$ -Generation wurden Jungfrauen gesammelt und mit Männchen der isogenen Balancerlinie  $w^{1118}; Dr, TM3, Sb$  gekreuzt. In der Folgegeneration wurden 51 Männchen mit roten Augen selektiert und durch Kreuzen mit der Balancerlinie  $w^{1118}; Dr, TM3, Sb$  wurden neue Linien etabliert, die auf ein Deletionsereignis untersucht wurden.

#### 3.5.10 Identifizierung einer Deletionsmutante durch PCR

Deletionsmutanten wurden durch einen „Screen“ mittels doppelseitiger PCR-Reaktionen (PCR1-4) identifiziert. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass jeweils ein Ende des Transposons und der angrenzenden genomischen DNS amplifiziert wurden (Abbildung 3.6 A-B). Die Transposonspezifischen Primer (WH5' und WH3') wurden der Publikation Parks et al. [2004] entnommen. Die Primerpaare wurden auf Funktionalität und Spezifität an isolierter genomischer DNS aus WT-Fliegen oder aus Fliegen der PBac-Linien  $PBac\{WH\}CG8795$  und  $PBac\{WH\}CG8784$  getestet. Es wurden 26 Linien auf ein mögliches Deletionsereignis untersucht, indem die genomische DNS isoliert und über die PCR-Reaktionen 1-4 überprüft wurde. Die PCR-Reaktionen 1 und 4 fielen positiv aus, wenn ein Hybridkonstrukt der beiden ursprünglichen „piggyBac“-Konstrukte als Folge eines Hitzeschock-induzierten Rekombinationsereignisses entstanden war. PCR2 und PCR3 fielen bei einer Deletion negativ, bei einer Duplikation positiv aus (Abbildung 3.6 C-D). Es konnten drei Linien mit einer Duplikation der intergenen Region (I) und eine Linie mit einem Deletionsereignis isoliert werden (Abbildung 3.6 D).

### 3 Methoden



#### Abbildung 3.6: Screen der Deletionsmutanten

Untersuchung eines Hitzeschock-induzierten Deletionsereignisses mittels PCR an isolierter genomischer DNS unabhängiger Fliegenlinien. A) Vereinfachte schematische Darstellung der Hitzeschock-induzierten Trans-Rekombination (gestrichelte Linie) vermittelt durch die Bindung der FLP-Rekombinase an den FLP-Rekombinase-Zielsequenzen (FRT) der homologen elterlichen Chromosomen mit den Allelen PBac{WH}CG8795 (blau) und PBac{WH}CG8784 (rot) (geändert nach Parks et al. [2004]). Die PBac-Konstrukte kodieren für eine Gal4-Bindestelle (UAS) und ein *white*-Gen. Die Identifizierung der Deletionsmutanten erfolgt über doppelseitige PCR-Reaktionen (PCR1-4). B) Primerkombination und Länge der erzeugten Fragmente von PCR1-4. C) Schematisch dargestellt sind die unveränderten PBac-Konstrukte PBac{WH}CG8795 und PBac{WH}CG8784 und die durch Rekombination erzeugten PBac-Hybridkonstrukte bei einem Deletions- oder Duplikationsereignis. Die entsprechenden Ergebnisse der PCR-Reaktionen PCR1-4 fallen positiv (+) oder negativ (-) aus. D) Auswertung der PCR-Reaktionen und genotypische Zuordnung der entsprechenden Linie nach Agarosegel-Elektrophorese. Die Zahl der identifizierten Linien für jeden Genotyp sind in der nebenstehenden Tabelle angegeben. Als Marker (M) wurde eine 100bp-Leiter verwendet, die dicke Bande hat eine Größe von 600bp. Die Orientierung der Primer (schwarze Pfeile), der intergene Bereich I und die zwei flankierenden Genbereiche A und B sind zur besseren Übersicht in A) und C) angedeutet.

#### 3.5.11 Selektion von Deletionsmutanten mit letalem Phänotyp

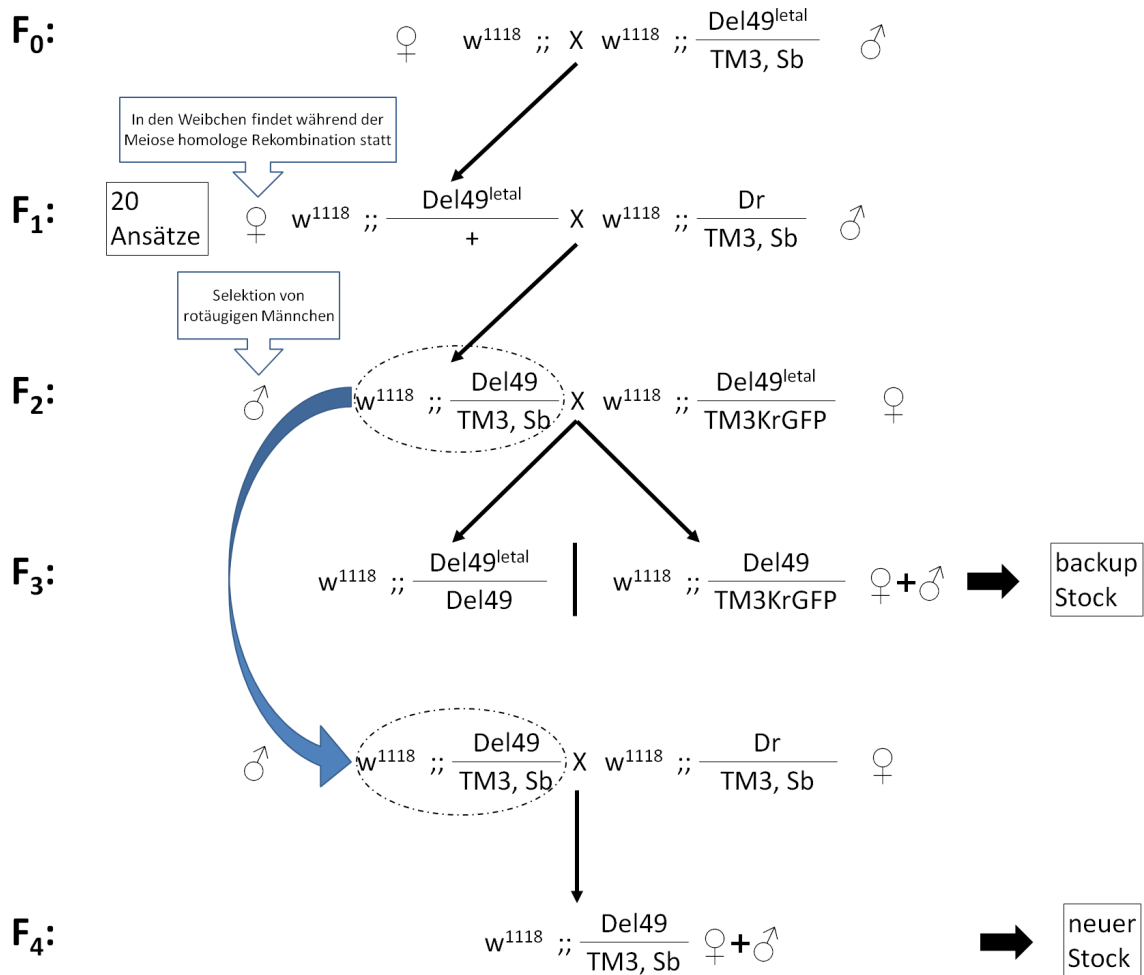
Bei der Deletionsmutante Del49 wurde durch Einkreuzen des Balancers TM3 mit dem Fluoreszenzmarker KrGFP ein letaler Phänotyp in der späten Embryonalphase festgestellt. Die Tiere waren bereits soweit entwickelt, dass Mundhaken- und Körperbewegungen des Embryos zu erkennen waren, ein Schlüpfen aus dem Ei etwa 24 h nach der Eiablage (AEL) blieb jedoch aus. Um homozygote Tiere der Deletionsmutante für eine DNS- oder RNS-Extraktion selektieren zu können, wurden die Tiere unter dem Fluoreszenzbinokular sortiert. Homozygote Tiere mit dem Balancer TM3KrGFP wurden als Kontrollen verwendet. Es wurden Eiablagen über 4 h auf einer Apfagarplatte mit Hefe gesammelt. 24-28 h AEL wurden nicht geschlüpfte Embryonen abgesammelt und zunächst das Chorion, durch Rollen des Embryos über einen Streifen Klebefilm, entfernt. Die Tiere wurden im Anschluss auf eine Apfagarplatte überführt und am Fluoreszenz-Stereomikroskop nach Fluoreszenz sortiert. Gleichzeitig wurde nochmals die Bewegung der Mundhaken überprüft und tote Tiere wurden verworfen. Danach wurden die Tiere mit PBS in einer Petrischale mit Filterpapier gewaschen. Für RNS-Extraktionen wurden jeweils 30 Embryonen (Kapitel 3.2.11), für DNS-Extraktionen jeweils 25 Embryonen verwendet (Kapitel 3.2.1).

#### 3.5.12 Fliegenkreuzungen zum Austausch eines letalen Allels durch Crossover

Durch eine Hitzeschock-induzierte Trans-Rekombination wurde die Deletionsmutante Del49 erzeugt. Diese zeigte einen letalen embryonalen Phänotyp, der jedoch in transheterozygoten Tieren, nach Kreuzungen mit spezifischen Defizienzlinien, nicht beobachtet werden konnte. Als Ursache wurde eine zusätzliche Mutation während der Rekombinationsphase angenommen. Dieses letale Allel wird im Folgenden als Del49<sup>letal</sup> bezeichnet. Durch gezielte Kreuzungen wurden Defizienzlinien erzeugt, in denen das letale Allel durch eine Wildtyp-Allel mittels intrachromosomaler Rekombination (Crossover) während der Meiose ausgetauscht wurde. Die Abbildung 3.7 zeigt schematisch den Ablauf der einzelnen Kreuzungen.

Zum Austausch der letalen Mutation, wurde zunächst eine Rückkreuzung von Männchen des Genotyps  $w^{1118}; Del49^{letal}/TM3, Sb$  mit Weibchen der Wildtyplinie  $w^{1118}$  durchgeführt (Abbildung 3.7, F<sub>0</sub>). Der Marker *Stubble* (Sb) auf dem Balancerchromosom TM3 war an verkürzten Borsten der Fliegen erkennbar. Das Deletionskonstrukt konnte anhand des *white*-Gens (rote Augenfarbe) im  $w$ -Hintergrund verfolgt werden. In den Weibchen der Folgegeneration (Abbildung 3.7, F<sub>1</sub>) war es durch Crossover während der Meiose möglich, dass das letale Allel ausgetauscht wurde. Diese Weibchen wurden mit Männchen der Balancerlinie  $w^{1118}; Dr/TM3, Sb$  zurückgekreuzt, um so das Deletionskonstrukt wieder zu stabilisieren (Abbildung 3.7, F<sub>2</sub>). Männchen der

### 3 Methoden



**Abbildung 3.7: Austausch des Letalfaktors  $Del49^{letal}$**

Dargestellt sind die einzelnen Kreuzungsschritte zum Austausch des Letalfaktors  $Del49^{letal}$  gegen ein Wildtyp-Allel durch Crossover während der Meiose in der F<sub>1</sub>-Generation und der Etablierung neuer vitaler Linien (Stocks) der Deletionsmutante  $Del49$ . Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Fliegenlinien und der einzelnen Kreuzungsschritte sind dem Text zu entnehmen. Die gezielte Verwendung von Männchen oder Weibchen bestimmter Linien in den einzelnen Kreuzungsschritten ist symbolisch mit ( $\sigma$ ) oder ( $\varphi$ ) gekennzeichnet.



### 3 Methoden

Folgegeneration wurden auf den Verlust der letalen Mutation (Del49) untersucht. Sie wurden mit der letalen Deletionslinie  $w^{1118};;Del49^{letal}/TM3KrGFP$  gekreuzt und nach der erfolgreichen Befruchtung der Weibchen bei 18°C aufbewahrt. Sobald sich in der F<sub>3</sub>-Generation Adulte ohne den Fluoreszenzmarker KrGFP entwickelt hatten, konnte daraus geschlossen werden, dass das letale Allel im jeweiligen Männchen der F<sub>2</sub>-Generation ausgetauscht worden war. Diese Männchen (Abbildung 3.7, Kreis) wurden mit der Balancer-Linie zurückgekreuzt (Abbildung 3.7, blauer Pfeil) und aus der Folgegeneration wurde eine stabile Linie etabliert (Abbildung 3.7, F<sub>4</sub>, neuer Stock). Als Sicherheit wurde aus den Männchen und Weibchen der F<sub>3</sub>-Generation zusätzlich eine stabile Linie generiert (*backup* Stock). Nach dem Austausch des letalen Allels wurde aus den Linien Del49<sup>1c-2</sup>, Del49<sup>6c-2</sup>, Del49<sup>11c-2</sup> und Del49<sup>12c-2</sup> die genomische DNS extrahiert und erneut auf die Deletion mittels PCR bestätigt (Kapitel 3.2.2). Die Expression der Hugin-Rezeptoren CG8784 und CG8795 wurde in Embryonen der Linien Del49<sup>6c-2</sup> und Del49<sup>12c-2</sup> 13-17 h AEL durch eine qPCR untersucht (Kapitel 3.2.11).



## 4 Ergebnisse

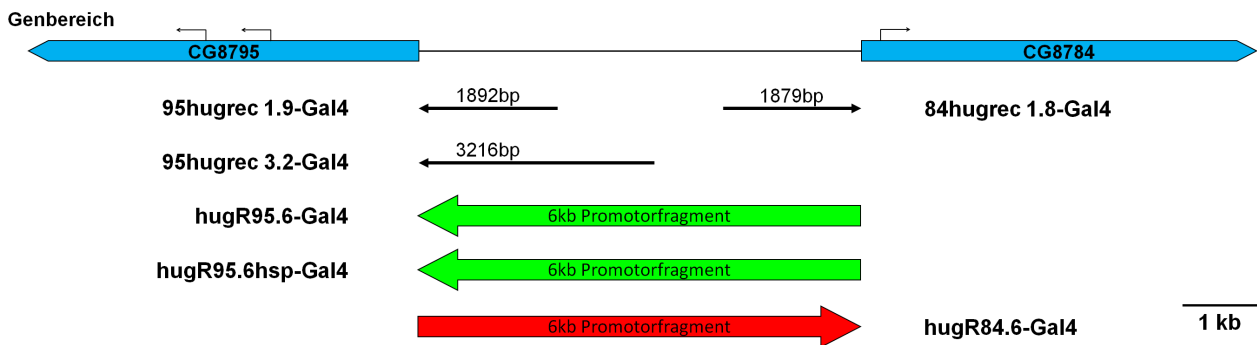
Hugin-Neurone werden einem neuronalen Schaltkreis zugeordnet, der eine wichtige Rolle bei Koordination von Fressverhalten, Metabolismus und Wachstum spielt. Die Expression von *hugin* ist auf 20 Zellen im Suboesophagialganglion (SOG) beschränkt (Meng et al. [2002]; Melcher und Pankratz [2005]). Dieser Bereich wird von gustatorischen Rezeptorneuronen externer und interner chemosensorischer Organe innerviert und fungiert als primäres Zentrum zur Verarbeitung geschmacksabhängiger Informationen (Stocker [2001]; Scott et al. [2001]). Anatomische und verhaltensabhängige Untersuchungen ließen darauf schließen, dass die Hugin-Neurone, als Interneurone zweiter Ordnung, gustatorische Informationen aufnehmen und weiterleiten (Melcher und Pankratz [2005]; Melcher et al. [2007]). Die Zielzellen des Hugin-abhängigen neuronalen Schaltkreises konnten allerdings noch nicht identifiziert werden.

Aufgrund der Morphologie der Hugin-Neurone sind verschiedene Wege einer Hugin-abhängigen Signalvermittlung denkbar. Die Innervation des Protocerebrums, des ventralen Nervensystems oder einer Muskelgruppe der cephalopharyngealen Muskulatur ließ den Schluss zu, dass Hugin in diesen Bereichen lokal auf bestimmte neuronale Subpopulationen oder Muskeln wirkt. Glomeruläre dendritische Strukturen ventrolateral des oesophagialen Foramens deuten außerdem auf eine direkte Funktion der Hugin-Neurone auf den Verdauungsapparat hin. Daneben besteht durch die Verbindung zum larvalen neuroendokrinen Organ die Möglichkeit, dass Hugin über die Aorta in die Hämolymphe freigesetzt wird und damit endokrin wirkt (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a,b]).

Durch *In vitro* Untersuchungen konnten die zwei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) CG8795 und CG8784 als mögliche Hugin-Rezeptoren identifiziert werden (Park et al. [2002]; Rosenkilde et al. [2003]). *Microarray*-Untersuchungen wiesen auf eine erhöhte Expression im Gehirn, im Hautmuskelschlauch und in verschiedenen Bereichen des Verdauungsapparates hin (Chintapalli et al. [2007]) - Bereiche, die Zielregionen der Hugin-Neurone darstellen. Um die Identifikation von Zielzellen des Hugin-abhängigen neuronalen Schaltkreises voranzutreiben, wurde zunächst die Expression der beiden potentiellen Hugin-Rezeptoren in Larven von *Drosophila* untersucht.

## 4.1 Untersuchung des Expressionsmusters der Hugin-Rezeptoren

Erste Untersuchungen des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der beiden Hugin-Rezeptoren CG8795 und CG8784 wurden in der Diplomarbeit durch *In situ* Hybridisierungen durchgeführt. Es hatte sich bei beiden Genen eine Expression in späten Embryonalstadien und in Gehirnen einer sehr frühen Phase des ersten Larvenstadiums gezeigt, die allerdings sehr schwach war. Um das räumliche Expressionsmuster der beiden Rezeptoren detailliert untersuchen zu können, wurde ein binäres UAS-Gal4-System aus Hefe genutzt, das für die Funktionalität in *Drosophila melanogaster* angepasst ist (Brand und Perrimon [1993]). Es wurden zunächst promotorspezifische Gal4-Treiberlinien der beiden Rezeptoren erzeugt. Durch Kreuzungen mit UAS-Effektorlinien konnte eine ektopische Expression von Markergenen in den Hugin-Zielzellen und Geweben induziert werden. Auf diese Weise war die Visualisierung der Expressionsmuster von CG8795 und CG8784 möglich. Diese wurden durch Aufnahmen *In vivo*, *Ex vivo* und immunhistochemisch an fixierten Präparaten nachgewiesen.



**Abbildung 4.1: Der Promotorbereich von CG8795 und CG8784**

Schematische Darstellung der Genbereiche (blau) von CG8795 und CG8784 (geändert nach <http://www.flybase.org>). Aus dem intergenen Bereich der opponierend transkribierten GPCRs wurden mehrere Gal4-Treiberlinien unterschiedlicher Länge erzeugt. Drei kurze Fragmente wurden zur Generierung der transgenen Linien 95hugrec1.9, 95hugrec3.2 und 84hugrec1.8 genutzt (schwarze Pfeile). Aus dem vollständigen intergenen Bereich wurde ein Fragment mit einer Länge von 5988bp amplifiziert (6kb Promotorfragment). Aus diesem wurden die drei Gal4-Treiberlinien hugR95.6-Gal4, hugR95.6hsp-Gal4 und hugR84.6-Gal4 erzeugt, mit Orientierung des Promotorfragments in Richtung CG8795 (grüner Pfeil) bzw. in Richtung CG8784 (roter Pfeil). Startcodon und Richtung der Transkription sind mit einem gewinkelten Pfeil angedeutet.

Aus dem intergenen Bereich der beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) CG8795 und CG8784 wurden bereits in der Diplomarbeit mehrere kurze Fragmente zur Erzeugung der Promotorlinien 95hugrec1.9-Gal4, 95hugrec3.2-Gal4 und 84hugrec1.8-Gal4 genutzt, die jedoch kein Expressionsmuster in der Larve gezeigt hatten (Abbildung 4.1, schwarze Pfeile). Es wurde daher ein Fragment mit einer Länge von etwa 6kb amplifiziert, das an beide Genbereiche angrenzt (Abbildung 4.1, 6kb Promotorfragment). Dieses Fragment sollte die Promotorbereiche für beide Gene enthalten. Durch die Orientierung dieses Promotorfragments wurde eine

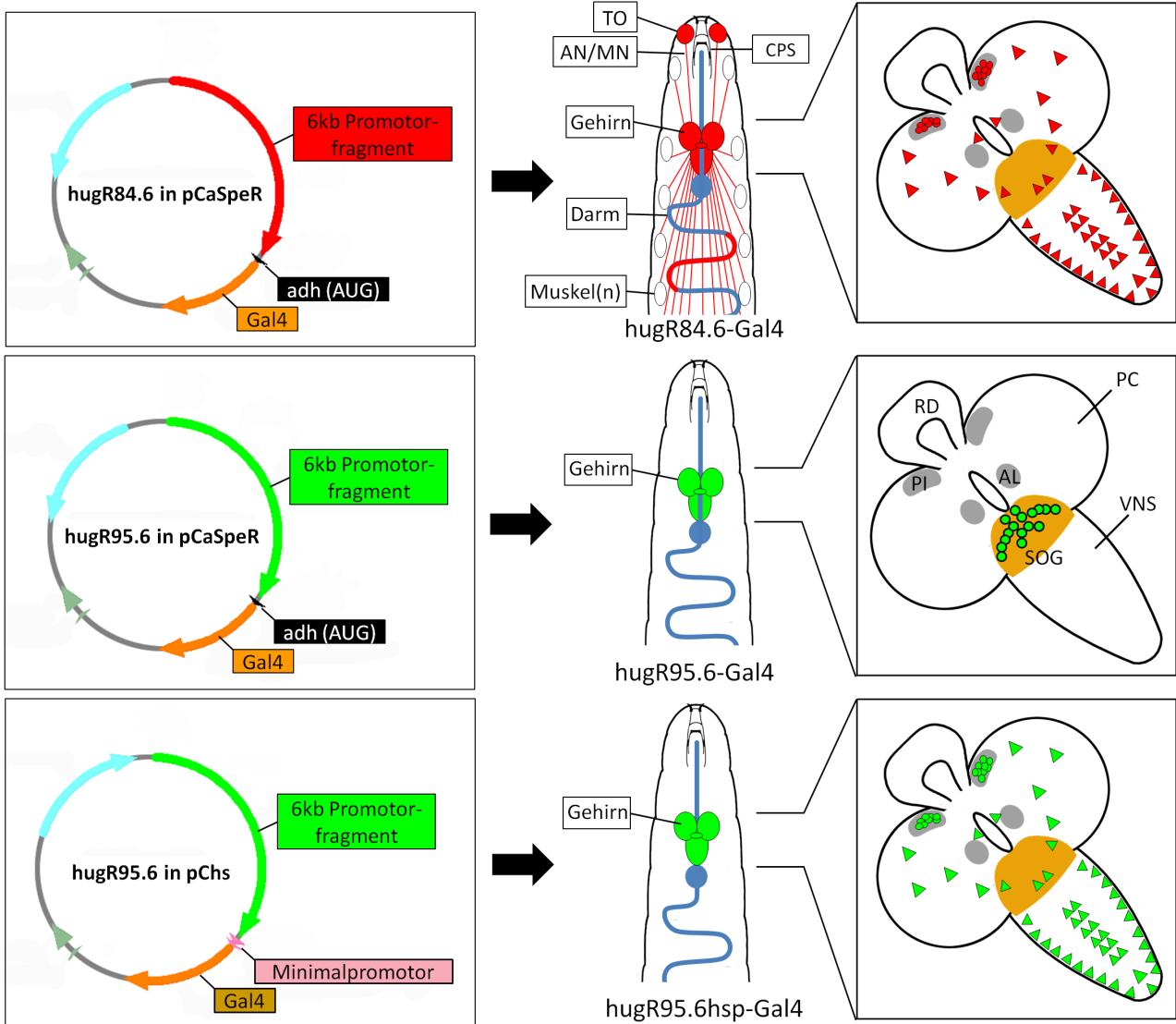
## 4 Ergebnisse

spezifische Gal4-Expression unter der Kontrolle von genregulatorischen Elementen der beiden opponierend transkribierten Rezeptoren ermöglicht.

Zur Erzeugung der Gal4-Treiberlinien wurden zwei verschiedene P-Element-Vektoren genutzt (Abbildung 4.2). In den ersten Vektor pCaSpeR-AUG-Gal4-X (pCaSpeR) (Vosshall et al. [2000]) wurde das 6kb-Promotorfragment sowohl in der Orientierung für CG8795 (hugR95.6-Gal4), als auch für CG8784 (hugR84.6-Gal4) kloniert. Das Gal4-Konstrukt lag in diesem Vektor direkt hinter dem Startcodon (AUG) der Gensequenz einer Alkoholdehydrogenase (*adh*) und war damit direkt unter der Kontrolle genregulatorischer Elemente des Promotorfragments. Das 6kb-Fragment in CG8795-Orientierung wurde zusätzlich in einen zweiten Vektor pChs-Gal4 kloniert (Apitz [2002]). Durch die Verwendung dieses Vektors konnte ein Konstrukt (hugR95.6hsp-Gal4) erzeugt werden, bei dem zwischen dem Promotorfragment und der kodierenden Sequenz für Gal4 zusätzlich der Minimalpromotor eines Hitzeschockproteins (Minimalpromotor) lag. Über eine P-Element vermittelte genomische Integration wurde mit jedem der drei Konstrukte transgene Linien erzeugt. Diese wurden auf das jeweilige Expressionsmuster in Larven von *Drosophila melanogaster* durch Kreuzung mit geeigneten Effektorlinien untersucht. In Abbildung 4.2 ist eine vereinfacht dargestellte Übersicht der Promotorkonstrukte in den Gal4-Endvektoren (links) und eine Zusammenfassung der untersuchten Expressionsmuster in den Larven (Mitte), speziell im Gehirn (rechts) gezeigt.

Mit der Linie hugR95.6-Gal4 war die Markerexpression auf eine Subpopulation von Hugin-Neuronen im Suboesophagialganglion (SOG) des Gehirns beschränkt. HugR95.6hsp-Gal4 wurde daraufhin ebenfalls auf die Markerexpression im Gehirn untersucht. Durch den zusätzlichen Basalpromotor zeigte sich allerdings ein vollständig neues Projektionsmuster. Es konnte zwar auch eine Expression im SOG detektiert werden, allerdings nicht in den zuvor identifizierten Hugin-Neuronen. Zusätzlich waren Zellen im ventralen Nervensystem (VNS) und im Protocebrum (PC) erkennbar. Durch einen Vergleich mit dem Expressionsmuster von hugR84.6-Gal4 zeigte sich im Gehirn eine deutliche Übereinstimmung. Besonders auffällig war die starke Markerexpression in neurosekretorischen Zellen (mNSCs) in einem dorsomedian gelegenen Bereich des PCs, dem *Pars Intercerebralis*. Im Gegensatz zur Linie hugR95.6-Gal4 konnte für hugR84.6-Gal4 zudem eine Expression in der *Drosophila*-Larve apikal in den chemosensorischen Organen (TO), die mit dem Gehirn über pharyngeale Nerven (AN/MN) verbunden sind, im Bereich des Cephalopharyngealen Skeletts (CPS) und in einem Abschnitt des Mitteldarms (Darm) detektiert werden. Ausgehend vom VNS waren Verbindungen zum Hautmuskelschlauch (Muskel(n)) im Kopfbereich bzw. in den einzelnen Körpersegmenten erkennbar. Die Expressionsmuster der einzelnen Promotorlinien wurden detailliert untersucht.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.2: Übersicht der Vektorkonstrukte und des untersuchten Expressionsmusters**

Schematische Darstellung der Vektorkonstrukte hugR84.6 und hugR95.6 im Gal4-Expressionsvektor mit Startcodon einer Alkoholdehydrogenase (*adh*(AUG)) pCaSpeR-AUG-Gal4-X (pCaSpeR) und hugR95.6 im Vektor pChs-Gal4 mit Minimalpromotor eines Hitzeschockproteins. Aus diesen wurden die promotorspezifischen Treiberlinien hugR84.6-Gal4, hugR95.6-Gal4 und hugR95.6hsp-Gal4 erzeugt. Die Expression von hugR84.6-Gal4 und hugR95.6-Gal4 wurde in der Larve (Mitte) und im larvalen Gehirn (rechts) untersucht. Vergleichend wurde für hugR95.6hsp-Gal4 nur das Expressionsmuster im Gehirn betrachtet. Von besonderem Interesse war die Expression in neuropeptidergen Zellen im Suboesophagialganglion (SOG) und im *Pars Intercerebralis* (PI) des Protozerebrums (PC). Identifizierte Zellen sind als Kreis, weitere Zellgruppen als Dreieck dargestellt. AL - Larvaler Antennallobus; AN - Antennalnerv; CPS - Cephalopharyngeales Skelett; MN - Maxillarnerv; RD - Ringdrüse; TO - Terminalorgan; VNS - ventrales Nervensystem.

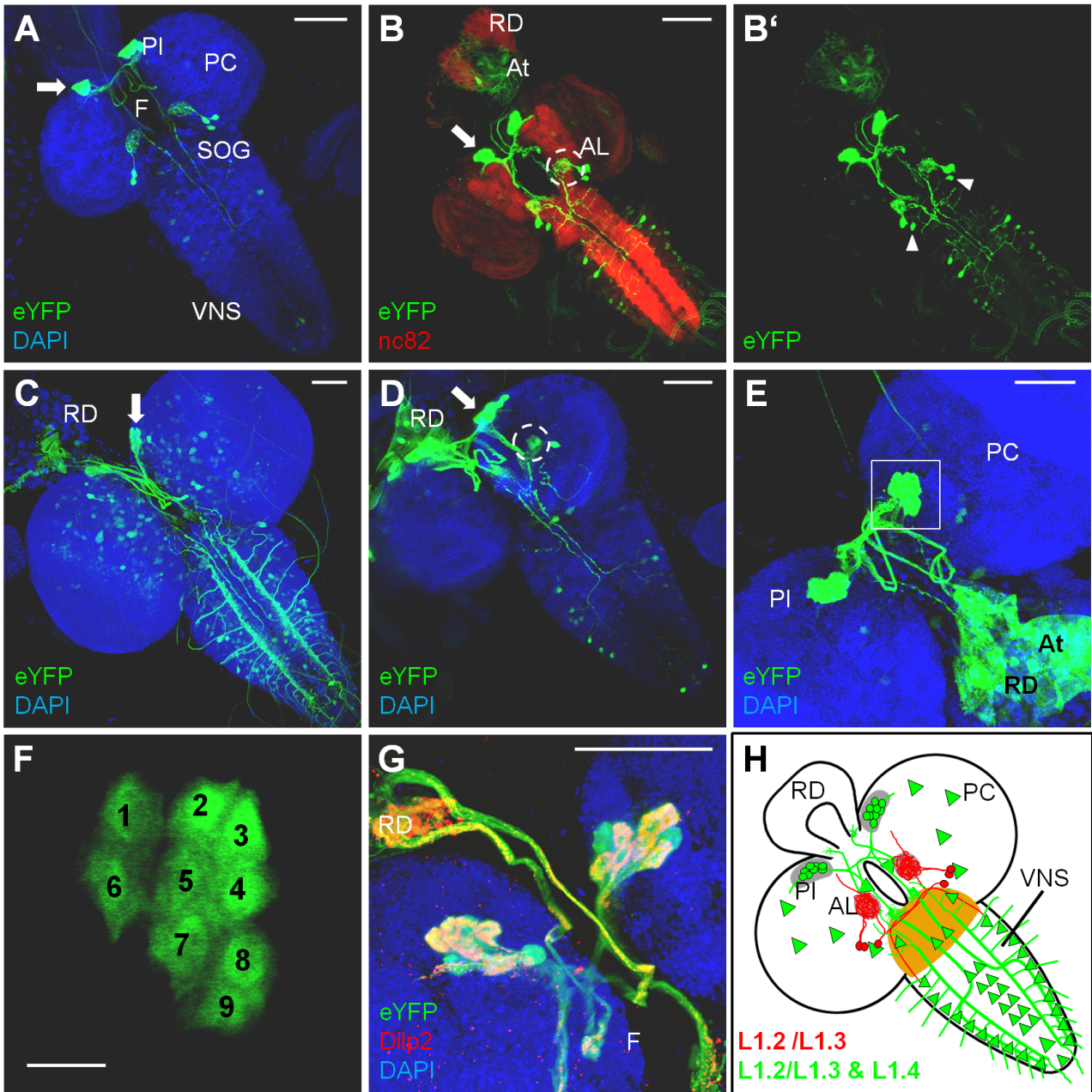
#### 4.1.1 Insulin-produzierende Zellen sind Teil des CG8784-Expressionsmusters

Morphologische Untersuchungen des Expressionsmusters der Hugin-positiven Neurone hatten in Larven und Adulten von *Drosophila melanogaster* ein vergleichbares Muster gezeigt, wurden aber weitestgehend im larvalen System vorangetrieben. Ausgehend von 20 Zellkörpern im SOG konnten mehrere Zielregionen im zentralen Nervensystem (ZNS) identifiziert werden (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a,b]). Da *Microarray*-Analysen ebenfalls eine hohe Expression von CG8784 und CG8795 im larvalen Gehirn vermuten ließen (Chintapalli et al. [2007]), wurden die Untersuchungen der Expressionsmusters der Hugin-Rezeptor-Linien zunächst auf das ZNS von Larven beschränkt.

Das Expressionsmuster von CG8784 wurde an den drei Promotorlinien hugR84.6L1.2-Gal4, hugR84.6L1.3-Gal4 und hugR84.6L1.4-Gal4 untersucht und auf Übereinstimmungen verglichen (Abbildung 4.3 A-D). Auffallend war bei allen drei Linien eine sehr starke Expression in einer Gruppe von neun Zellen (Abbildung 4.3 E-F) dorsal im Bereich des *Pars Intercerebralis* (PI) jeweils in der linken und rechten Hemisphäre des PCs (Abbildung 4.3 A-D, weißer Pfeil). Projektionen dieser Zellen endeten zum einen ipsilateral in der jeweiligen Hemisphäre (Abbildung 4.3 B-B') und zum anderen in der Ringdrüse (RD) (Abbildung 4.3 B-E, G). An Teilen der Aorta, die durch die Ringdrüse führt, war ebenfalls eine starke Immunfluoreszenz erkennbar (Abbildung 4.3 E). Weitere Projektionen führten entlang des Foramens in Richtung SOG und endeten in starken Verzweigungen ventrolateral des Foramens im larvalen Tritocerebrum (Abbildung 4.3 A-D). Aufgrund der Lage der Zellkörper und dem typischen Projektionsmuster, wurden diese Zellen den medianen neurosekretorische Zellen (mNSCs) zugeordnet. Durch eine immunhistochemische Doppelfärbung der Gehirne mit Antikörpern gegen GFP und Dilp2, einem Insulin-Homolog in *Drosophila*, konnte eine Kolo-kalisation in sieben Zellen der mNSCs gezeigt werden, die damit als Insulin-produzierende Zellen (IPCs) identifiziert werden konnten (Abbildung 4.3 G).

Mit den dritt-chromosomalen Promotorlinien L1.2 und L1.3 war im PC eine starke Expression in drei Zellen lateral des SOGs erkennbar. Zwei dieser Zellen hatten Projektionen, die in stark verzweigten, globulären Strukturen lateral des Foramens endeten (Abbildung 4.3 A-B', D). Durch die Hintergrundfärbung des Neuropils mit dem Synapsenmarker nc82 (Bader et al. [2007a]; Wagh et al. [2006]), konnte diese Region als larvaler Antennallobus identifiziert werden (Abbildung 4.3 B, Kreis). In diesem Bereich des Gehirns werden Informationen der olfaktorischen Organe prozessiert und in die höheren Hirnzentren weitergeleitet (Gerber und Stocker [2007]; Vosshall und Stocker [2007]). Da eine Expression in diesen Zellen nur in den dritt-chromosomalen Linien zu beobachten war, wurde dies auf einen Positionseffekt der

## 4 Ergebnisse



### Abbildung 4.3: Das Expressionsmuster von CG8784 im larvalen Gehirn

Vergleich des Expressionsmusters der drei CG8784-Promotorlinien hugR84.6-Gal4 L1.2 (A-B'), L1.3 (D-G) und L1.4 (C) nach Kreuzung mit UAS-eYFP (grün). A-G) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Larvengehirnen. A-D) Übereinstimmungen der drei Linien sind im Projektionsmuster der Zellen des *Pars Intercerebralis* (PI), in Neuriten, die vom Suboesophagialganglion (SOG) in das ventrale Nervensystem (VNS) führen, und in Neuronen im VNS erkennbar. (A-B', D) In den dritt-chromosomalen Linien L1.2 und L1.3 erkennt man zwei Zellen im Protocerebrum (PC) mit stark verzweigten globulären Projektionen im larvalen Antennallobus (AL) (weißer Kreis). Eine dritte Zelle (B' Pfeilkopf) projiziert ipsilateral ins Protocerebrum (PC) und contralateral ins VNS. C) Die X-Chromosomale Linie L1.4 zeigt im VNS Neuritenbündel rechts und links von der Mittellinie, von denen ausgehend Projektionen in die Peripherie führen. Weitere Zellgruppen sind im PC und im VNS erkennbar. E) Dorsalaufnahme der Zellen im PI-Bereich. Teile der Aorta (At) zeigen ebenfalls eine starke Immunfluoreszenz. F) Die Vergrößerung aus E (weißes Rechteck) zeigt 9 Zellkörper, von denen 7 Dilp2 positiv (G) sind. H) Schemazeichnung des Gehirns mit Zusammenfassung der Expressionsmuster. Überschneidungen der X-Chromosomalen Linie (blau) und der dritt-chromosomalen Linien (rot) sind grün dargestellt. Identifizierte Zellen sind als Kreis, weitere Zellgruppen als Dreieck dargestellt. AL und PI sind grau, das SOG orange markiert. Als Primärantikörper wurden gp  $\alpha$ -Dilp2, m  $\alpha$ -GFP (A, C-G), rb  $\alpha$ -GFP (B, B') und m  $\alpha$ -nc82 verwendet. DAPI (blau) dient als Hintergrundmarker. Der Maßstabsbalken entspricht in A-E und G 50  $\mu$ m, in F 10 $\mu$ m.



## 4 Ergebnisse

Integrationsstelle im Genom auf das Promotorkonstrukt zurückgeführt. Eine Verbindung der Hugin-Zellen mit dem olfaktorischen System wurde daher ausgeschlossen.

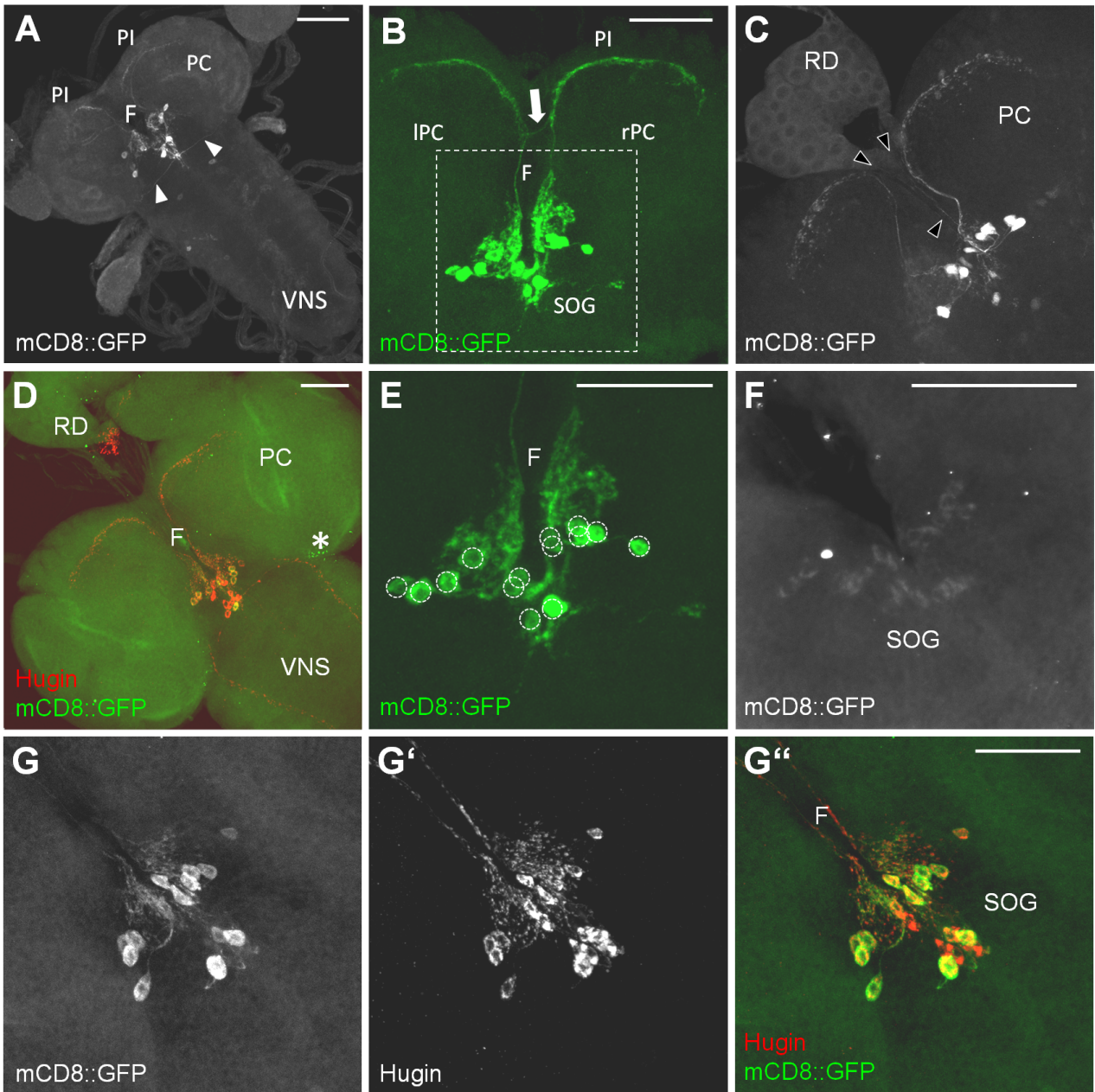
Bei allen Linien führten Projektionen rechts und links entlang der midsagittalen Achse vom SOG in das VNS, wo sie sich im Bereich des ersten Abdominalsegments lateralwärts in die Peripherie und dort apikalwärts fortsetzten (Abbildung 4.3 B-D). Im VNS waren zudem bei allen drei Linien in jedem Segment Gruppen von Neuronen erkennbar, die durch Kommissuren und Konnektive miteinander in Verbindung standen (Abbildung 4.3 A-D). Ausgehend vom VNS führten Projektionsbahnen in die Peripherie (Abbildung 4.3 C). Da das Gehirn bei der Präparation vollständig vom Rest des Tieres getrennt wurde, konnten die Zielbereiche dieser Projektionsbahnen zunächst nicht weiter verfolgt werden. *In vivo* Untersuchungen ließen allerdings Verbindungen zur Muskulatur des Hautmuskelschlauchs erkennen (siehe Kapitel 4.1.5). Mit der X-chromosomalen Linie L1.4 konnte man in den Hirnhemisphären, im SOG und im VNS weitere neuronale Zellgruppen erkennen, die mit der Linie L1.3 erst durch Erzeugung der homozygoten Linie UAS-eYFP;hugR84.6L1.3-Gal4 (Abbildung 4.6 C und Abbildung 4.16 I-K') detektierbar waren. Es war daher davon auszugehen, dass aufgrund des Insertionsortes auf dem X-Chromosom eine stärkere Expression von Gal4 und damit von Markergenen ermöglicht wurde. Wie in der Schemazeichnung (Abbildung 4.3 H (grün)) dargestellt, konnte damit aus der Überschneidung des Expressionsmusters der X- und dritt-chromosomalen Linien ein spezifisches Expressionsmuster für CG8784 im Gehirn abgeleitet werden. Dieses wurde mit dem Expressionsmuster des zweiten Hugin-Rezeptors CG8795 verglichen.

### 4.1.2 CG8795 wird in einer Subpopulation der Hugin-Neurone exprimiert

Das Expressionsmuster der CG8795-spezifischen Promotorlinien hugR95.6-Gal4 hatte sich bei ersten Untersuchungen als sehr schwach herausgestellt. Aus diesem Grund wurde die stabile Markerlinie UAS-Gal4;UAS-mCD8::GFP erzeugt, um auf diese Weise die Effizienz des UAS-Gal4-Systems und damit die mCD8::GFP-Expression zu erhöhen. Das Expressionsmuster von hugR95.6-Gal4 wurde durch eine Kreuzung mit dieser Linie, mittels des membranständigen, grün fluoreszierenden Markerproteins (mCD8::GFP), visualisiert.

Alle Linien zeigten in Larvengehirnen eine Expression in 16 Zellkörpern im SOG. Als stärkste Linie hatte sich hugR95.6 L16.5-Gal4 herausgestellt. Von den Zellkörpern ausgehend, führten Projektionen entlang des Foramens nach dorsal in die Hemisphären des Protocerebrums, wo sie sich vorbei am PI, nach rechts bzw. links erstreckten und in feinen Verästelungen in den Hemisphären endeten (Abbildung 4.4 A-C). Eine Verbindung zwischen den parallel verlaufenden Projektionsbahnen war oberhalb des Foramens zu erkennen (Abbildung 4.4 B, Pfeil). Dies

## 4 Ergebnisse

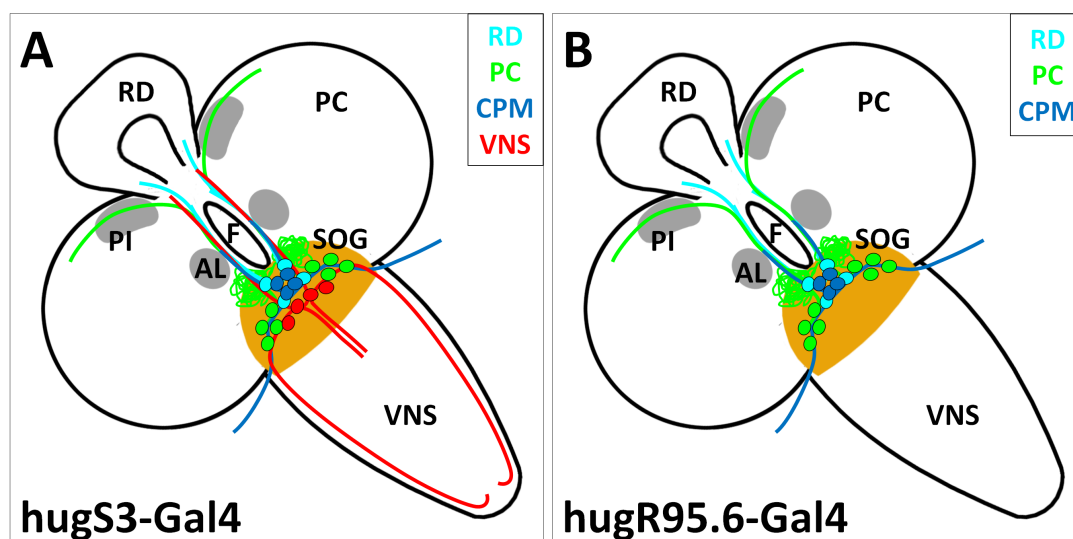


### Abbildung 4.4: Das Expressionsmuster von CG8795 im larvalen Gehirn

Konfokalmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen an Larvengehirnen der Kreuzungen hugR95.6 L16.5-Gal4 (A-E, G-G'') und hugR95.6 L18.3-Gal4 (F) mit UAS-Gal4;UAS-mCD8::GFP. A) Die Expression von mCD8::GFP ist auf Zellkörper im Subesophagealganglion (SOG) unterhalb des Foramens (F) beschränkt. Projektionen aus dem SOG verlaufen dorsalswärts, in das Protocerebrum (PC) oder an der Grenze des SOGs zum ventralen Nervensystem (VNS) aus dem Gehirn (Pfeilköpfe). B) Großaufnahme der Projektionsbahnen in die linke bzw. rechte Hemisphäre des Protocerebrums (IPC/rPC) mit Verzweigungen oberhalb des Foramens (Pfeil). C) Weitere Neuriten (Pfeilköpfe) projizieren in den basalen Bereich der Ringdrüse (RD). D) Eine Doppelfärbung gegen Hugin (rot) und GFP (grün) zeigt eine Kolokalisation in Projektionen in die RD, in das PC und in Projektionen ventral des SOGs, die lateral aus dem Gehirn führen und bei der Präparation abgetrennt wurden (Stern). Hugin-positive Projektionen ins VNS zeigen keine mCD8::GFP-Expression. E) Die Großaufnahme des in B) markierten Bereichs zeigt stark verzweigte Neuriten ventrolateral des Foramens. F) Die Linie hugR95.6 L18.3 zeigt ebenfalls 16 Zellkörper im SOG. G-G'') Eine Kolokalisation von mCD8::GFP ist auf 16 von 20 Hugin-positiven Zellen im SOG beschränkt. Als Primärantikörper wurden m  $\alpha$ -GFP (A-C, E-G, G'') und rb  $\alpha$ -Hug (D, G'-G'') verwendet. PI - *Pars Intercerebralis*. Der Maßstab beträgt 50  $\mu$ m.

ließ vermuten, dass die Projektionen nicht nur ipsi-, sondern auch contralateral in das PC verliefen. Weitere Projektionen zeigten eine Verbindung mit dem basalen Bereich der RD (Abbildung 4.4 C (Pfeilköpfe), D). Ventral des SOGs führten Projektionen entlang der Grenze zum VNS lateralwärts aus dem Gehirn. Diese Projektionen waren aufgrund der Präparationstechnik durchtrennt (Abbildung 4.4 A, Pfeil). Ventrolateral vom Foramen (F) konnte man im Randbereich des SOGs eine globuläre Struktur aus stark verzweigte Neuriten erkennen (Abbildung 4.4 B, E).

Durch eine Antikörperfärbung des promotorspezifisch exprimierten GFPs und des endogenen Hugin konnten durch Nachweis der Kolo-kalisation alle 16 mCD8::GFP-exprimierenden Zellen im SOG als Hugin-positive Neurone identifiziert werden (Abbildung 4.4 D, G-G"). Diese



**Abbildung 4.5: Vergleich der Expressionsmuster von Hugin und CG8795**

Schematische Darstellung des Expressionsmusters der Hugin-spezifischen Treiberlinie *hugS3-Gal4* (A) im Vergleich mit der *CG8795*-spezifischen Treiberlinie *hugR95.6-Gal4* (B) (geändert nach Bader et al. [2007a]). Bei den 20 Hugin-Zellen im SOG werden vier Subpopulation unterschieden mit Projektionen zur Ringdrüse (RD), ins Protocerebrum (PC), ins ventrale Nervensystem (VNS) und zur Cephalopharyngealen Muskulatur (CPM). Die Linie *hugR95.6-Gal4* weist nur in 16 Zellen eine Markerexpression auf. Projektionen führen ins PC, zur CPM und zur RD.

Hugin-Zellen werden aufgrund ihrer Projektionsziele in vier Subpopulationen unterschieden, die zur RD, ins PC, zur CPM und ins VNS projizieren (Schemazeichnung 4.5 A). Durch Vergleich mit dem bekannten Expressionsmuster der Hugin-Neurone war aufgrund der Kolo-kalisation ersichtlich, dass die Projektionsbahnen, die lateral aus dem Gehirn führen, die CPM innervieren (Bader et al. [2007a]; Melcher und Pankratz [2005]). In vier medianen Hugin-Neuronen, die Projektionen in das VNS aussenden, war dagegen keine Markerexpression erkennbar (Schemazeichnung 4.5 B).

### 4.1.3 Ein Hitzeschock-Minimalpromotor verändert das Expressionsmuster von CG8795

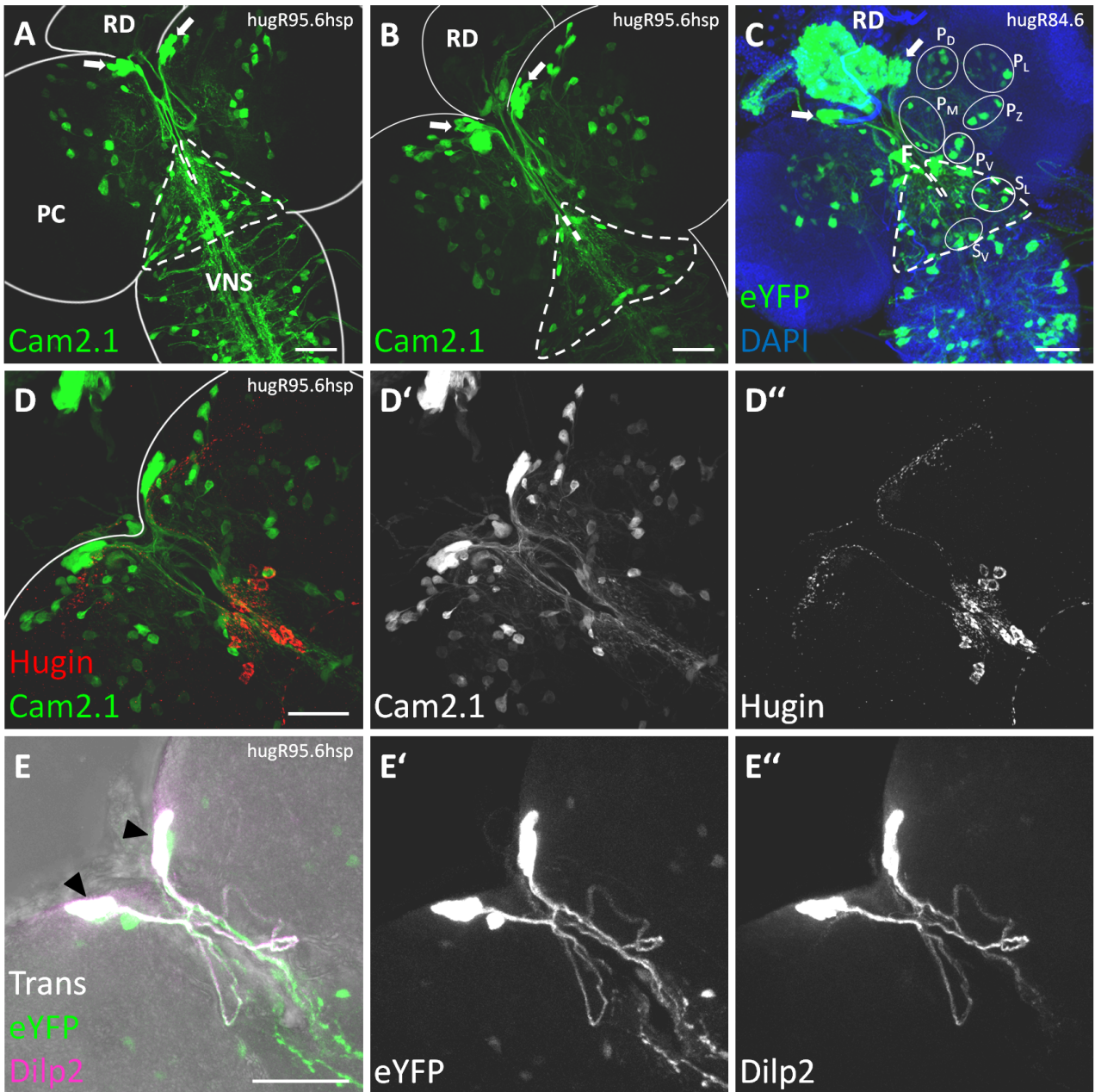
Das 6kb-Promotorfragment in CG8795-Orientierung wurde zusätzliche in einen zweiten Vektor (pChs-Gal4) mit dem Minimalpromotor eines Hitzeschockproteins kloniert. Mit diesem Konstrukt wurden die Treiberlinien hugR95.6hsp-Gal4 erzeugt. Das Expressionsmuster dieser Linien wurde durch Kreuzung mit den Markerlinien UAS-Cam2.1 oder UAS-eYFP ebenfalls im larvalen ZNS untersucht und auf Übereinstimmungen mit dem Expressionsmuster der Linien hugR95.6-Gal4 und hugR84.6-Gal4 verglichen.

Durch eine Doppelfärbung des ektopisch exprimierten Fluoreszenzmarkers Cam2.1 bzw. eYFP und Hugin wurde in der Linie hugR95.6hsp L3-Gal4 zunächst das Expressionsmuster im SOG überprüft. Es konnte allerdings keine Kolo-kalisation in den Hugin-Zellen festgestellt werden (Abbildung 4.6 D-D"). Dagegen zeigte sich eine Färbung in Neuronen des SOGs lateral der Hugin-positiven Zellen. Weitere Zellen waren im VNS und im PC erkennbar. Dieses Projektionsmuster wurde mit zwei weiteren unabhängigen Linien verglichen (Abbildung 4.6 A-B). Die Zellen im PC und im SOG wurden aufgrund ihrer relativen Lage zu Gruppen zusammengefasst, wie es am Beispiel der Linie UAS-eYFP;hugR84.6L1.3-Gal4 gezeigt ist (Abbildung 4.6 C). In den Hemisphären des PC sind Zellen zum einen dorsal ( $P_D$ ), medial am Foramen ( $P_M$ ), zentral ( $P_Z$ ) und lateral ( $P_L$ ) auch auch ventral ( $P_V$ ), also nahe des SOGs, zu finden. Im SOG wurden Zellen lateral ( $S_L$ ) und ventral ( $S_V$ ) identifiziert. In allen Linien war eine Übereinstimmung des Expressionsmusters im PC und SOG erkennbar (Abbildung 4.7, A). Die Zellzahl innerhalb der Gruppen und das Projektionsmuster der einzelnen Zellen wurde nicht genauer untersucht. Durch einen Vergleich mit dem Expressionsmuster der Linie UAS-eYFP;hugR84.6L1.3-Gal4 (Abbildung 4.6 C) zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung in der relativen Lage der Zellkörper im SOG und PC, speziell in einem Zellcluster des PI, den mNSCs. Durch eine Doppelfärbung des endogenen Dilp2 und eYFP, das unter der Kontrolle von hugR95.6hsp-Gal4 exprimiert wurde, konnten ebenfalls sieben der neun Zellen des Clusters als IPCs identifiziert werden (Abbildung 4.6 E-E", schwarze Pfeile).

Abhängig vom verwendeten Vektor zeigte sich für das 6kb-Promotorkonstrukt in CG8795-Orientierung zwei verschiedene Expressionsmuster im larvalen ZNS. Für das Expressionsmuster von hugR95.6-Gal4 wurde eine Übereinstimmung mit dem Hugin-Expressionsmuster in 16 Zellen des SOG deutlich. Das Konstrukt hugR95.6hsp-Gal4 zeigte dagegen eine Übereinstimmung mit dem Expressionsmuster von hugR84.6-Gal4, bei dem das 6kb-Promotorfragment in CG8784-Orientierung inkloniert wurde. Die drei Expressionsmuster sind zur Übersicht in Abbildung 4.7 schematisch zusammengefasst.

Mittels der 6kb-Promotorlinien wurde im weiteren Verlauf das larvale Expressionsmuster der

## 4 Ergebnisse

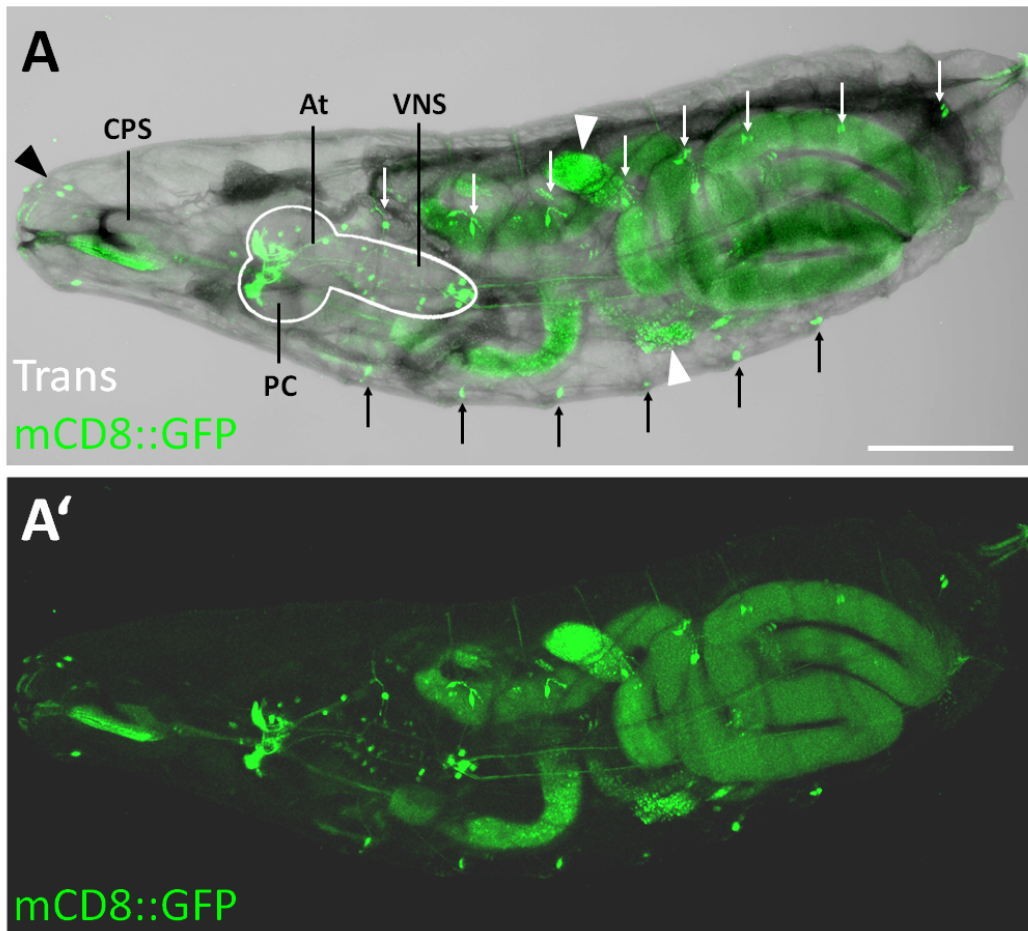


### Abbildung 4.6: Das Expressionsmuster von hugR95.6hsp-Gal4 im larvalen Gehirn

Konfokalmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen an Larvengehirnen. A-C) Die unabhängigen hugR95.6hsp-Gal4 Linien L4 (A) und L1 (B) zeigen durch Kreuzung mit UAS-Cam2.1 ein vergleichbares Expressionsmuster mit der Linie UAS-eYFP; hugR84.6L1.3-Gal4 (C). Erkennbar ist das Zellcluster aus neun Zellen im *Pars Intercerebralis* (Pfeile). Weitere Zellen im Protocerebrum liegen dorsal, angrenzend an das PI (P<sub>D</sub>), medial, (P<sub>M</sub>), zentral (P<sub>Z</sub>), lateral (P<sub>L</sub>) und ventral (P<sub>V</sub>). Im SOG werden die Neurone in je eine Gruppe lateral (S<sub>L</sub>), angrenzend an das PC, und ventral (S<sub>V</sub>), angrenzend an das VNS, eingeteilt. D-D'') Kreuzung von hugR95.6hsp L3-Gal4 mit UAS-Cam2.1. Ein Kolokalisation von Cam2.1 mit Hugin (Hug) ist nicht erkennbar. E-E'') Kreuzung von hugR95.6hsp L3-Gal4 mit UAS-eYFP. Im Zellcluster ist eine Kolokalisation von eYFP (grün) mit Dilp2 (magenta) in den sieben Insulin-produzierenden Zellen erkennbar (schwarze Pfeile). Die Gehirne sind entweder durch Umrisszeichnungen (A, B, D) durch eine DAPI-Färbung (C) oder mittels Durchlichtaufnahme (E, Trans) kenntlich gemacht. Als Primäntikörper wurden in  $\alpha$ -GFP (A-D', E-E'), rb  $\alpha$ -hugin (D, D'') oder gp  $\alpha$ -Dilp2 (D, E'') verwendet. Der Maßstab entspricht 50  $\mu$ m.



## 4 Ergebnisse



### Abbildung 4.8: Das vollständige Expressionsmuster von CG8784 in Larven

Konfokalmikroskopische *In vivo*-Aufnahme einer L1-Larve nach Kreuzung der Linien hugR84.6L1.3-Gal4 und UAS-mCD8::GFP. A-A') GFP-Fluoreszenz (grün) ist im Pseudocephalon (Pfeilkopf, schwarz), im Bereich des Cephalopharyngealen Skeletts (CPS), im Gehirn (weiß markiert), in der Aorta (At), in den Abdominalsegmenten entlang des Hautmuskelschlauchs (Pfeile, schwarz und weiß) und in einem Abschnitt des Mitteldarms (Pfeilkopf, weiß) erkennbar. CPS und Darm zeigen eine schwache Autofluoreszenz. PC - Protocerebrum; Trans - Durchlichtkanal; VNS - ventrales Nervensystem. Der Maßstabsbalken entspricht 200 $\mu$ m.

## 4 Ergebnisse

Strukturen erkennen, die auf der rechten und linken Körperhälfte paarig angeordnet waren (Abbildung 4.8 A, weiße bzw. schwarze Pfeile).

Die GFP-positiven Expressionsorte im ZNS und in der Peripherie erwiesen sich als sehr interessant, da in fast allen beschriebenen Bereichen ein direkter Kontakt mit den Hugin-Neuronen vermutet wurde. Im Pseudocephalon befinden sich gustatorische Organe, deren Rezeptorneurone das SOG innervieren und in direkter Nähe dendritischer Strukturen der Hugin-Neurone enden. Umgekehrt führen Hugin-Projektionen, wie bereits zuvor beschrieben, cranialwärts und enden im Bereich des CPS, wo sie die cephalopharyngeale Muskulatur (CPM) innervieren. Weitere Projektionen der Hugin-Neurone adressieren die RD (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007b,a]; Python und Stocker [2002]). Die At führt durch die RD und stellt damit ein Verbindung zwischen Gehirn und Hämolymphe her, über die Neuropeptide in den Organismus transportiert werden können (King et al. [1966]; Siegmund und Korge [2001]; Shiga [2003]). Über den Oesophagus, der durch ein Foramen durch das Gehirn zieht, könnte ein Kontakt mit dem Darmsystem hergestellt werden.

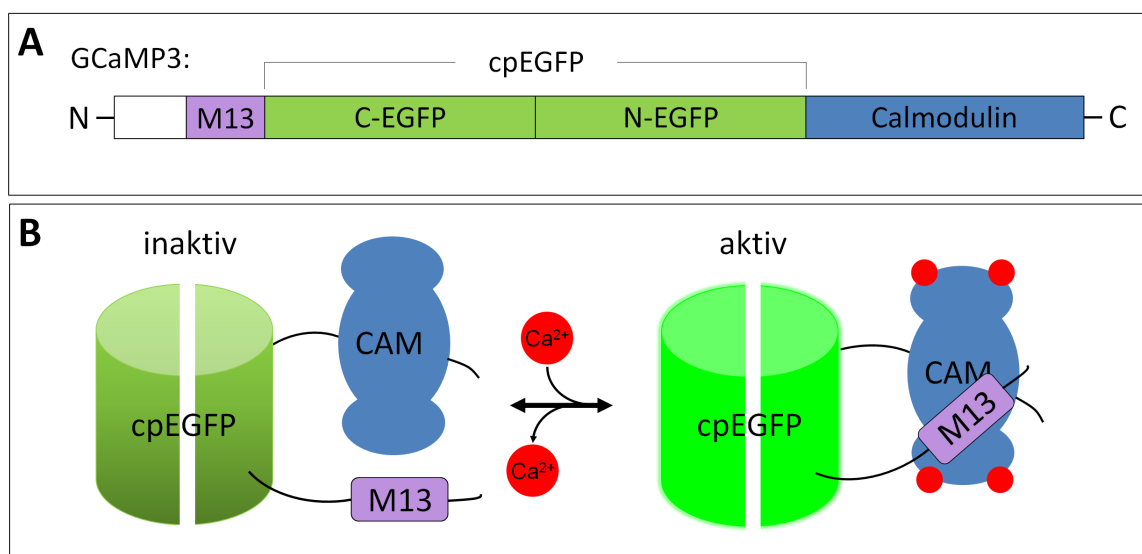
Bisher kaum untersucht waren die Projektionen in das VNS und mögliche Zielbereiche bzw. Zielzellen in diesem Teil des ZNS waren bisher unbekannt (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a]; Melcher et al. [2007]). Da für Hugin ein myostimulatorische Funktion gezeigt werden konnte (Meng et al. [2002]), wäre eine Verbindung mit motorischen Neuronen im VNS möglich, die mit der Muskulatur des Hautmuskelschlauchs in Kontakt stehen (Kim et al. [2009]). Diese mögliche Verbindung über den Rezeptor CG8784 wurde nun näher untersucht.

### 4.1.5 Die Körperwandmuskulatur wird von CG8784-Neuronen innerviert

Die Untersuchungen des promotorspezifischen Expressionsmusters von CG8784 hatten im VNS der *Drosophila*-Larven in den Thorakal- und Abdominalsegmenten Gruppen von Neuronen medial und lateral gezeigt. Ausgehend vom VNS waren neuronale Projektionen in die Peripherie erkennbar (Abbildung 4.3). Durch *In vivo*-Aufnahmen der homozygoten Linie UAS-eYFP;hugR84.6-Gal4 konnten in L1- (Abbildung 4.10 A, B) und L3-Larven (Abbildung 4.10 C), ausgehend vom VNS, eYFP-positive Projektionen bis zum Hautmuskelschlauch verfolgt werden. Im Kopfbereich konnten ventrolateral des CPS Muskelinnervationen mit multipolaren Kontaktbereichen identifiziert werden (Abbildung 4.10 A-C, weißer Kreis). Weiterhin konnte man lateral in jedem Abdominalsegment Projektionen erkennen, die zur Körperwandmuskulatur führten (Abbildung 4.10 C, weiße Pfeilköpfe).

Um eine mögliche Verbindung und Funktion von CG8784 auf die Muskulatur zu untersuchen, wurden Adulte der Linie hugR84.6 L1.4-Gal4 mit der Effektorlinie UAS-GCamp3 gekreuzt.





#### Abbildung 4.9: Der genetisch kodierte Ca<sup>2+</sup> Indikator GCaMP3

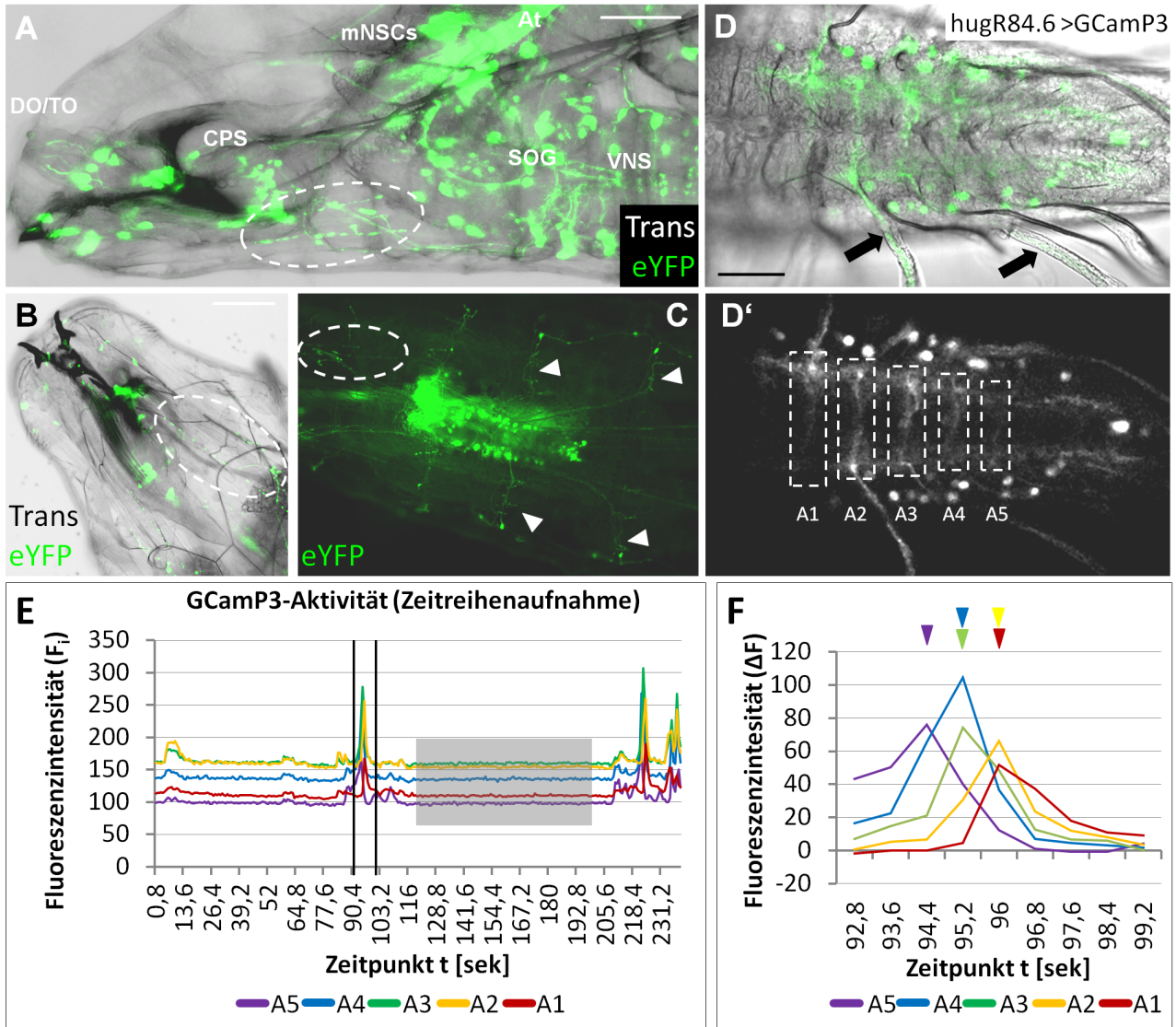
Schemazeichnungen des GCaMP3-Konstrukts und des GCaMP3-Moleküls (geändert nach Tian et al. [2009]; Nakai et al. [2001]). A) Das GCaMP3-Konstrukt enthält die kodierende Sequenz für das Calmodulin-bindende Peptid der leichten Kette einer Myosinkinase (M13), für den C- und N-Terminus eines zirkulär-permutierten EGFPs (cpEGFP) und für Calmodulin (CaM). B) Bei einer Aktivierung des Neurons kommt es zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle. Ca<sup>2+</sup> bindet an CaM, es kommt zu einer Konformationsänderung von cpEGFP und die Fluoreszenzintensität wird erhöht. Nimmt die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den Neuronen ab, geht das GCaMP3-Molekül wieder in seinen Grundzustand über.

GCaMP3 ist ein genetisch kodierter Ca<sup>2+</sup> Indikator (GECI). Er ändert aufgrund von Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in den exprimierten Zellen seine Konformation und wird vom Grundzustand in einen aktiven Zustand überführt. Dies ist durch eine Zunahme der Fluoreszenz erkennbar und zeigt die Aktivität von Neuronen an. Sinkt die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, geht das GCaMP3-Molekül wieder in seinen Grundzustand über und die Fluoreszenz nimmt ab (Abbildung 4.9) (Tian et al. [2009]; Kotlikoff [2007]).

Durch Zeitreihenaufnahmen der Abdominalsegmente des VNS (Abbildung 4.10 D, A1-A5) konnte eine wellenförmige Ausbreitung der Fluoreszenzzunahme im Neuropil festgestellt werden (Abbildung 4.10 E-F). Dies wurde auf eine neuronale Aktivität entlang des VNS zurückgeführt. Eine Auswertung der zeitlichen Abfolge der GCaMP3-Fluoreszenzmaxima entlang der Abdominalsegmente des VNS verschiedener untersuchter Gehirne zeigte, dass die wellenförmigen Muster der Zu- und Abnahme der GCaMP3-Fluoreszenz sowohl von der Spitze des VNS in Richtung SOG (exemplarisch in Abbildung 4.10 (F) gezeigt) und ebenso umgekehrt verliefen. Diese Muster korreliert mit einer wellenförmigen Muskelaktivität durch den Rumpf bei einer Bewegung der Larve anterior- bzw. posteriorwärts. Es war daher zu vermuten, dass über die CG8784-Neurone eine Hugin-abhängige Funktion auf die Fortbewegung vermittelt wird.

Vier der Hugin-Neurone projizieren über den akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) cranial-

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.10: CG8784-Neurone im VNS vermitteln Kontakt zur Muskulatur des Hautmuskelschlauchs**

*In vivo*-Aufnahmen von Larven der Linie UAS-eYFP;hugR84.6 L1.3-Gal4 (A-C). Konfokale Aufnahme des Kopfbereichs einer L1-Larve in Lateral- (A) und Ventralansicht (B). Eine eYFP-Expression ist in Projektionen ausgehend von Terminalorgan (TO), Dorsoalorgan (DO) von Neuronen ventral des Cephalopharyngealen Skeletts (CPS) erkennbar. A-B) Ventrolateral des CPS erkennt man multipolare Muskelinnervationen (weißer Kreis). C) Fluoreszenzaufnahme einer L3-Larve im Bereich des Gehirns in Ventralansicht. Projektionen führen vom ventralen Nervensystem (VNS) zur Muskulatur des CPS (weißer Kreis) und des Hautmuskelschlauchs (Pfeilköpfe). D-D') Konfokalmikroskopische Aufnahme des larvalen VNS der Kreuzung hugR84.6-Gal4 L1.3 und UAS-GCamp3 (hugR84.6>GCamp3). GCamp3-positive Neuropilstrukturen sind in den Abdominalsegmenten (A1-A5, weiß eingerahmt) und in Projektionen in die Peripherie (schwarze Pfeile) erkennbar. E) Fluoreszenzauswertung von GCamp3 eines wellenförmig-verlaufenden Aktivitätsmusters im Neuropil der in (D') markierten Abdominalsegmente A1-A5. Der mit schwarzen Balken eingerahmte Bereich zeigt Neuropilaktivität. Ein Abschnitt ohne Aktivität ist grau markiert. F) Vergrößerung des in (E) eingerahmten Bereichs. Die Abfolge der maximalen Fluoreszenz in den markierten Abdominalsegmenten A5 bis A1 (Pfeilköpfe) zeigt die Verlaufsrichtung der GCamp3-Aktivierung von der Spitze des VNS in Richtung SOG. At - Aorta; mNSCs - mediane neurosekretorische Zellen; SOG - Suboesophagalganglion; Trans - Durchlichtkanal. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

wärts und innervieren eine Muskelgruppe des CPS, die für das Spreizen der Mundhaken verantwortlich ist. Es wurde eine muskelstimulatorische Funktion von Hugin auf den larvalen Kauapparat angenommen (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a]; Meng et al. [2002]; Schoofs, unveröffentlichte Daten). Aus diesem Grund wurde der Bereich des CPS und des Pseudocephalons auf eine mögliche Expression des Hugin-Rezeptors CG8784 untersucht.

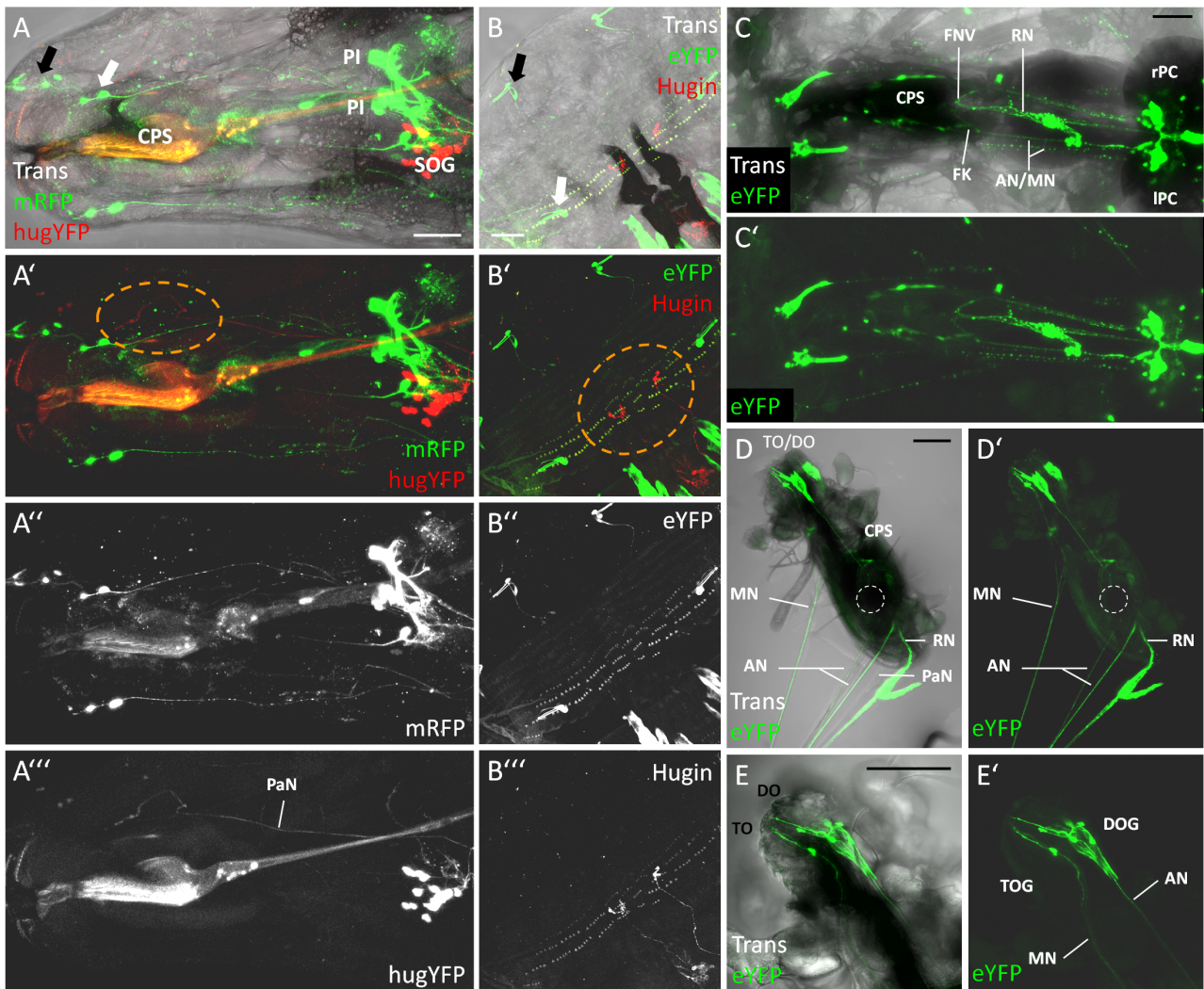
### 4.1.6 CG8784 wird in gustatorischen Rezeptorneuronen exprimiert

Durch die Kreuzung von *hugR84.6 L1.1-Gal4* und *hugYFP;UAS-mRFP* wurde das promotor-spezifische Expressionsmuster von *hugin* durch ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP) und das von CG8784 durch ein membranständiges, rot fluoreszierendes Protein (mRFP) visualisiert. Es war möglich die Hugin-Projektionen bis zur CPM in L1-Larven *In vivo* zu verfolgen (Abbildung 4.11 A-A', A''). Eine Expression des Hugin-Rezeptors CG8784 im Zielbereich der Hugin-Neurone war allerdings nicht zu erkennen (Abbildung 4.11 A-A''). In der Kopfregion von L3-Larven der Kreuzung *hugR84.6 L1.1-Gal4* mit *UAS-eYFP* wurde zusätzlich eine Antikörperfärbung gegen eYFP und endogen exprimiertes Hugin durchgeführt (Abbildung 4.11 B-B''). Die immunhistochemischen Färbung bestätigte, dass im Zielbereich der Hugin-Neurone keine Rezeptorexpression vorlag (Abbildung 4.11 A', B'; orange markiert).

Bei beiden Aufnahmen war allerdings eine starke Expression in verschiedenen Zellen im Pseudocephalon erkennbar. Diese bipolaren Zellen zeigten sowohl eine Verbindung zu den chemosensorischen Organen, als auch Projektionen zum larvalen Gehirn (Abbildung 4.11 A, B; schwarzer Pfeil). Im Bereich des Cirrenfelds waren auf Höhe der Mundhaken des CPS weitere Zellen mit Projektionen in Richtung ZNS erkennbar, die möglicherweise mit dem Ventralorgan (VO) oder internen chemosensorischen Organen verbunden waren (Abbildung 4.11 A, B; weißer Pfeil). Aufgrund der Lage und des Projektionsmusters wurde vermutet, dass es sich um sensorische Rezeptorneurone handeln könnte.

Um die Innervation der externen chemosensorischen Organe näher zu untersuchen, wurden Larven der Linie *eYFP;hugR84.6L1.3-Gal4* von der Dorsalseite her aufpräpariert und die pharyngealen Nerven zusammen mit dem ZNS und den chemosensorischen Organe freipräpariert. Es war eine Verbindung von drei Neuronen mit dem Terminalorgan (TO) zu erkennen, von denen zwei im Terminalorganganglion (TOG) und eine im Dorsalorganganglion (DOG) lagen (Abbildung 4.11 D-E'). Projektionen zum Dorsalorgan (DO) konnten nicht festgestellt werden. Eine Verbindung zum larvalen olfaktorischen Organ, dessen rezeptive Strukturen sich im zentralen Dom des DO befinden (Gerber und Stocker [2007]; Python und Stocker [2002]; Vosshall und Stocker [2007]), war damit auszuschließen.

## 4 Ergebnisse



### Abbildung 4.11: Das Expressionsmuster von CG8784 im larvalen Kopfbereich

Konfokalmikroskopische Aufnahmen des larvalen Kopfbereichs. A-B'') hugR84.6 L1.1-Gal4 gekreuzt mit hugYFP;UAS-mRFP in Ventrolateralansicht *In vivo* (A-A'') und in Dorsalansicht nach Antikörperfärbung (B-B''). Hugin-Neurone (rot) projizieren über den akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) zur Muskulatur des Cephalopharyngealen Skeletts (CPS). Im Bereich einer möglichen Muskelinnervation ist keine Kolokalisation mit CG8784 (grün) erkennbar (A' und B', orange umrandet). Es zeigt sich dagegen eine Expression in Neuronen der apikal liegenden externen chemosensorischen Organe (A, B; schwarzer Pfeil). Ein mögliches weiteres sensorisches Neuron ist im Bereich eines Cirrenfelds mit einem weißen Pfeil markiert. Cirri am Mundfeld und der Vorderdarm zeigen Autofluoreszenz. C-E') *In vivo*-Aufnahmen der freipräparierten pharyngealen Nerven der Linie eYFP;hugR84.6L1.3-Gal4 in Dorsalansicht (C-C') und Lateralansicht (D-E'). Das Terminalorgan wird von drei CG8784-positiven Zellen adressiert (E-E'). Zwei projizieren über das Terminalorganglion (TOG) in den Maxillarnerv (MN) und eine über das Terminalorganglion (TOG) in den Antennalnerv (AN) (D-D'). Beide Nerven führen in Richtung des Suboesophagialganglions im zentralen Nervensystem (ZNS). Die linke und rechte Hemisphäre des ZNS (IPCR/rPC) sind in C erkennbar. Eine Verbindung zum stomatogastrischen Nervensystem besteht über den rekurrenten Nerv (RN), der mit dem AN über die Frontale Nervenverbindung (FNV) und das Frontalkonnektiv (FK) verbunden ist. Der Kreis (D, D') markiert die Position einer Präparationsnadel. Zur besseren Orientierung ist der Durchlichtkanal (Trans) gezeigt. Primärantikörper sind in  $\alpha$ -GFP und rb  $\alpha$ -hugin in B-B''). Der Maßstab in A-B' entspricht 50  $\mu$ m, in C-E' 100  $\mu$ m.

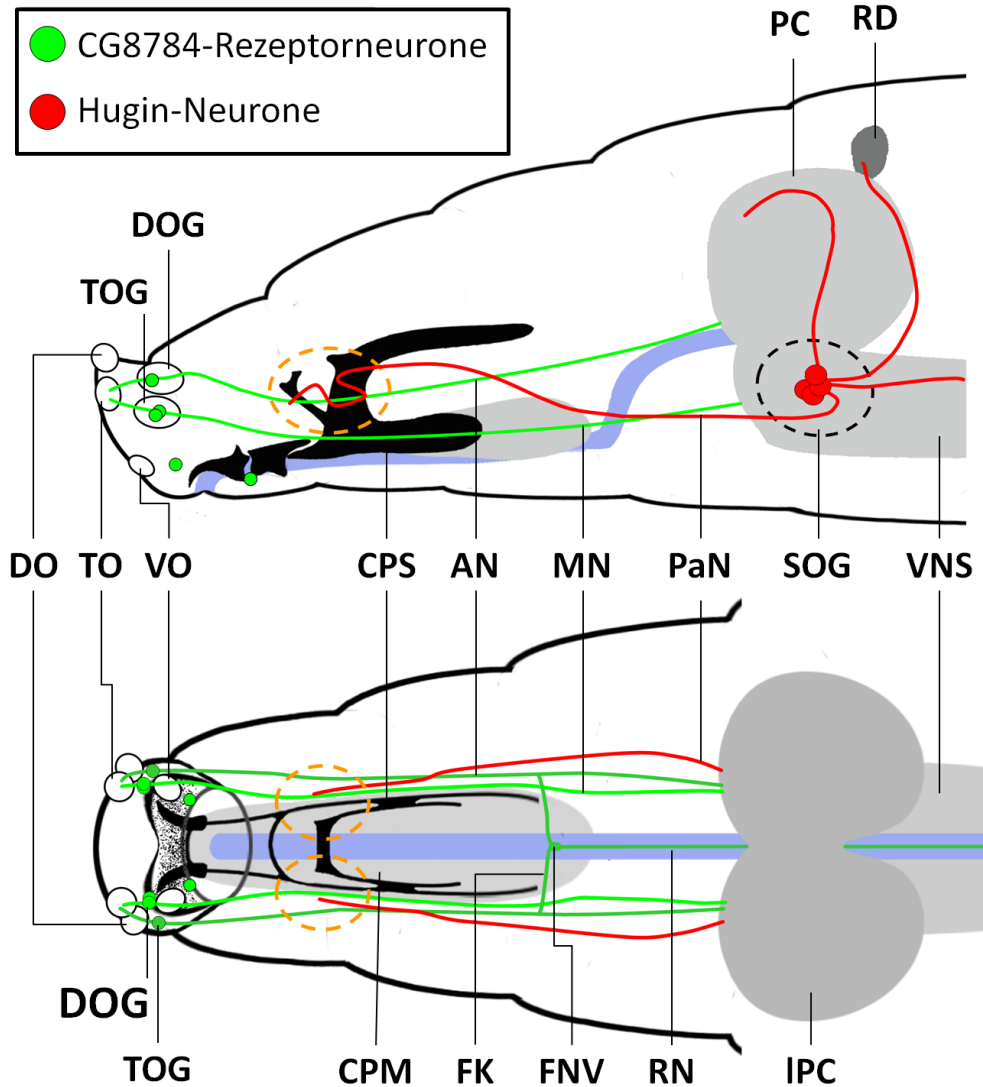
## 4 Ergebnisse

Das TO ist zusammen mit dem Ventralorgan (VO) und weiteren internen chemosensorischen Organen für die Wahrnehmung gustatorischer Informationen zuständig. Gustatorische Rezeptorneurone, die zum einen im DOG und zum anderen im TOG liegen, nehmen Kontakt mit den gustatorischen Sensillen im TO auf und leiten die Informationen über Axone des Antennalnervs (AN) bzw. Maxillarnervs (MN) in das primäre Geschmackszentrum im SOG weiter (Gerber und Stocker [2007]; Python und Stocker [2002]; Colomb et al. [2007]). Die Projektionen der CG8784-positiven Zellen konnten sowohl im AN, als auch im MN in Richtung SOG des ZNS verfolgt werden (Abbildung 4.11 C-C', D-D'). Es war daher zu vermuten, dass durch die Expression des Hugin-Rezeptors CG8784 in den Rezeptorneuronen, eine direkte Verbindung der Hugin-Neurone mit dem gustatorischen System besteht.

Eine CG8784-spezifische Markerexpression konnte außerdem im rekurrenten Nerv (RN) festgestellt werden. Dieser ist über das Frontalkonnektiv (FK) und die Frontale Nervenverbindung (FNV) mit dem AN verbunden (Abbildung 4.11 C-C') und verläuft entlang des SOGs zum Hypocerebralganglion. Er stellt eine Verbindung des ZNS und der RD zum stomatogastrischen Nervensystem (SNS) her, das verschiedene Bereiche des Vorderdarms wie Pharynx, Oesophagus und Proventrikulus innerviert (Spiess et al. [2008]; Neckameyer und Bhatt [2012]). Die promotorspezifischen Projektionsmuster der CG8784-positiven Neurone entlang der pharyngealen Nerven sind in der Abbildung 4.12 schematisch zusammengefasst.

Gustatorische Rezeptorneurone werden durch die Expression bestimmter gustatorischer Rezeptoren (GRs) in unterschiedliche Subpopulationen unterteilt (Gerber und Stocker [2007]; Scott et al. [2001]; Python und Stocker [2002]; Colomb et al. [2007]; Kwon et al. [2011]). Eine Zuordnung dieser Subpopulationen mit den hugR84.6-positiven Zellen wurde aufgrund fehlender Antikörper nicht durchgeführt. Gustatorische Rezeptoren, die für die Wahrnehmung von Bitterstoffen zuständig sind, innervieren das TO ausgehend vom DOG und vom TOG. Außerdem innervieren sie die internen gustatorischen Organe: die dorsalen, die ventralen und posterioren pharyngealen Sinnesorgane (DPS, VPS, PPS) (Kwon et al. [2011]; Colomb et al. [2007]). Die Übereinstimmungen im Expressionsmuster mit der hugR84.6-Linie ließen den Schluss auf eine Expression von CG8784 in den bitter-sensorischen Rezeptorneuronen zu.

Diese Rezeptorneurone zeichnen sich durch die Expression des Koffein-Rezeptors GR66a aus. Sie sind an einem Verhalten beteiligt, das zu einem Vermeiden bitter-schmeckender Nahrungsquellen führt (Wang et al. [2004]; Thorne et al. [2004]; Marella et al. [2006]). Morphologische Untersuchungen zeigten, dass Axone der GR66a-Rezeptorneurone in direkter räumliche Nähe zu stark verzweigten Dendriten der Hugin-Neurone im SOG ventrolateral des suboesophagealen Foramens endeten. Es wurde daher angenommen, dass eine direkte Kontaktaufnahme der Hugin-Zellen mit diesen bitter-sensorischen Rezeptorneuronen vorliegen könnte (Bader et al.



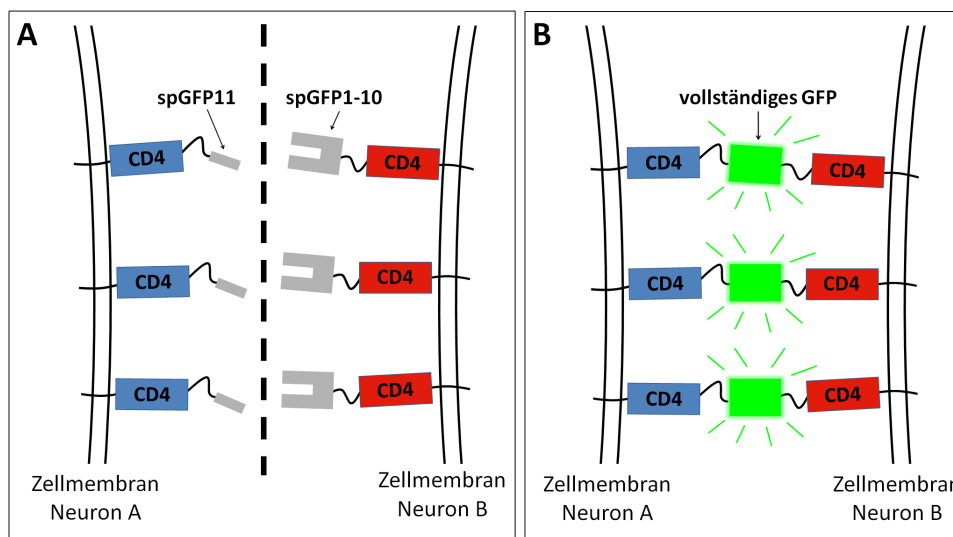
**Abbildung 4.12: Das Projektionsmuster von CG8784 in den pharyngealen Nerven**

Schematische Darstellung des promotorspezifischen Projektionsmusters der CG8784-positiven Neurone (grün) und der Hugin-Neurone (rot) in den pharyngealen Nerven in Lateral- (oben) und Dorsalansicht (unten) des Larvenkopfs von *Drosophila melanogaster*. Zellkörper sind als Kreise angedeutet. Ausgehend von den Hugin-Zellen im Suboesophagialganglion (SOG) führen Projektionen über den akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) zum Cephalopharyngealen Skelett (CPS). Der möglichen Innervationsbereich der Muskulatur (CPM) zeigt keine CG8784-spezifische Expression (orange markiert). CG8784-positive Rezeptorneurone projizieren über den Antennalnerv (AN) und den Maxillarnerv (MN) in Richtung SOG. Über den Rekurrenten Nerv (RN) besteht eine Verbindung des ZNS mit dem Stomatogastrischen Nervensystem. Der Oesophagus ist blau eingezeichnet. DOG - Dorsalorganglion; FK - Frontalkonktiv; FNV - Frontale Nervenverbindung; PC - Protocerebrum; RD - Ringdrüse; TO - Terminalorgan; TOG - Terminalorganglion; VNS - ventrales Nervensystem

[2007a]; Melcher und Pankratz [2005]; Melcher et al. [2007]). Ein Nachweis für eine direkte Verbindung konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden und wurde im Rahmen einer Aufklärung der Konnektivität des neuronalen Hugin-Netzwerks näher untersucht.

## 4.2 Aufklärung der Konnektivität des Hugin-abhängigen neuronalen Netzwerks

Die räumliche Nähe von Axonenden der bittersensorischen GR66a-Rezeptorneurone zu Hugin-Dendriten im SOG ließ eine Aufnahme und Weiterleitung gustatorischer Informationen über ein Hugin-abhängiges neuronales Netzwerk vermuten (Bader et al. [2007a]; Melcher und Pankratz [2005]). Das Projektionsmuster und die Lage der Zellkörper von CG8784-spezifischen Promotorlinien wiesen zudem auf eine Expression von CG8784 in den GR66a-positiven Rezeptorneuronen hin.



**Abbildung 4.13: GRASP (GFP-reconstitution across synaptic partners)**

Schematische Darstellung des GRASP-Systems (nach Feinberg et al. [2008]). A) Über die binären Expressionssysteme Gal4-UAS und LexA-LexAop werden in zwei neuronalen Subpopulationen die GFP-Untereinheiten spGFP1-10 bzw. spGFP11 exprimiert. Eine Fusion mit dem Oberflächenmarker CD4 (*cluster of differentiation 4*) vermittelt die Lokalisation an die Zellmembran. B) Besteht ein Kontakt zwischen den neuronalen Subpopulationen, kommen die beiden komplementären Untereinheiten in räumliche Nähe. Es wird ein vollständiges, grün fluoreszierendes Protein (GFP) rekonstruiert, das aufgrund seiner Fluoreszenz detektiert werden kann.

Zur Aufklärung des Hugin-abhängigen neuronalen Netzwerks wurden zunächst direkte neuronale Kontaktbereiche der Hugin-Neurone mit den GR66a-positiven GRNs mit Hilfe der GRASP-Methode (engl. *GFP-reconstitution across synaptic partners*) untersucht (Abbildung 4.13). Diese Methode ermöglichte die gleichzeitige Expression von zwei komplementären Untereinheiten (spGFP1-10 und spGFP11) eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in je zwei getrennten

neuronalen Subpopulation. Die Untereinheiten waren durch die Fusion mit dem Zelloberflächenmarker CD4 (*cluster of differentiation 4*) membranständig lokalisiert. In Kontaktbereichen der neuronalen Subpopulationen kam es durch die räumliche Nähe der beiden Untereinheiten zur Rekonstruktion eines vollständigen, funktionellen GFPs. Dessen Fluoreszenz konnte mit dem Konfokalmikroskop detektiert werden. Die Expression der Untereinheit CD4::spGFP1-10 wurde über das Gal4-UAS System vermittelt, die Expression von CD4::spGFP11 dagegen über ein zweites binäres System LexA-LexAop (Feinberg et al. [2008]; Gordon und Scott [2009]). Bisherige Untersuchungen promotorabhängiger Expressionsmuster mit Hilfe binärer Expressionssysteme wurden bislang über das Gal4-UAS System (Brand und Perrimon [1993]) durchgeführt. Um die GRASP-Methode nutzen zu können, musste daher zunächst das binäre LexA-LexAop Expressionssystem (Lai und Lee [2006]) etabliert werden.

#### 4.2.1 Das Expressionsmuster der Hugin-LexA Promotorlinien

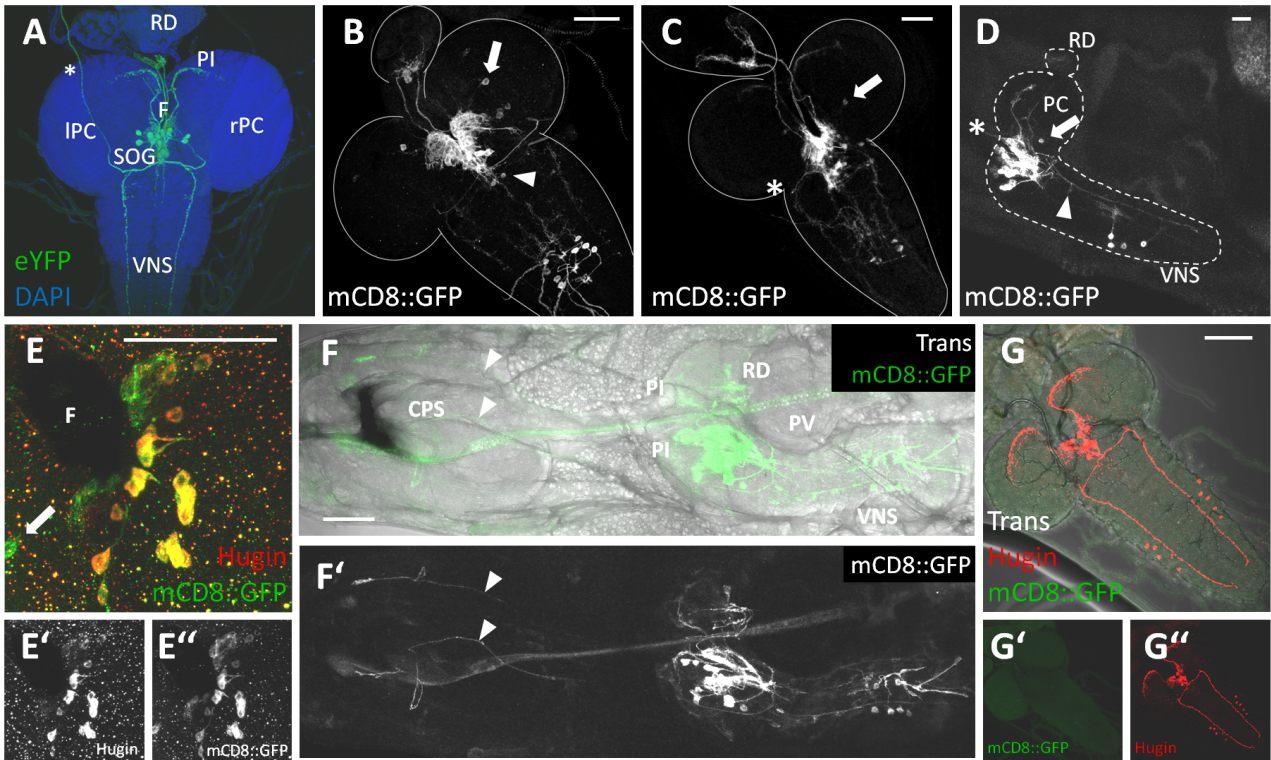
Es wurden LexA-Promotorlinien von Hugin erzeugt, die über eine  $\Phi$ C31-Integrase vermittelt das Promotorkonstrukt spezifisch auf dem zweiten oder dritten Chromosom integriert hatten. Auf diese Weise konnten die LexA-Promotorlinien für Kreuzungen in nachfolgenden GRASP-Experimenten flexibel eingesetzt werden.

Für die Erzeugung der Hugin-LexA Treiberlinien hug1.2-LexA 86FB und hug1.2-LexA attP40 wurde ein Promotorfragment von *hugin* mit einer Länge von 1243bp verwendet. Mit diesem konnte bereits eine Gal4-Promotorlinie (hug1.2-Gal4) etabliert werden (M. Peters, Diplomarbeit (unveröffentlichte Daten)). Sie zeigte das typische Expressionsmuster der 20 Hugin-Neurone (Abbildung 4.14 A) entsprechend der publizierten Hugin-Promotorlinie hugS3 (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a]). Durch die Verwendung dieses Fragments sollte die Funktionalität des LexA-LexAop Systems und die Spezifität des LexA-Promotorkonstrukts überprüft werden. Die neu generierten LexA-Promotorlinien wurden zu diesem Zweck zunächst auf ihr Expressionsmuster im ZNS von *Drosophila*-Larven untersucht.

Die unabhängigen Linien hug1.2-LexA 86FB und hug1.2-LexA attP40 wurden zunächst mit LexAop2-mCD8::GFP Effektorlinien gekreuzt. Das membranständige, grün fluoreszierende Fusionsprotein mCD8::GFP ermöglichte eine Visualisierung der Expressionsmuster in nicht fixierten Gehirnen (Abbildung 4.14 B-D). Unter der Kontrolle der hug1.2-Gal4 Promotorlinie wurde das gelb fluoreszierende Protein (eYFP) exprimiert und mittels eines GFP-Antikörpers immunhistochemisch detektiert (Abbildung 4.14 A). Die Expressionsmuster der LexA-Linien wurden mit der Gal4-Linien verglichen. Es zeigte sich eine Übereinstimmung in den 20 Zellkörpern im SOG, von denen Projektionen in das PC, ins VNS und in die RD führten. Eine weitere



## 4 Ergebnisse



### Abbildung 4.14: Untersuchung des Expressionsmusters der Hugin-LexA Promotorlinien

Konfokalmikroskopische Aufnahmen des Expressionsmusters Hugin-abhängiger Promotorlinien. A) Die Immunfluoreszenzaufnahme der Gal4-Promotorlinie *hug1.2-Gal4 L2.3* gekreuzt mit *UAS-eYFP* (grün) zeigt das Hugin-spezifische Expressionsmuster im larvalen Gehirn: Ausgehend von 20 Zellkörpern im Suboesophagealganglion (SOG) führen Projektionen in das ventrale Nervensystem (VNS), entlang des Foramens (F) in die linke bzw. rechte Hemisphäre des Protocerebrums (IPC/rPC) und in die Ringdrüse (RD). Die Projektion zum Cephalopharyngealen Skelett (CPS) ist präparationsbedingt durchtrennt (Stern). B-F'') Expressionsmuster von *hug1.2-LexA* mit genomischer Integration auf dem zweiten (C-E'') oder dritten Chromosom (B, F-F''), visualisiert durch promotor-spezifische *mCD8::GFP*-Expression mittels der Linien *hug1.2-LexA attP40* und *hug1.2-LexA 86Fb*. B-D) *Ex Vivo*-Aufnahmen larvaler Gehirne in Aufsicht (B, C) und in Lateralansicht (D) zeigen das Hugin-Expressionsmuster. Zusätzliche Zellen sind im PC (Pfeil), im VNS angrenzend an das SOG (Pfeilkopf) und caudal auf der Ventralseite des VNS erkennbar. E-E'') Eine immunhistochemische Färbung zeigt die Kolorisierung von GFP mit den Hugin-positiven Zellen im SOG (gelb). F-F'') *In Vivo*-Aufnahme des larvalen Kopfbereichs mit Projektionen zum CPS in Lateralansicht. G-G'') Die Immunfluoreszenzaufnahme der Linie *LexA0kb 86Fb* gekreuzt mit *LexAop-mCD8::GFP* zeigt keine GFP-Expression im larvalen Gehirn. Als Orientierungshilfe ist eine Hugin-Färbung (rot) gezeigt. Als Primärantikörper wurden *m*  $\alpha$ -GFP (A, E, E'') und *rb*  $\alpha$ -*hugPK2* (E-E', G'-G'') verwendet. Die Gehirne wurden durch Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau) (A) oder durch weiße Umrisse (B-D) kenntlich gemacht. Trans - Durchlichtkanal. Der Maßstabsbalken entspricht  $50\mu\text{m}$ .

## 4 Ergebnisse

Projektion, die bei der Präparation der Gehirne durchtrennt wurde (Abbildung 4.14 A, C-D (Stern)), konnte durch eine *In vivo*-Aufnahme des Kopfbereichs einer L1-Larve bis zum CPS verfolgt werden (Abbildung 4.14 F-F', Pfeilköpfe). Durch eine Doppelfärbung von GFP und endogenem Hugin an fixierten Gehirnen der LexA-Promotorlinien konnte die Expression des Fluoreszenzmarkers mCD8::GFP in den 20 Hugin-Zellen im SOG bestätigt werden (Abbildung 4.14 E-E').

Bei den beiden hug1.2-LexA Promotorlinien war allerdings in einigen Zellen eine zusätzliche Expression erkennbar, die weder in der Hugin-spezifischen Gal4-Linie noch in der Antikörperfärbung des endogenen Hugins erkennbar waren. Diese lagen im PC (Abbildung 4.14 B-E, Pfeil) und im VNS angrenzend an das SOG (Abbildung 4.14 B-E, Pfeilkopf). Weitere 6-8 Zellen zeigten sich ventral im VNS, die bilateralsymmetrisch entlang der Mittellinie angeordnet waren (Abbildung 4.14 B-E).

Als Kontrolle eines vektorabhängigen, unspezifischen Expressionsmusters der LexA-Promotorlinien wurde ein Leervektor injiziert, bei dem der Hugin-Promotor zuvor entfernt wurde. Es wurde eine immunhistochemische GFP-Färbung an fixierten Gehirnen der generierten LexA0kb 86Fb-Linien durchgeführt, die mit LexAop2-mCD8::GFP gekreuzt waren. Es konnte keine Expression des Fluoreszenzmarkers mCD8::GFP in Abhängigkeit des Leervektors nachgewiesen werden (Abbildung 4.14 G-G'). Das Expressionsmuster der Hugin-LexA Promotorlinien könnte damit ein Hinweis auf eine endogene Expression von *hugin* in den beschriebenen Neuronen sein. Diese ist möglicherweise so schwach, dass sie bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Da der Leervektor keinen Minimalpromotor enthält ist allerdings nicht auszuschließen, dass ein unspezifisches Expressionsmuster des Vektors erst durch das inklonierte Promotorfragment mit Minimalpromotor ersichtlich wurde.

Gut erkennbar waren bei beiden Hug1.2-LexA Linien die stark verzweigten dendritischen Strukturen ventrolateral des Foramens (Abbildung 4.14 B-C). Durch Kreuzung der Linie GR66a-Gal4 mit der Markerlinie UAS-Gal4;UAS-mCD8::GFP konnten mittels Antikörperfärbung von GFP die Axone der GR66a-positiven GRNs im larvalen ZNS bis in diesen Bereich des SOGs verfolgt werden (Abbildung 4.15 A-B). Beide Strukturen grenzen hier unmittelbar aneinander an (Abbildung 4.15 C) (Melcher und Pankratz [2005]) und eine direkte Kontaktaufnahme zwischen den beiden neuronalen Subpopulationen sollte nun mit Hilfe der GRASP-Methode in den Larven näher untersucht werden.

#### 4.2.2 Kontakt der Hugin-Neurone mit gustatorischen Rezeptorneuronen

Unter der Kontrolle einer Hug1.2-LexA attB40-Treiberlinie wurde in den Hugin-Zellen ein Teil des vollständigen GFPs LexAop-CD4::spGFP11 exprimiert. Unter der Kontrolle der GR66a-Gal4 Linie wurde das komplementäre Fragment UAS-CD4::spGFP1-10 exprimiert. Ein entsprechendes Kreuzungsschema zur Kombination der vier Konstrukte in einem Tier ist in Kapitel 3.5.8 beschrieben.

In Aufnahmen an nicht fixierten Gehirnen war eine GFP-Fluoreszenz an neuronalen Kontaktstellen im Randbereich des SOGs lateral und ventrolateral des Foramens und zentral im SOG erkennbar (Abbildung 4.15 D-F”). Eine Verbindung der beiden Subpopulationen war anhand des Projektionsmuster auch entlang der eingehenden Projektionsbahnen von GR66a im SOG erkennbar (Abbildung 4.15 F, Pfeil).

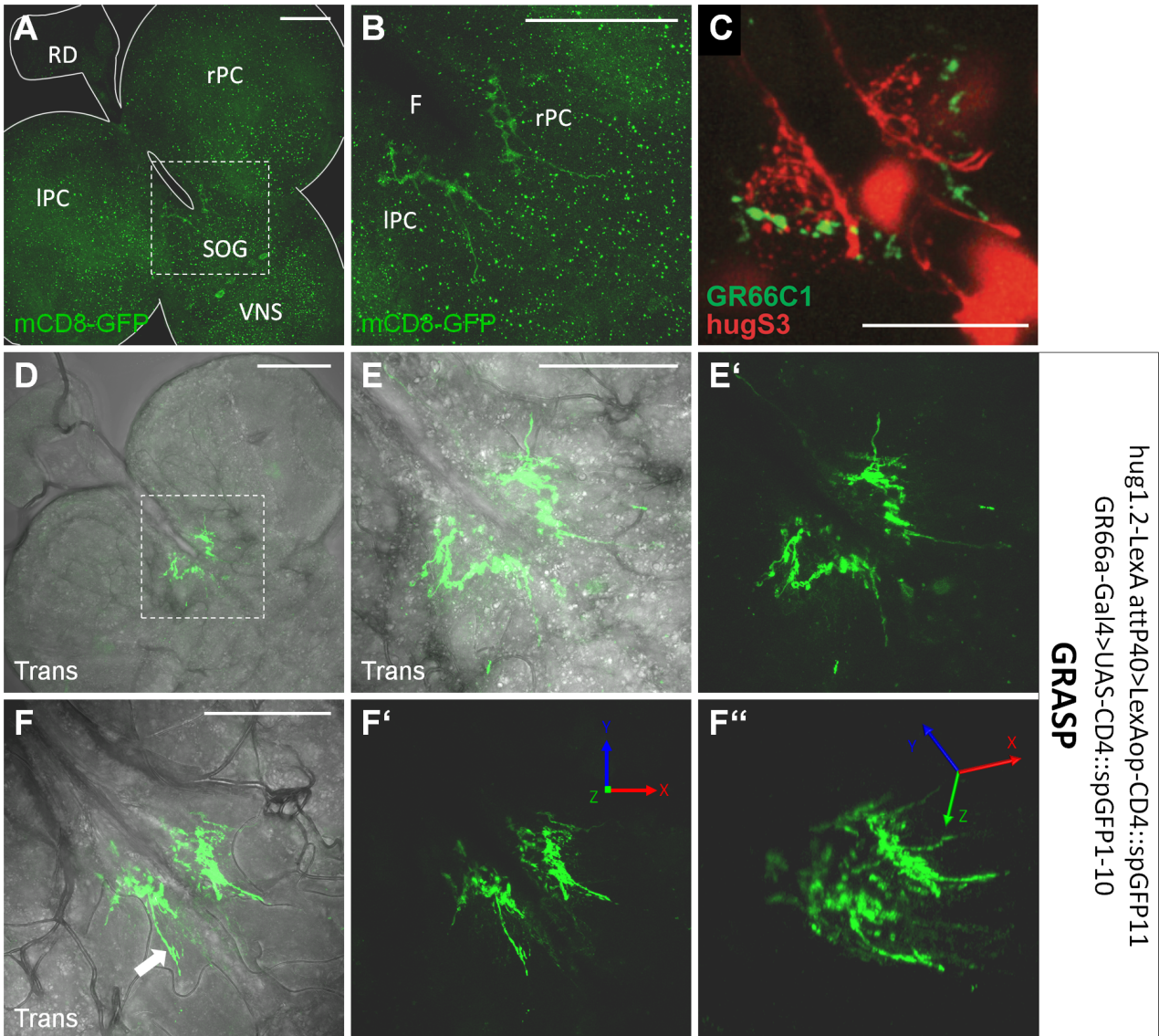
Durch die GRASP-Methode konnte somit eine direkte Verbindung zwischen den Dendriten der Hugin-Neurone und den Axonen der GR66a-Rezeptorneuronen bestätigt werden, die auf synaptische Kontakte zwischen den beiden neuronalen Subpopulationen schließen ließ. Die Konnektivität der Hugin-spezifischen Projektionsbahnen im larvalen ZNS wurde im Folgenden weiterführend untersucht.

#### 4.2.3 Projektionen der Hugin-Neurone stellen eine Verbindung zu den medianen neurosekretorischen Zellen her

Die möglichen Zielzellen der Hugin-Neurone wurden im Verlauf der Arbeit anhand des Expressionsmusters der Hugin-Rezeptoren lokalisiert. Eine promotorabhängige Expression von CG8784 hatte sich dabei in verschiedenen Bereichen des larvalen ZNS gezeigt, die von Projektionen der Hugin-Neurone innerviert werden. Mittels der GRASP-Methode wurde eine direkte Verbindung der Hugin-Zellen mit den CG8784-positiven Neuronen untersucht.

Es wurden gezielte Kreuzungen durchgeführt, um CD4::spGFP11 mittels der Linie hug1.2-LexA attP40 in den Hugin-Neuronen und gleichzeitig CD4::spGFP1-10 über die Linie hugR84.6-Gal4 in den CG8784-Neuronen zu exprimieren (Kapitel 3.5.8). Die GFP-Fluoreszenz wurde entweder direkt an frisch präparierten Gehirnen nachgewiesen oder immunhistochemisch an fixierten Gehirnen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen das vollständige GFP. Im VNS war die Fluoreszenz schwach und es zeigte sich ein unregelmäßigen Muster, das in verschiedenen Präparaten unterschiedlich ausgeprägt war (Abbildung 4.16 A-A’). Deutlich erkennbar war die GFP-Fluoreszenz allerdings im SOG und im PC (Abbildung 4.16 A-D). Vergrößerte Aufnahmen dieses Bereichs zeigten eine starke Verzweigung im SOG ventrolateral des Foramens. Von dort ausgehend waren GRASP-Muster entlang zweier Projektionen bis ins SOG erkennbar, in

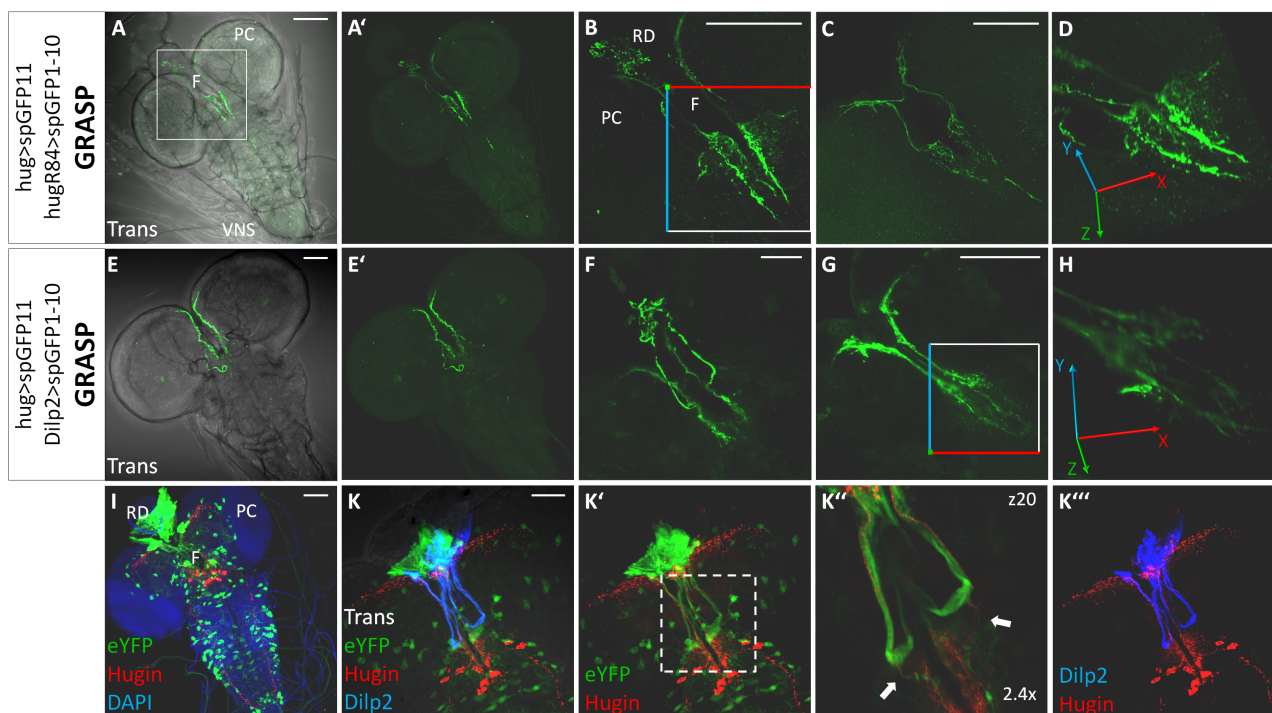
## 4 Ergebnisse



### Abbildung 4.15: Kontakt der GR66a-Rezeptorneurone mit Hugin-Neuronen im Subesophagialganglion

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Larvengehirnen. A-C) Immunhistochemische Färbungen der Kreuzung GR66a-Gal4 und UAS-Gal4;UAS-mCD8::GFP. A) Axone der GR66a-positiven gustatorischen Rezeptorneurone innervieren das Subesophagialganglion (SOG). B) In der Vergrößerung des SOGs aus A) (weißes Rechteck) erkennt man die Projektionsbahnen ventrolateral des Foramens (F). C) Axonenden der GR66a-Rezeptorneurone (GR66C1) liegen in der Nähe stark verzweigter Hugin-positiver Dendriten (entnommen aus Melcher und Pankratz [2005]). D-F'') Expressionsmuster von GRASP (GFP-reconstitution across synaptic partners) in frisch präparierten nicht fixierten Larvengehirnen. LexAop-CD4::GFP11 wird in Hugin-positiven Zellen unter spezifischer Kontrolle von hug1.2-LexA, UAS-CD4::GFP1-10 unter der Kontrolle des GR66a-Gal4 Promotor-Konstrukts exprimiert. D) GFP-Fluoreszenz ist ventral und ventrolateral des Foramens erkennbar. E-E') Vergrößerung des SOGs aus D) (weißes Rechteck). F-F'') Durch Rotation der Z-Stapel Aufnahme erkennt man die räumliche Ausdehnung des Kontaktbereichs von GR66a- und Hugin-positiven Neuriten entlang des Foramens. Als Primärantikörper wurde rb  $\alpha$ -GFP (A-B) verwendet. rPC/IPC - rechte bzw. linke Hemisphäre des Protocerebrums; Trans - Durchlichtaufnahme; VNS - ventrales Nervensystem;. Die Vektorpfeile in F') und F'') entsprechen 20  $\mu$ m. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.16: Untersuchung der Konnektivität der Hugin-Neurone mit den medianen neurosekretorischen Zellen**

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Larvengehirnen im dritten Entwicklungsstadium. A-D) GRASP-Expressionsmuster der Kombination folgender Linien: *hug1.2-LexA attP40*, *LexAop-CD4::GFP11* (*hug>spGFP11*), *hugR84.6-Gal4* und *UAS-CD4::spGFP1-10* (*hugR84>spGFP1-10*). Erkennbar ist die Verbindung der Hugin- und CG8784-Neurone in Aufnahmen *Ex vivo* (A-B, D) und nach GFP-Antikörperfärbung (C). A-A') Im ventralen Nervensystem (VNS) ist ein unregelmäßiges Fluoreszenzmuster erkennbar. B) Die Vergrößerung des markierten Bereichs in A) (weißes Rechteck) zeigt GFP-Fluoreszenz entlang von Projektionsbahnen in das Protocerebrum (PC), in die Ringdrüse (RD), und im Suboesophagialganglion (SOG). C) Projektionen dorsal des Foramens (F) sind ebenfalls GFP-positiv. D) Durch Drehung der Z-Stapelaufnahme in B) ist die GFP-Fluoreszenz in starken Verzweigungen im SOG entlang des Foramens erkennbar. E-H) *Ex vivo*-Aufnahmen des GRASP-Musters der Kombination folgender Linien: *hug1.2-LexA attP40*, *LexAop-CD4::GFP11* (*hug>spGFP11*) und *Dilp2-Gal4*, *UAS-CD4::spGFP1-10* (*Dilp2>spGFP1-10*). E-E') GFP-Fluoreszenz ist im PC erkennbar. F-G) GFP-Fluoreszenz ist entlang von Projektionsbahnen zur RD, zum PC und zum SOG erkennbar. H) Eine Drehung der Z-Stapelaufnahme von G) (markierter Bereich) zeigt stark verzweigte Kontaktbereiche im SOG entlang des Foramens. I-K''') Immunhistochemische Färbung der Linie *UAS-eYFP;hugR84.6-Gal4 L1.3*. (I, K, K', K''') Erkennbar sind Neuriten der Hugin- (rot), *hugR84.6*- (grün) und *Dilp2*-positiven (blau) Neurone, die in direkter räumlicher Nähe zueinander liegen. K'') Die Vergrößerung im Bereich des Foramens (K', weißes Rechteck) zeigt in Bild 20 der Z-Stapelaufnahme (z20) Hugin- und *hugR84.6*-Neuriten, die parallel zur Ringdrüse führen (weiße Pfeile). Die verwendeten Primärantikörper sind m  $\alpha$ -GFP (C, I-K2''), rb  $\alpha$ -*hug* (I-K', K''') und gp  $\alpha$ -*Dilp2* (I, K, K'''). Die Gehirne sind mittels des Durchlichtkanals (Trans) in A), E) und K) oder durch eine DAPI-Färbung (blau) der Zellkerne in I) erkennbar. Die Länge der Vektorpfeile (D,H) entspricht  $20\mu\text{m}$ , der Maßstabsbalken entspricht  $50\mu\text{m}$ .

## 4 Ergebnisse

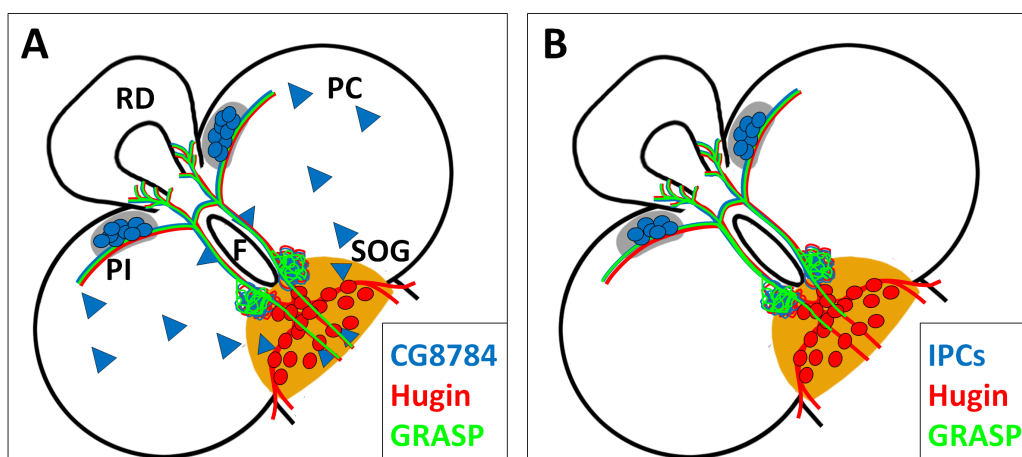
Projektionen entlang des Foramens in das PC und in Projektionen, die in der RD mit starken Verzweigungen endeten (Abbildung 4.16 B-D). Deutlich war erkennbar, dass ein Kontakt nicht nur in Projektionen auf jeder Seite des PCs, sondern auch entlang der Verbindung zwischen den beiden Hemisphären dorsal des Foramens auftrat (4.16 C). Im Bereich von Zellkörpern konnte dagegen keine Fluoreszenz festgestellt werden. Das Fluoreszenzmuster war damit auf bestimmte Projektionsbahnen in das PC, in das SOG und zur RD beschränkt. Es wurde angenommen, dass eine Kontaktaufnahme in diesen Bereichen spezifisch mit Neuriten der medianen neurosekretorischen Zellen (mNSCs) stattgefunden hatte.

Mit der Hugin-Rezeptorlinie hugR84.6-Gal4 waren neun mNSCs erkennbar, von denen sieben als IPCs identifiziert werden konnten (Kapitel 4.1.1). Es wurde eine Dreifachfärbung der homozygoten Linie UAS-eYFP;hugR84-Gal4 mit Antikörpern gegen Hugin, GFP und Dilp2 durchgeführt. Der GFP-Antikörper wurde zur Detektion des verbesserten, gelb fluoreszierenden Proteins (eYFP) genutzt, das unter Kontrolle der Linie hugR84.6-Gal4 L1.3 exprimiert wurde. Eine Kolo-kalisation von Dilp2 und hugR84.6 in den vermuteten Kontaktbereichen mit den Hugin-Neuronen im PC, in der RD und ventrolateral des Foramens im SOG wurde dabei deutlich (Abbildung 4.16 K-K', K''). In der Vergrößerung konnte man die Projektionsbahnen der Hugin-Neurone zur RD entlang der hugR84.6-positiven mNSC-Projektionen erkennen (Abbildung 4.16 K'', Pfeil).

Mit Hilfe der GRASP-Methode wurde zusätzlich die Verbindung zwischen Dilp2- und Hugin-positiven Neuronen untersucht. CD4::spGFP1-10 wurde über die Linie Dilp2-Gal4 in den IPCs und CD4::spGFP11 über die Linie hug1.2-LexA 86FB in den Hugin-Zellen exprimiert. GFP-Fluoreszenz war entlang von Projektionen lateral des Foramens erkennbar, die einerseits in die Hemisphären des PCs und andererseits über das SOG in Richtung VNS führten (Abbildung 4.16 E-G). Außerdem waren Projektionen zur RD GFP-positiv, die sich im Bereich des neuroendokrinen Organs verzweigten (4.16 F). Ventrolateral des Foramens war ein ebenfalls stark verzweigter Kontaktbereich erkennbar (4.16 G-H). In Abbildung 4.17 sind die beiden GRASP-Expressionsmuster schematisch zusammengefasst, die eine deutliche Übereinstimmung zeigten. Es wurde daher vermutet, dass eine direkte Verbindung der Hugin-Neurone mit den mNSCs und insbesondere mit den IPCs des *Pars Intercerebralis* besteht.

### 4.3 Deletion des potentiellen Promotorbereichs der Hugin-Rezeptoren

Die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, dass durch die Erzeugung von Gal4-Treiberlinien aus dem intergenen Bereich von CG8795 und CG8784, in Abhängigkeit der Orientierung und des verwendeten Expressionsvektors, ein spezifisches Expressionsmuster der Hugin-



**Abbildung 4.17: Konnektivität der Hugin-Neurone im Protocerebrum**

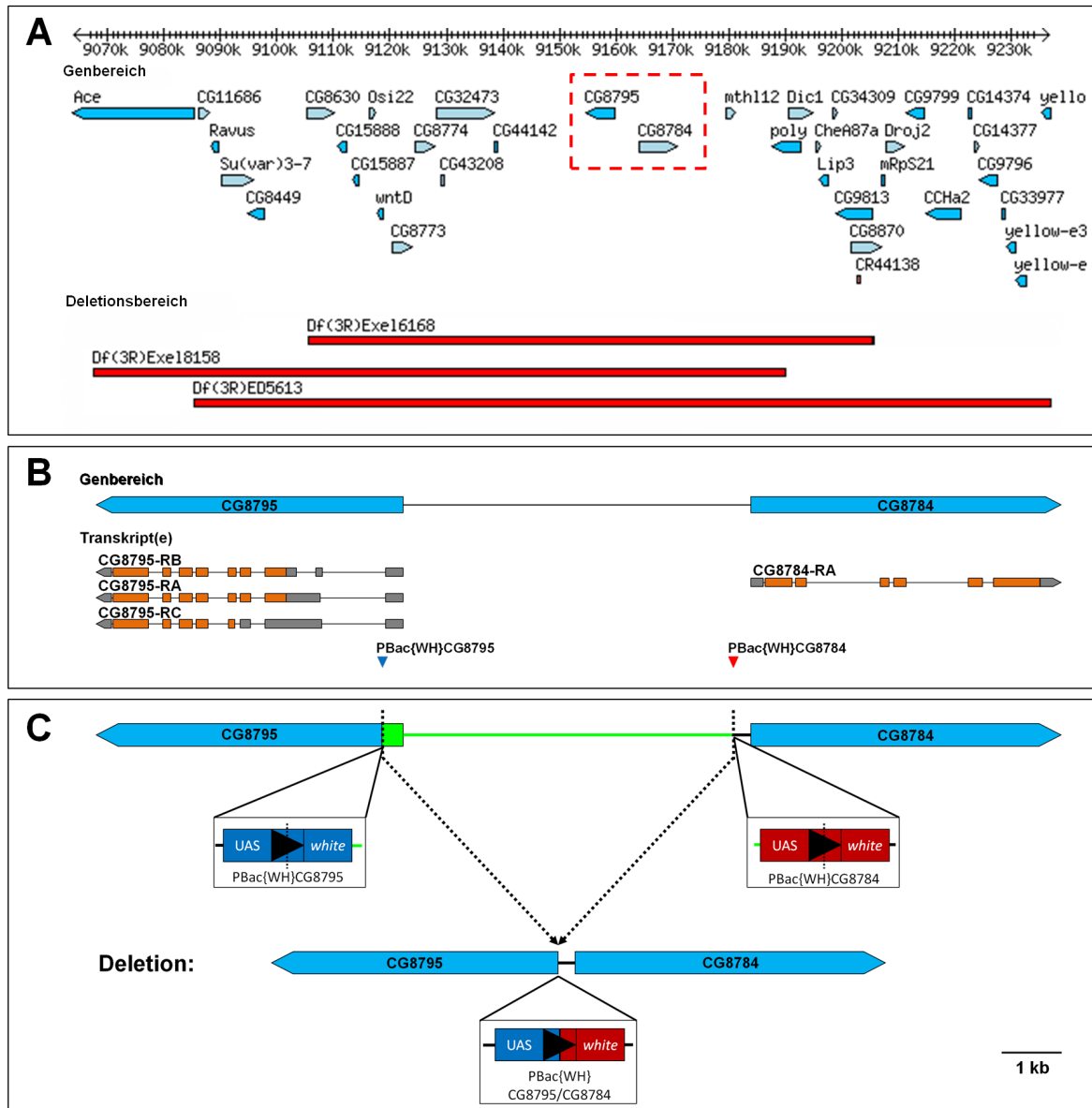
Schematische Darstellung der Konnektivität der Hugin-Neurone mit den hugR84.6-positiven medianen neurosekretorischen Zellen (A) bzw. den Insulin-produzierenden Zellen (B) des *Pars Intercerebralis* (PI) erkennbar mit Hilfe der GRASP-Methode. Hugin-Neurone sind rot, hugR84.6-Neurone (CG8784) in (A) und Insulin-produzierende Zellen (IPCs) in (B) blau dargestellt. Kontaktbereiche mit GFP-Fluoreszenz (GRASP) sind grün markiert. Die beiden Konnektivitätsmuster zeigen eine deutliche Übereinstimmung im Protocerebrum (PC), in der Ringdrüse (RD) und im Suboesophagialganglion (SOG). Das PI ist grau, das SOG orange angezeichnet. F - Foramen.

Rezeptoren nachweisbar war. Es konnte damit gezeigt werden, dass der intergene Bereich Promotorsequenzen der beiden Gene enthält. Im nächsten Schritt sollte durch gezielte Deletion dieses intergenen Abschnitts der Promotorbereich aus dem Genom entfernt werden, um damit eine Expression der beiden Gene zu unterdrücken.

Verwendet wurden hierfür zwei Linien der *Exelixis*-Sammlung (Thibault et al. [2004]), die jeweils ein Allel mit einem künstlichen „piggyBac“-Transposon (Parks et al. [2004]) aufwies. Bei der Linie PBac{WH}CG8795 lag dieses Transposon im ersten Intron von CG8795, bei der Linie PBac{WH}CG8784 angrenzend an die Gensequenz von CG8784 285bp stromaufwärts. Die Lage und Orientierung der „piggyBac“-Konstrukte ist in Abbildung 4.18 (B-C) gezeigt.

Die beiden „piggyBac“-Konstrukte wurden nach der Beschreibung von Parks et al. [2004] zusammen mit einer hitzeaktivierbaren FLP-Rekombinase in einer Fliege kombiniert. Das Kreuzungsschema ist in Abbildung 3.5 zusammengefasst und der Ablauf zur Erzeugung der Deletionsmutanten ist im zugehörigen Kapitel 3.5.9 erläutert. Wie in der vereinfachten Schemazeichnung in Abbildung 4.18 (C) dargestellt, wurde durch die FLP-Rekombinase eine Trans-Rekombination der homologen Chromosomen induziert. Dabei wurde der intergene Bereich entfernt und eine Deletion erzeugt. Bei dem nachfolgenden „Screen“ konnte anhand isolierter genomischer DNS und gezielter PCR-Untersuchungen die Deletionslinie Del49/TM3, Sb isoliert werden (Kapitel 3.5.10). Das mutierte Allel dieser Linie wurde durch das Einkreuzen des Balancerchromosoms TM3 stabilisiert. Balancerchromosomen verhindern die meiotische Rekombination und erlauben

## 4 Ergebnisse

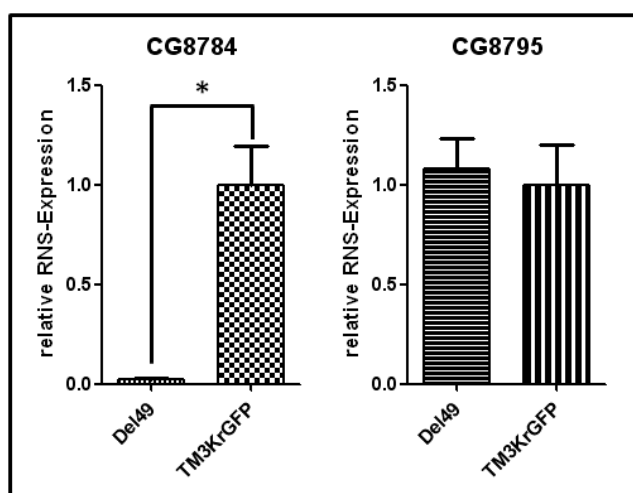


**Abbildung 4.18: Erzeugung einer Deletionsmutante des Promotorbereichs der Hugin-Rezeptoren**

A) Schematische Darstellung des Deletionsbereichs (rote Balken) der Defizienzlinien Df(3R)Exel16168, Df(3R)Exel18158 und Df(3R)ED5613 auf dem dritten Chromosom (geändert nach <http://www.flybase.org>). Der Genbereich der Hugin-Rezeptoren CG8795 und CG8784 ist mit einem roten Rechteck markiert. Nähere Angaben zu den gezeigten Genen können unter <http://www.flybase.org> nachgelesen werden. B-C) Zur Erzeugung einer Deletion im intergenen Bereich von CG8795 und CG8784 wurden die beiden Exelixis-Linien PBac{WH}CG8795 (dunkelblau) und PBac{WH}CG8784 (rot) verwendet (Thibault et al. [2004]). B) Schematische Darstellung der Genbereiche (hellblau) und Transkripte, mit kodierender Sequenz (orange), der Hugin-Rezeptoren CG8795 und CG8784 (geändert nach <http://www.flybase.org>). PBac{WH}CG8795 liegt im ersten Intron von CG8795, PBac{WH}CG8784 liegt 285bp stromaufwärts der Gensequenz von CG8784. C) Vereinfachte vergrößerte Darstellung der PBacWH-Konstrukte mit UAS-, FRT-(schwarzer Pfeil) und *white*-Sequenz. Die Deletion erfolgt über die FRT-Stellen durch eine Flipase-vermittelte homologe Rekombination (unterbrochener Pfeil) und es entsteht ein neues vollständiges PBac{WH}-Konstrukt (PBac{WH}CG8795/CG8784). Der Deletionsbereich ist grün eingezeichnet. FRT - FLP-Rekombinase-Zielsequenz; UAS - *upstream activating sequence*



## 4 Ergebnisse



Quantifizierung der Expression von CG8784 und CG8795 in Embryonen der Defizienzlinie Del49/TM3KrGFP mittels qPCR. Die Expression von CG8784 ist in homozygoten Deletionsmutanten signifikant reduziert ( $P=0,0346$ ). Als Kontrolle wurden homozygote Embryonen mit dem Balancer TM3KrGFP verwendet. Die Expression dieser Linie ist auf 1 gesetzt. Gezeigt ist das Ergebnis aus zwei biologischen Wiederholungen,  $N=25$ . Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen T-Test durchgeführt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 4.19: Quantitative Analyse der Expression von CG8784 und CG8795

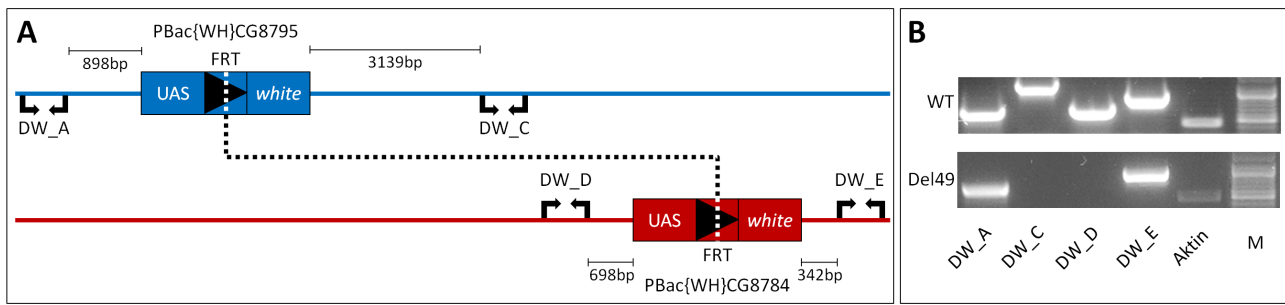
die Haltung stabiler Fliegenlinien, die eine rezessiv letale Mutationen tragen. Das Balancerchromosom TM3 kodiert für das Allel *Stubble* (*Sb*), eine Mutation, die in Adulten an verkürzten Thorakalborsten erkennbar ist. Diese Linie wurde zunächst auf einen möglichen Phänotyp untersucht.

### 4.3.1 Verminderte CG8784-Expression in der Deletionsmutante Del49

Bei einer Untersuchung der Defizienzlinie Del49/TM3, *Sb* wurde festgestellt, dass alle Fliegen einer Population das Allel für *Stubble* aufwiesen. Dies zeigte, dass die homozygoten Tiere ab einem gewissen Entwicklungsstadium nicht mehr lebensfähig waren. Da der Dominantmarker *Sb* nur in Adulten erkennbar war, wurde das Balancerchromosom TM3, *Sb* mittels einer Kreuzung durch einen TM3-Balancer mit einem konstitutiv aktiven Fluoreszenzmarker KrGFP (TM3KrGFP) ausgetauscht. Um zu erfahren in welchem Entwicklungsstadium die homozygoten Tiere gestorben waren, wurde die Entwicklung von Embryonen 20-24 h nach der Eiablage (AEL) in regelmäßigen Abständen unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop verfolgt. Es konnte festgestellt werden, dass sich die homozygoten, nicht fluoreszenten Deletionsmutanten im Ei bis zur Larve entwickelt hatten. Sie waren vital und bewegten sich, konnten sich aber nicht aus der Eihülle befreien. Einige der Tiere wurden auf eine Apfagarplatte mit roter Hefe transferiert und die Eihülle mit einer Pinzette entfernt. Die befreiten Larven zeigten kaum Aktivität und es konnte keine Futteraufnahme von roter Hefe beobachtet werden.

Als Ursache für diesen Phänotyp wurde eine Fehler in der Genregulation eines oder beider Hugin-Rezeptoren in der Deletionsmutante angenommen. Daher wurde auf transkriptioneller Ebene die Expression von CG8784 und CG8795 quantitativ ausgewertet. Für diesen Zweck

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.20: Bestätigung der Deletion des intergenen Bereichs der Hugin-Rezeptoren**

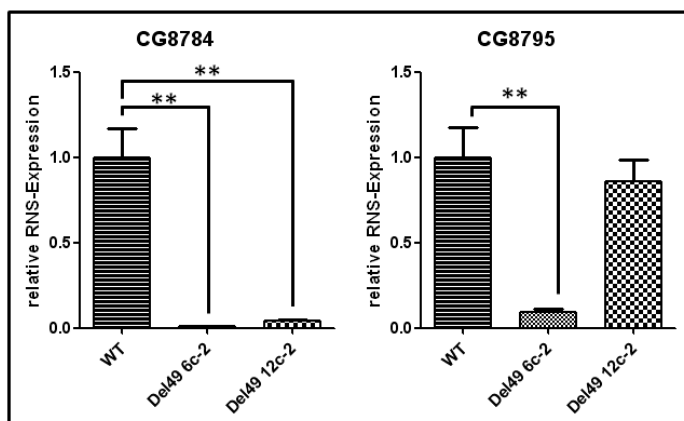
Untersuchung der Defizienzlinie Del49/TM3KrGFP auf Mutationen in flankierenden Bereichen des Rekombinationsereignisses mittels PCR-Analyse. A) Schematische Darstellung des Chromosomenabschnitts mit den Allelen PBac{WH}CG8795 und PBac{WH}CG8784. Gezeigt sind die relative Lage (schwarze angewinkelte Pfeile) und die Abstände der PCR-Fragmente DW\_A, DW\_B, DW\_C und DW\_D zu den pBac-Konstrukten. Die Rekombination wurde über die FLP-Rekombinase-Zielsequenzen (FRT) vermittelt (gestrichelte Linie). Die PBac-Konstrukte kodieren den Augenmarker *white* B) Ergebnis der PCR-Reaktionen an isolierter genomischer DNS homozygoter Tiere mit Genotyp Del49/Del49 (Del49) und einer Wildtyp-Linie (WT) als Kontrolle. Durch die Deletion des intergenen Bereichs fallen die PCR-Reaktionen DW\_B und DW\_C negativ aus. Die flankierenden Bereiche sind nicht von der Deletion betroffen. Als Marker (M) wurde der DNA-Leiter Mix verwendet, die obere dicke Bande hat eine Größe von 1000bp, die untere 500bp. UAS - *upstream activating sequence*

wurde aus 25 Embryonen die RNS extrahiert (Abbildung 4.19). Im Vergleich zur Kontrolle TM3KrGFP war die Expression von CG8784 um etwa 97% reduziert. Für CG8795 konnte keine signifikante Veränderung der Expression auf transkriptioneller Ebene festgestellt werden.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der beobachtete Phänotyp durch die Deletion des intergenen Bereichs der beiden Hugin-Rezeptoren verursacht wurde. Es wurden Kreuzungen der Linie Del49/TM3, Sb mit zwei Defizienzlinien (Df(3R)Exel6168, Df(3R)Exel8158) aus der „Exelixis“ Sammlung (Thibault et al. [2004]; Parks et al. [2004]) bzw. einer Defizienzlinie (Df(3R)ED5613) aus dem „DrosDel project“ (Ryder et al. [2004, 2007], [www.flybase.org](http://www.flybase.org)) durchgeführt. Die Defizienzlinien enthielten unterschiedlich große Deletionen, einschließlich des in dieser Arbeit erzeugten Deletionsbereichs (Abbildung 4.18 A). Transheterozygote Linien entwickelten sich in diesem Fall bis zum Adultstadium. Die Deletion war daher nicht die Ursache für den beobachteten letalen Phänotyp.

Um genomische Veränderungen im flankierenden Bereich des Hybridkonstrukts überprüfen zu können, wurden 4 PCR-Reaktionen etabliert. Die Abbildung 4.20 A) zeigt schematisch die relative Lage der erzeugten PCR-Fragmente, sowie ihren Abstand zu den „piggyBac“-Konstrukten PBac{WH}CG8784 und PBac {WH}CG8795. Aus der Linie Del49/TM3KrGFP wurden 30 homozygote Embryonen unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop selektiert und von der Eihülle befreit. Aus diesen Tieren wurde die DNS extrahiert und mittels PCR überprüft. Die Auswertung der Gelelektrophorese zeigte, dass die flankierenden Bereiche der „piggyBac“-Konstrukte nicht von der Rekombination betroffen waren und nur der intergene Bereich deletiert wurde (Abbildung 4.20 B). Als mögliche Ursache des letalen Phänotyps wurde daher eine Mutation

## 4 Ergebnisse



Quantifizierung der Expression von CG8784 und CG8795 in Embryonen (19-23 h AEL) der Defizienzlinien  $Del49^{6c-2}$  und  $Del49^{12c-2}$  mittels qPCR. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Fliegen (WT) verwendet. Die Expression dieser Linie ist auf 1 gesetzt. Gezeigt ist das Ergebnis aus drei biologischen Wiederholungen. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen T-Test durchgeführt. CG8784:  $Del49^{6c-2}$ ,  $P=0,0043$ ;  $Del49^{12c-2}$ ,  $P=0,0049$ . CG8795:  $Del49^{6c-2}$ ,  $P=0,0074$ . Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 4.21: Untersuchung der Deletionsmutanten auf Expression von CG8784 und CG8795

durch Re-Integration des ausgeschnittenen intergenen Fragments an anderer Stelle im Genom erwogen.

Das letale Allel wurde durch geeignete Kreuzungen, mittels Crossover während der Meiose, durch ein Wildtyp-Allel ausgetauscht. Das Kreuzungsschema ist in Abbildung 3.7 gezeigt. Es wurden vier homozygote Linien isoliert ( $Del49^{1c-2}$ ,  $Del49^{6c-2}$ ,  $Del49^{11c-2}$  und  $Del49^{12c-2}$ ) in denen die Deletion, durch PCR an isolierter genomischer DNS, positiv bestätigt werden konnte. Die Expression von CG8784 und CG8795 wurde in den Linien  $Del49^{6c-2}$  und  $Del49^{12c-2}$  in Embryonen 19-23 h AEL über eine qPCR untersucht (Abbildung 4.21). In der Linie  $Del49^{12c-2}$  war die Expression von CG8784, ähnlich der Ursprungslinie  $Del49$ , um 96% reduziert. In der Linie  $Del49^{6c-2}$  war die Expression von CG8784 vollständig unterdrückt und die Expression von CG8795 um etwa 91% reduziert.

Durch den Verlust des Hugin-Rezeptors CG8784 war davon auszugehen, dass eine Störung der Hugin-abhängigen neuronalen Signalkaskade in den Deletionsmutanten vorlag. Verglichen mit dem Wildtyp konnte bei den Deletionslinien allerdings kein Phänotyp im Fressverhalten festgestellt werden. Ähnliches wurde bereits durch die Blockierung der Signalweiterleitung der Hugin-Neurone untersucht. In Adulten konnte dabei eine beschleunigte Futteraufnahme festgestellt werden. Dieser Phänotyp konnte allerdings in den konstitutiv fressenden *Drosophila*-Larven nicht nachgewiesen werden (Melcher und Pankratz [2005]). Ein deutlicher Phänotyp trat allerdings bei einer Überexpression von Hugin mit der ubiquitären Tubulin-Treiberlinie  $tubP-Gal4$  auf. Larven verließen ihre Futterquelle, die Nahrungsaufnahme wurde unterbrochen und die Larven blieben deutlich kleiner (Melcher und Pankratz [2005]). Zur weiteren Untersuchung eines CG8784-abhängigen Phänotyps in den Larven wurde daher eine Überexpressionslinie von CG8784 etabliert.

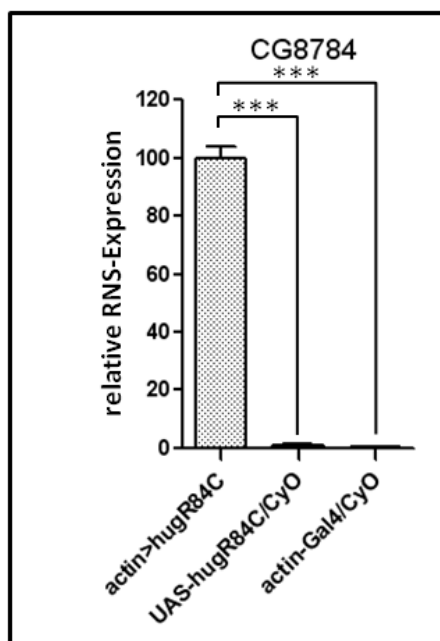
## 4.4 Die ubiquitäre Überexpression von CG8784 verursacht Entwicklungsdefekte

Aus der cDNS von Wildtyp Männchen wurde eine Überexpressionslinie von CG8784 mit der Bezeichnung UAS-hugR84C erzeugt. Für die Amplifikation der vollständigen cDNS-Sequenz wurden veränderte Primer entsprechend der Veröffentlichung von Rosenkilde et al. [2003] verwendet. Das Fragment wurde in den Überexpressionsvektor pUAST-attB kloniert und in die attP-Mutante ZH-51C injiziert. Bei allen Linien zeigte sich, dass Weibchen nur heterozygot, Männchen aber auch homozygot fertil waren. Die Linien wurden daher durch Einkreuzen des Balancers CyO stabil gehalten. Dieser kodiert für das Allel *Curly* (Cy), das als Phänotyp aufgewölbte Flügel in Adulten erkennen lässt.

Die Überexpressionslinie sollte zunächst auf ihre Funktionalität auf transkriptioneller Ebene mittels qPCR überprüft werden. Aus diesem Grund wurde CG8784, unter der Kontrolle eines Aktinpromotors, durch eine Kreuzung der Linien actin-Gal4/CyO und UAS-hugR84C, ubiquitär überexprimiert. Die verwendete Aktin-Linie war homozygot letal und wurde stabil über dem Balancer CyO gehalten. Adulte wurden 11 Tage AEL unter CO<sub>2</sub>-Gabe abgesammelt und nach Phänotyp anhand der Flügelform getrennt. Die Fliegen mit Genotyp actin-Gal4/UAS-hugR84C (actin>hugR84C) wurden auf die Überexpression von CG8784 überprüft. Fliegen der Tochtergeneration mit dem CG8784-Überexpressionskonstrukt und dem Balancer CyO (UAS-hugR84C/CyO) wurden als interne Kontrolle verwendet. Als zusätzliche Kontrolle wurde Fliegen der Linie actin-Gal4/CyO auf die endogene Expression des Rezeptors überprüft. Es fiel auf, dass sich bei einer Überexpression von CG8784 kaum Männchen aus den Eiablagen entwickelt hatten. Aus diesem Grund wurden vorwiegend Weibchen für die RNS-Extraktion und die anschließende cDNS-Synthese verwendet. Wie in Abbildung 4.22 gezeigt, konnte eine etwa 100fache Überexpression von CG8784 festgestellt werden.

Als weitere ubiquitäre Treiberlinie wurde die Tubulin-spezifische Linie tubP/serGFP verwendet. Es wurden ebenfalls Eiablagen durchgeführt und die Entwicklung der Tiere bei 25°C überprüft. Auffallend war bei dieser Kreuzung, dass Larven das Futter verließen und ein Wanderverhalten zeigten, das sonst nur in späten L3-Larven kurz vor der Verpuppung zu beobachten ist (Zinke et al. [2002]; Sokolowski [1980]; Sokolowski et al. [1984]). Eine Untersuchung der verwendeten Larven zeigte eine Verdopplung des Mundhakensatzes, woraus zudem ein möglicher Häutungsdefekt im Übergang vom zweiten zum dritten Larvenstadium geschlossen wurde.

Mit Hilfe der quantitativen PCR war ein Nachweis der Funktionalität der Überexpressionslinie möglich. Es wurde nun untersucht, ob eine lokale Überexpression von CG8784 in neuronalen Zellen durch *In situ* Hybridisierung visualisiert und damit nachgewiesen werden konnte.



Quantitative Bestimmung von CG8784 durch qPCR in Adulten 11 Tage AEL nach ubiquitärer Überexpression mittels Kreuzung der Linien UAS-hugR84C und actin-Gal4/CyO (actin>hugR84C). Als Kontrolle ist die CG8784-Expression in Nachkommen mit Balancer (UAS-hugR84C/CyO) und in der Aktin-Gal4 Linie (actin-Gal4/CyO) gezeigt. Die Linie CyO/hugR84C ist als 1 gesetzt. Statistische Auswertung von zwei biologischen Wiederholungen über einen zweiseitigen T-Test, N=7; actin>hugR84C & hugR84C/CyO, P=0,0007; actin>hugR84C & actin-Gal4/CyO, P=0,0007. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Abbildung 4.22: Untersuchung der Funktionalität der CG8784-Überexpressionslinie

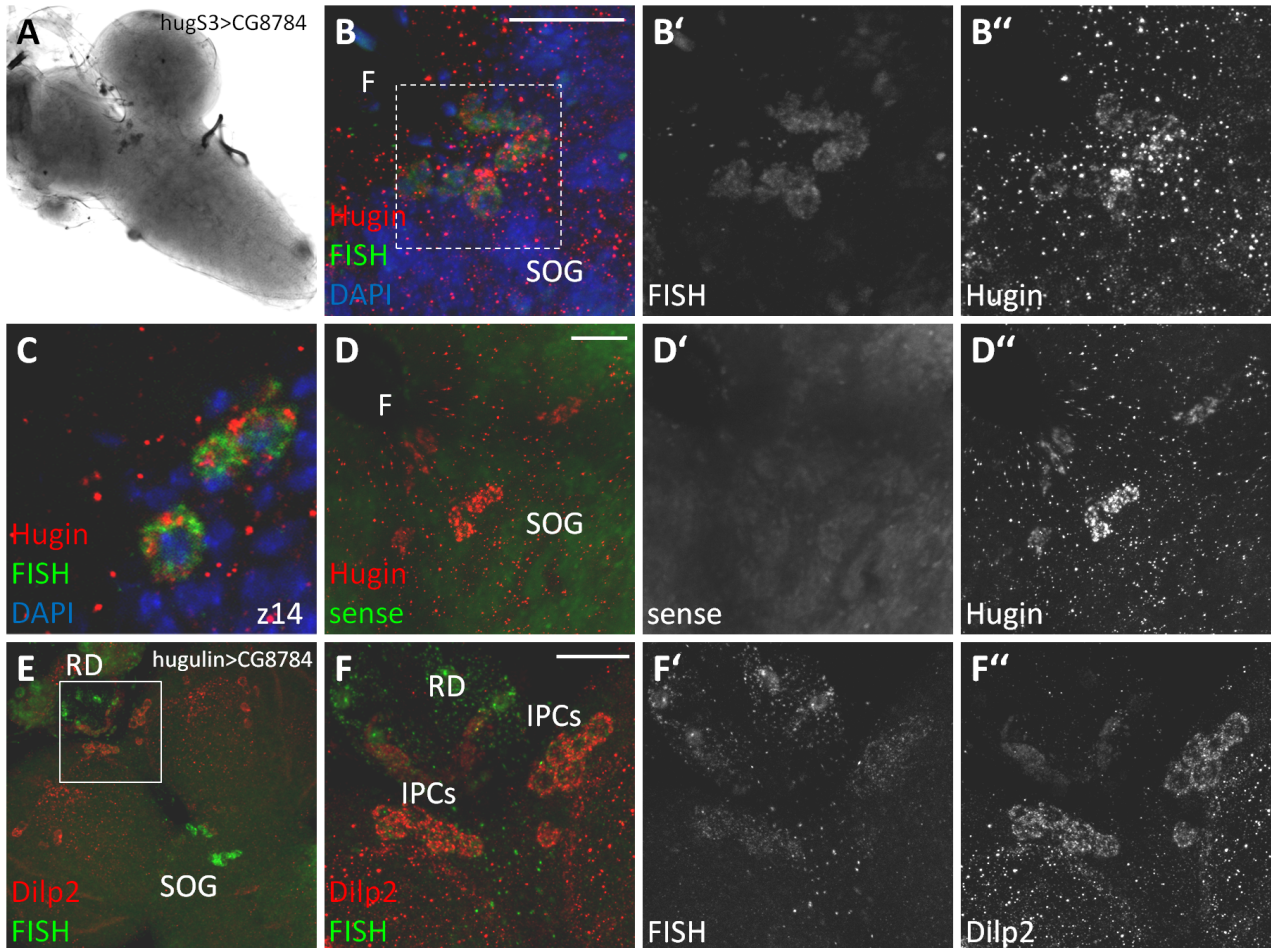
## 4.5 Überexpression von CG8784 in Hugin-Neuronen und den IPCs

Im Verlauf der Arbeit konnte eine promotorabhängige Expression von CG8784 im larvalen ZNS gezeigt werden. Verfügbare externe Daten bestätigten eine erhöhte Expression von CG8784 im Gehirn von L3-Larven (Chintapalli et al. [2007]). Das endogene Expressionsmuster von CG8784 konnte in diesem Stadium jedoch bisher nicht gezeigt werden. Es war daher anzunehmen, dass das Expressionslevel von CG8784 unterhalb der Nachweisgrenze lag. Um dies zu überprüfen, wurde CG8784 im ZNS über Treiberlinien mit bekanntem neuronalen Expressionsmuster exprimiert.

Es wurden Kreuzungen von UAS-hugR84C mit hugS3-Gal4 und mit Hugin-Gal4 auf Fliegenfutter angesetzt. In der Hugin-Treiberlinie wurde hugS3-Gal4 mit Dilp2-Gal4 in einer Fliege stabil kombiniert (Bader, unveröffentlichte Daten). Über diese Linien war eine Überexpression in den Hugin-Neuronen bzw. in den Hugin-Neuronen und in den IPCs möglich. In der Folgereneration wurden Gehirne aus Larven im dritten Entwicklungsstadium über eine *In Situ* Hybridisierung oder eine Fluoreszenz *In situ* Hybridisierung (FISH) auf eine spezifische Überexpression von CG8784 untersucht.

Mit der Hugin-Treiberlinie war die Expression von CG8784 in Zellen des SOGs erkennbar (Abbildung 4.23 A). Durch eine Doppelfärbung mittels FISH von CG8784 und einem Antikörper von Hugin konnte gezeigt werden, dass die Expression spezifisch auf die Hugin-positiven Zellen

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.23: Untersuchung der lokalen Überexpression von CG8784 durch *In Situ* Hybridisierung**

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Larvengehirnen. A-D'') Spezifische Überexpression von CG8784 mit der Hugin-Promotorlinie hugS3-Gal4. A) Die Histochemische *In situ* Hybridisierung zeigt eine Färbung unterhalb des Foramens im Suboesophagialganglion (SOG). B-C) Die Fluoreszenz *In situ* Hybridisierung (FISH) von CG8784 (B, C grün) mit immunhistochemischer Färbung von Hugin (B, C rot) zeigt die spezifische Überexpression in den Hugin-Zellen im SOG. Zellkerne sind mit DAPI (B, C blau) gefärbt. C) In der optischen Schnittebene 14 (z14) des markierten Bereichs in B) ist die Kolo-kalisation mit Hugin im Cytoplasma erkennbar. D-D'') Die Doppelfärbung mit einem Hugin-Antikörper und einer Kontroll-Sonde (sense) zeigt keine Färbung von CG8784 in den Hugin-Zellkernen. E-F'') Spezifische Überexpression von CG8784 mittels einer kombinierten Promotorlinie von Dilp2 und Hugin (Hugulin). E) Die FISH (grün) zeigt neben der Expression in den Hugin-Zellen eine Überexpression von CG8784 in den Insulin-produzierenden Zellen (IPCs). F-F'') Eine Kolo-kalisation mit Dilp2 (rot) ist in der Vergrößerung von E zu erkennen. Die Überexpression in den IPCs ist schwächer als in den Hugin-Zellen. Als Primärantikörper wurden sh  $\alpha$ -Dig AP (A), sh  $\alpha$ -Dig POD (B-B', C-D', E-F'), rb  $\alpha$ -hug (B, B'', C-D, D'') und gp  $\alpha$ -Dilp2 (E-F, F'') verwendet. Als Sonde wurde shugRIII in sense bzw. antisense-Orientierung verwendet. Der Maßstab entspricht 50  $\mu$ m.

beschränkt war (Abbildung 4.23 B-B’). Die zusätzliche Färbung mit dem DNS-Marker DAPI (blau) ließ erkennen, dass die Sonden-Hybridisierung im Cytoplasma und nicht im Zellkern stattgefunden hatte (Abbildung 4.23 C). Durch Verwendung einer sense-Sonde als Negativkontrolle war keine Hybridisierung in den Hugin-Zellen erkennbar (Abbildung 4.23 D-D’).

Für nachfolgende Experimente wurde zusätzlich überprüft, ob eine Überexpression von CG8784 in den IPCs möglich und nachweisbar war. Zu diesem Zweck wurde die Überexpressionslinie UAS-hugR84C mit der Treiberlinie Hugin-Gal4 gekreuzt. Die Expression in den Hugin-Zellen wurde als interne Kontrolle der FISH genutzt. In Aufnahmen des larvalen Gehirns war die Expression von CG8784 sowohl im PC als auch in den Hugin-Zellen im SOG erkennbar (Abbildung 4.23, E). Durch eine immunhistochemische Färbung von Dilp2 in Kombination einer FISH von CG8784 konnte die ektopische Expression von CG8784 in den IPCs visualisiert werden (Abbildung 4.23 E, F-F’).

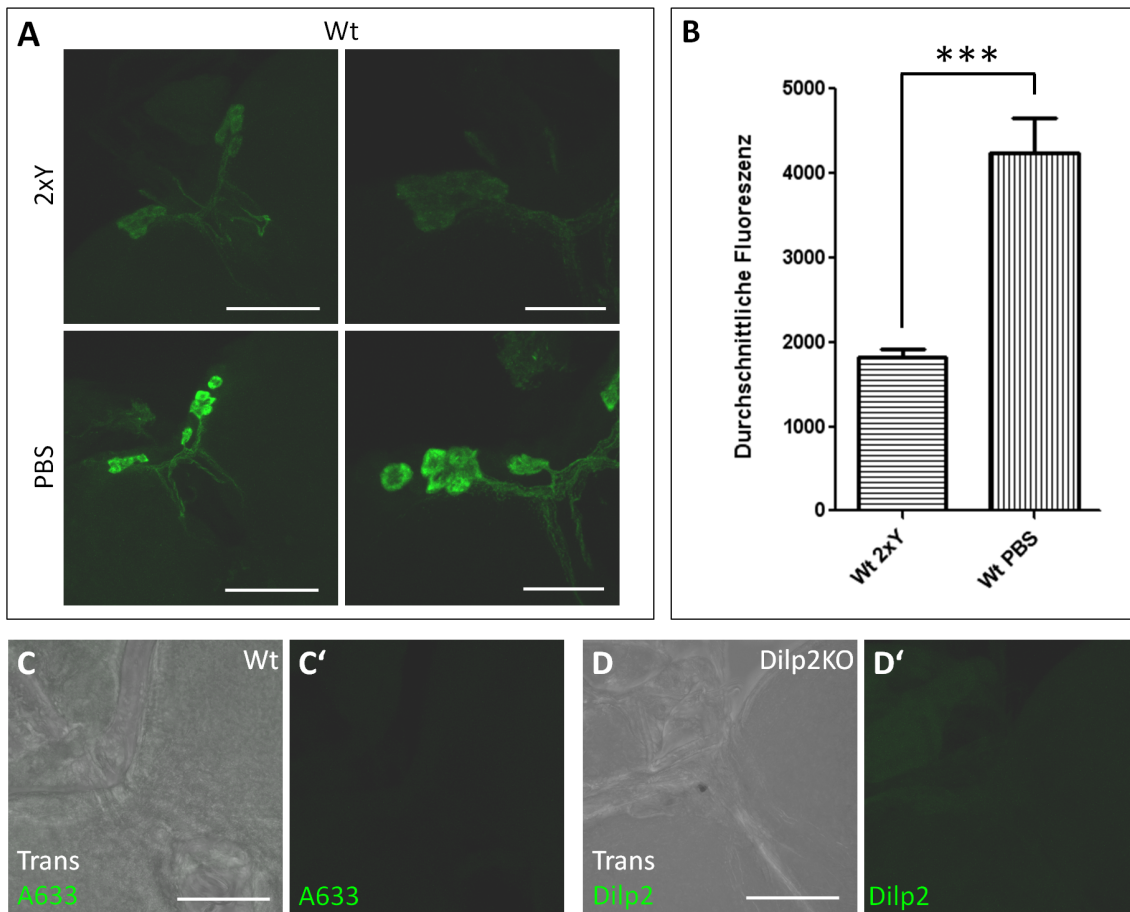
GRASP-Experimente, die im Verlauf der Arbeit durchgeführt wurden, hatten eine direkte Verbindung der Hugin-Neurone mit den Dilp2-positiven neurosekretorischen Zellen erkennen lassen. Mittels der Promotorlinie hugR84.6-Gal4 konnte zudem eine starke Expression des Hugin-Rezeptors CG8784 in den IPCs gezeigt werden. Daraus wurde auf eine rezeptorabhängige Aktivierung der Hugin-Signalkaskade in den IPCs geschlossen, deren Funktion durch eine spezifische Überexpression von CG8784 näher untersucht wurde.

### 4.6 CG8784-Überexpression in den IPCs beeinflusst die Dilp2-Konzentration

Die Expression des Neuromedin U-Rezeptors 1 (NMU1R), einem Homolog von CG8784, konnte im Pankreas von Säugetieren nachgewiesen werden (Funes et al. [2002]; Howard et al. [2000]; Raddatz et al. [2000]; Kaczmarek et al. [2006]). Durch *In vitro* Untersuchungen an isolierten Langerhans-Inseln konnte gezeigt werden, dass der NMU1R-Ligand Neuromedin U (NmU) indirekt die Sekretion von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen beeinflusst (Kaczmarek et al. [2006, 2009]). In *Drosophila* werden im Larvenstadium die Insulin-Homologe Dilp2, 3 und 5 in den IPCs gebildet. Für Dilp3 und 5 konnte gezeigt werden, dass diese auf Transkriptionsebene nahrungsabhängig reguliert sind. Für Dilp2 konnte dagegen keine transkriptionelle Veränderung festgestellt werden (Brogiolo et al. [2001]; Géminard et al. [2009]; Ikeya et al. [2002]). Durch immunhistochemische Färbungen konnte allerdings gezeigt werden, dass Dilp2 bei proteinarmer Ernährung und unter Hungerbedingungen in den IPCs akkumuliert wird. Bei proteinreicher Ernährung nimmt dagegen die Konzentration von Dilp2 in den IPCs ab. Dies wurde auf eine Sekretion von Dilp2 zurückgeführt, was eine erhöhte Signalkaskade der Insulin und Insulin-ähnlichen Wach-

## 4 Ergebnisse

tumsfaktoren (IIS) zur Folge hat (Géminard et al. [2009]).



### Abbildung 4.24: Nahrungsabhängige Veränderung der Dilp2-Konzentration in den IPCs

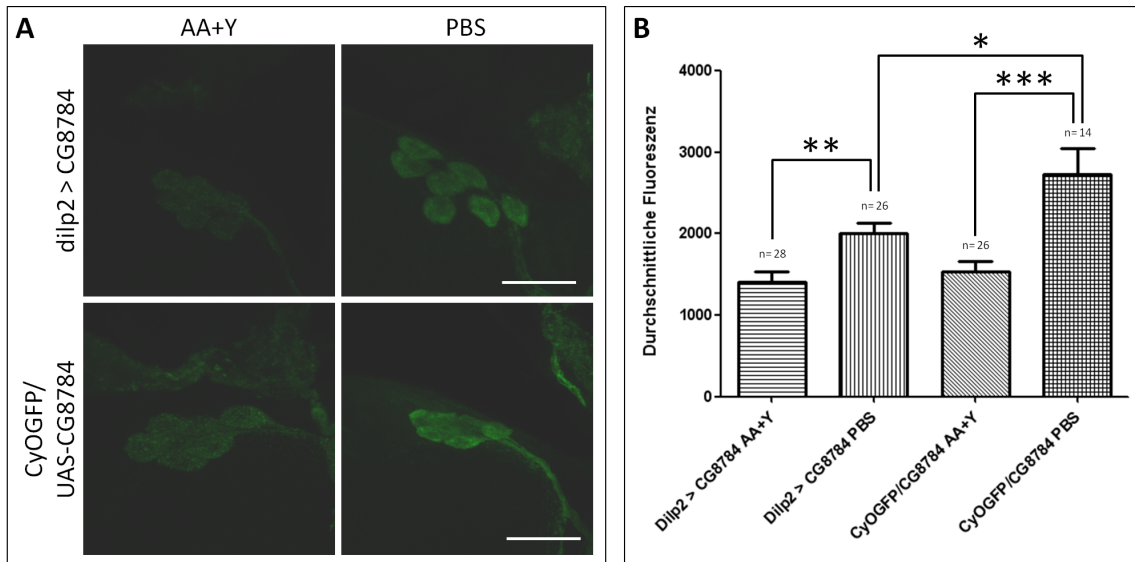
Analyse der Dilp2-Konzentration in Gehirnen von Wildtyp-Larven (Wt) 96 +/- 2 h AEL unter verschiedenen Futterbedingungen. Die Tiere wurden für 22 h entweder auf Hungermedium (PBS) oder auf Fliegenfutter mit erhöhter Hefekonzentration (AA+Y) gehalten. A) Immunhistochemische Färbung von Dilp2 in den Insulin-produzierenden Zellen (IPC). Gezeigt sind die 14 IPCs des Protocerebrums (links) und ein Zellcluster von 7 IPCs (rechts). B) Quantitative Auswertung der Antikörper-Fluoreszenz in den IPCs, N=12. Der Test auf Gauß'sche Normalverteilung mit D'Agostino und Pearson war positiv. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem T-Test bestimmt:  $P < 0.0001$ . Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. C-D) Kontrolle der Antikörperspezifität durch Färbung der IPCs nur dem Sekundärantikörper  $\alpha$ -gp A633 (C) oder im Dilp2-KO Hintergrund mit Primär- und Sekundärantikörper. Trans - Durchlichtkanal. Als Primärantikörper wurde in allen Aufnahmen gp  $\alpha$ -Dilp2 verwendet. Der Maßstabsbalken in A) (links), C) und D) entspricht  $50\mu\text{m}$ , in A) (rechts)  $20\mu\text{m}$ .

Die nahrungsabhängige Veränderung der Dilp2-Konzentration in den IPCs wurde mit einem im Labor vorhandenen Dilp2-Antikörper an Larven einer Wildtyp-Linie überprüft. Die Tiere wurden 72 +/- 2 h AEL für 22 h entweder auf Fliegenfutter mit erhöhter Hefekonzentration, oder auf PBS-Agar mit 1% Saccharose als Hungermedium überführt. Wie in Abbildung 4.24 (A) gezeigt, war die Dilp2-Expression in den IPCs unter Hungerbedingungen deutlich stärker als bei proteinreicher Ernährung. Durch eine quantitative Analyse der Fluoreszenz in den IPC-Zellclustern (Abbildung 4.24 B) ließ sich eine Reduktion der Dilp2-Konzentration um 57 % erkennen. Da-



## 4 Ergebnisse

mit konnte bestätigt werden, dass in gefütterten Wildtyp-Larven eine erhöhte Sekretion von Dilp2 stattgefunden hatte und folglich die IIS im Gesamtorganismus erhöht war (Abbildung 4.26, Wildtyp) . Um bei diesen immunhistochemischen Färbungen eine Fluoreszenzdetektion

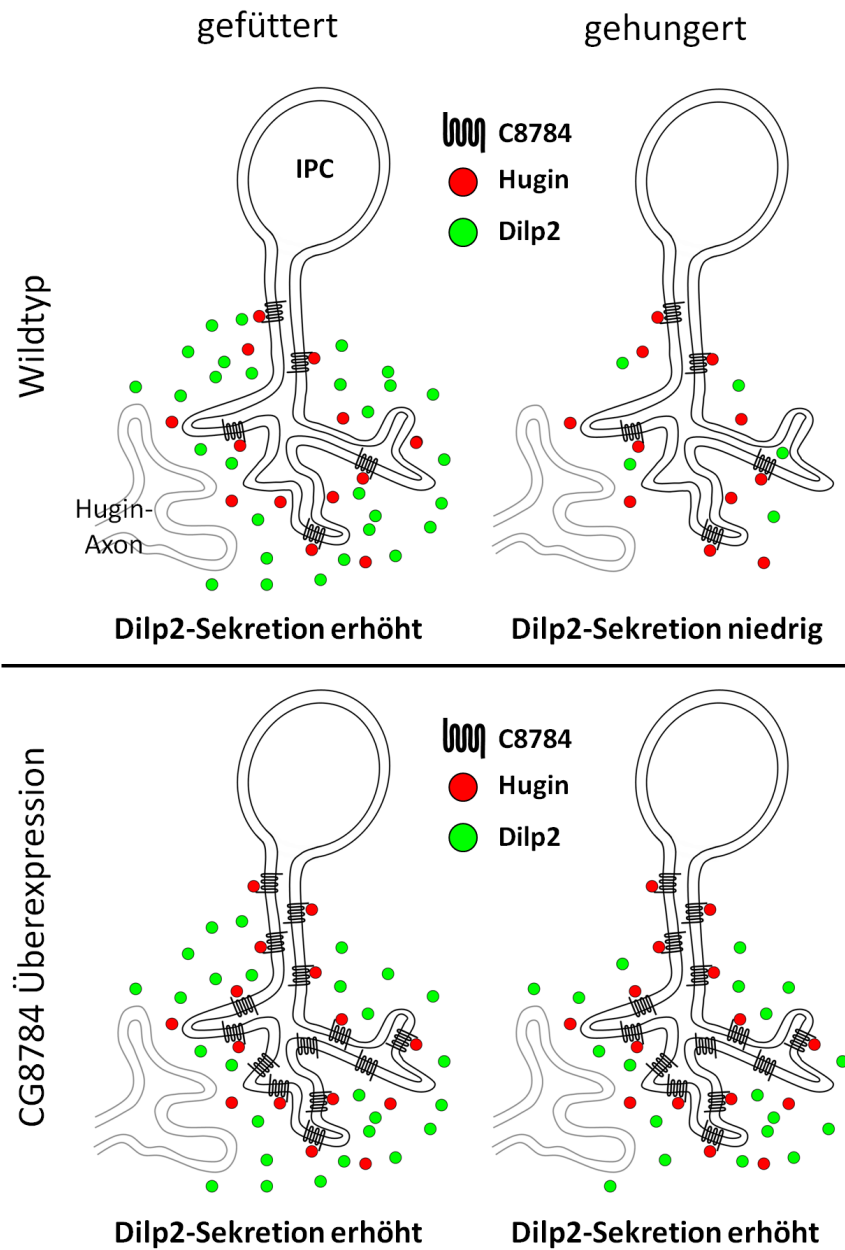


### Abbildung 4.25: Die Überexpression von CG8784 in den Insulin-produzierenden Zellen

Untersuchung der Dilp2-Konzentration in den IPCs mit Überexpression von CG8784 mittels Kreuzung der Dilp2-Gal4/CyO<sub>twist</sub>GFP und UAS-hugR84C (Dilp2>CG8784). Larvengehirne wurden 96 +/- 2 h AEL präpariert, nachdem die Tiere für 22 h mit Hungermedium (PBS) oder proteinreichem Nährmedium (AA+Y) gefüttert wurden. A) Immunhistochemische Färbung von Dilp2 in den IPCs. Als Kontrolle wurden Tiere mit Genotyp CyO<sub>twist</sub>GFP/UAS-hugR84C (CyOGFP/CG8784) verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm. B) Quantitative Auswertung der Dilp2-Konzentration in den IPCs. Der Test auf Gauß'sche Normalverteilung mit D'Agostino und Pearson war positiv. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem T-Test überprüft: Dilp2>CG8784 AA+Y und PBS, P=0.0014; CyOGFP/CG8784 AA+Y und PBS, P=0.0003; Dilp2>CG8784 und CyOGFP/CG8784, PBS P=0.0173. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

aufgrund unspezifisch-gebundener Antikörper ausschließen zu können wurden Larvengehirne einer Dilp2-Knockout Mutante mit den spezifischen Primär- und Sekundärantikörpern gefärbt (Abbildung 4.24 D-D'). Als zusätzliche Kontrolle wurden Gehirne aus Wildtyp-Fliegen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Abbildung 4.24 C-C'). Bei keiner der Kontrollen war eine Immunfluoreszenz in den IPCs erkennbar.

Im Folgenden wurde ein möglicher Einfluss der Hugin-Signalkaskade auf die nahrungsabhängige Sekretion der Dilps durch immunhistochemische Färbungen von Dilp2 untersucht. Durch eine Kreuzung der Linien Dilp2-Gal4/CyO<sub>twist</sub>GFP und UAS-hugR84C wurde in Nachkommen des Genotyps Dilp2-Gal4/UAS-hugR84C eine erhöhte Expression von CG8784 induziert. Als Kontrollgruppe wurden Tiere mit dem Genotyp CyO<sub>twist</sub>GFP/UAS-hugR84C verwendet. Die Tiere wurden für 22 h auf einer proteinreichen Nahrungsquellen, einer Apfelagarplatte mit Hefe (AA+Y), gehalten oder auf PBS mit 1% Saccharose gehungert.



**Abbildung 4.26: Einfluss der CG8784-vermittelten Hugin-Signalkaskade auf die Dilp2-Sekretion**  
 Schematische Darstellung der CG8784-vermittelten Modulation der Dilp2-Sekretion aus einer Insulin-produzierenden Zelle (IPC) unter verschiedenen Nahrungsbedingungen. In gefütterten Wildtyp-Larven ist die Dilp2-Sekretion erhöht in gehungerten Larven dagegen niedrig. Durch die Überexpression von CG8784 wird eine erhöhte Hugin-Signalkaskade in den IPCs induziert, was zu einer gesteigerten Dilp2-Sekretion führt. In gefütterten Tieren ist dagegen keine Steigerung der Dilp2-Sekretion erkennbar.

#### 4 Ergebnisse

Bei beiden Gruppen war in den IPCs eine niedrige Dilp2-Konzentration in den IPCs erkennbar, wenn die Tiere mit einem proteinreichen Nährmedium gefüttert wurden (Abbildung 4.25 A). Dies war auf eine erhöhte Sekretion von Dilp2 zurückzuführen. In gehungerten Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich eine erhöhte Dilp-Konzentration in den IPCs. In gehungerten Tieren mit einer Überexpression von CG8784 war die Fluoreszenz dagegen kaum erhöht (Abbildung 4.25 A). Durch die quantitative Auswertung war in gehungerten Tieren der Kontrollgruppe eine um etwa 44% höhere Dilp2-Konzentration erkennbar. Dagegen zeigte sich in Tieren mit CG8784-Überexpression lediglich eine Erhöhung der Dilp2-Konzentration um etwa 30% (Abbildung 4.25 B). Es war daher anzunehmen, dass durch die Überexpression von CG8784 eine erhöhte Hugin-Signalkaskade in den IPCs induziert wurde, die eine Sekretion von Dilp2 und damit eine erhöhte IIS in den gehungerten Larven zur Folge hatte (Abbildung 4.26, CG8784 Überexpression).



## 5 Diskussion

Nahrungsaufnahme und nahrungsabhängige Verhaltensweisen werden im zentralen Nervensystem durch die Kommunikation verschiedener neuronaler Netzwerke reguliert. Dabei spielt die Aufnahme und Verarbeitung interner metabolischer und externer chemosensorischer Informationen eine bedeutende Rolle. Olfaktorische Stimuli ermöglichen das Finden potentieller Nahrungsquellen über eine größere Distanz. Durch gustatorische Informationen werden dem Organismus Informationen über den Nährstoffgehalt und die Bekömmlichkeit der Nahrungsquelle zugänglich. Diese werden mit Informationen über den energetischen Zustand des Organismus abgeglichen und führen zu angepassten Verhaltensmustern der Nahrungssuche, -aufnahme oder -ablehnung. Über die Zusammenhänge zwischen neuronalen Netzwerken, die einerseits an der Verarbeitung externer gustatorischer und andererseits an der Aufnahme und Regulation interner metabolischer Signale beteiligt sind, ist in *Drosophila* bisher nur wenig bekannt. Grundlegend für das Verständnis dieser Netzwerke war es die Anatomie der einzelnen beteiligten neuronalen Subpopulationen mit Hilfe geeigneter Marker aufzuklären. Die Zusammenführung der einzelnen Komponenten durch Untersuchung ihrer Konnektivität bietet die Möglichkeit die Vernetzung zu einem neuronalen Schaltkreis zu zeigen und die Funktionen einzelner Komponenten in diesem Schaltkreis zu entschlüsseln.

Einen guten Ansatz bietet die weiterführende Untersuchung des nahrungsabhängigen Hugin-Schaltkreises, der an der Steuerung des Fressverhaltens in *Drosophila* beteiligt ist. Er birgt durch sein Projektionsmuster das Potential metabolischer und gustatorische Signale zu integrieren und zu modifizieren (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a]; Melcher et al. [2007]). Im Rahmen der Aufklärung von Zielzellen der Hugin-Neurone sollte in dieser Arbeit die räumliche Expression der zwei möglichen Hugin-Rezeptoren CG8795 und CG8784, mit Hilfe promotorspezifischer Treiberlinien, untersucht werden. In Abhängigkeit von der Orientierung und dem verwendeten Expressionsvektor ließen sich zwei unterschiedliche Expressionsmuster erkennen, die jeweils einem der Rezeptoren zugeordnet werden konnten. Das Expressionsmuster von CG8795 zeigte sich in einer spezifischen Subpopulation der Hugin-Neurone. Das Expressionsmuster des Rezeptors CG8784 markierte eine Vielzahl von Neuronen in verschiedenen Bereichen innerhalb und außerhalb des zentralen Nervensystems. Diese weisen auf mögliche Zielzellen der Hugin-Neurone hin, die mit der Nahrungssuche und -aufnahme und der Verarbeitung von nährstoffabhängigen Informationen in Verbindung stehen.

Von besonderem Interesse war die Expression von CG8784 in den Insulin-produzierenden Zellen des *Pars Intercerebralis*. Insulin ist einerseits an der Regulation des Fressverhaltens und andererseits an der Anpassung des Metabolismus an den Ernährungszustand beteiligt (Porte et al.

[2005]; Wu et al. [2005]). Es konnte im Verlauf der Arbeit gezeigt werden, dass bestimmte Hugin-Neurone direkt mit den Insulin-produzierenden Zellen in Verbindung stehen. Durch die gezielte Überexpression von CG8784 konnte, unter Hungerbedingungen, eine verringerte Konzentration des Insulin-Homologs *Drosophila Insulin-like peptide* Dilp2 in den Insulin-produzierenden Zellen gezeigt werden. Daraus wurde auf eine erhöhte Freisetzung von Dilp2 und eine erhöhte Insulin-Signalkaskade geschlossen. Die Untersuchung der Rezeptoren ermöglichte den potentiellen Einfluss einer Hugin-abhängigen Signalkaskade auf die Energiehomöostase, in Abhängigkeit vom Ernährungszustand, zu analysieren.

## 5.1 Expressionsmuster von CG8795 und CG8784

Das Gen *hugin* kodiert für ein Präpropeptid, das in zwei Neuropeptide, Pyrokinin-2 (PK-2) und Hugin $\gamma$ , gespalten wird (Meng et al. [2002]). *In vitro* Untersuchungen an ektopisch exprimierten Rezeptoren haben gezeigt, dass diese beiden Spaltprodukte zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), CG8795 und CG8784, mit hoher Spezifität aktivieren (Park et al. [2002]; Rosenkilde et al. [2003]). Die räumliche und zeitliche Expression der beiden potentiellen Hugin-Rezeptoren wurde durch *Microarray*-Analysen gezeigt (Chintapalli et al. [2007]; Graveley et al. [2011]), ein zellspezifisches Expressionsmuster der beiden Rezeptoren war bislang allerdings unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Expressionsmuster von CG8795 und CG8784 in Larven von *Drosophila melanogaster* beschrieben.

Die kodierenden Sequenzen der beiden paralogen Rezeptoren liegen tandemartig auf dem dritten Chromosom und werden entgegengesetzt transkribiert (Hewes und Taghert [2001]). Sie schließen einen Genabschnitt ein, in dem genregulatorische Sequenzen für die Transkription beider Rezeptoren vermutet wurden. Dieser Bereich wurde zur Erzeugung von Treiberlinien genutzt, mittels derer die Expressionsmuster der beiden potentiellen Hugin-Rezeptoren im zentralen Nervensystem (ZNS) bzw. in der Peripherie visualisiert werden konnten.

Das Expressionsmuster von CG8795 konnte in 16 der insgesamt 20 Hugin-Neurone nachgewiesen werden die das Protocerebrum (PC), eine Muskelgruppe der cephalopharyngealen Muskulatur (CPM) und die Ringdrüse (RD) innervieren. Die fehlenden vier Zellen konnten Hugin-Neuronen zugeordnet werden, deren Projektionen in das ventrale Nervensystem (VNS) führen. Dies deutet auf eine CG8795-vermittelte autokrine bzw. parakrine Funktion von Hugin auf die Subpopulation der 16 Hugin-Neurone hin. Die Expression von CG8784 war nicht auf das SOG beschränkt und konnte in verschiedenen Bereichen des ZNS und in der Peripherie nachgewiesen werden, die in Zielregionen der Hugin-Projektionen liegen.

Durch die Deletion der genregulatorischen Region konnte eine transgene Fliegenlinie mit einer

Null-Mutation von CG8784 generiert werden. Diese Linie ist ein wichtiges Werkzeug, um die Funktion des Hugin-Rezeptors CG8784 aufzuklären.

## 5.2 Hinweis auf eine Hugin-abhängige Regulation der larvalen Fortbewegung durch CG8784

Die 20 Hugin-Neurone werden in vier Subpopulationen unterteilt, die sich in ihren primären Projektionszielen unterscheiden (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a]). Mit Hilfe eines alternativen Promotorkonstrukts von Hugin, das einen verkürzten Promotorabschnitt enthält, konnte eine Promotorlinie generiert werden, bei der ebenfalls spezifisch die vier Hugin-Neurone fehlen, deren Projektionen in das VNS führen (Diplomarbeit, unveröffentlichte Daten). Dies war ein Hinweis auf eine unabhängige Regulation der Hugin-Expression in diesen vier Zellen im SOG. Die vorhandenen Daten deuten darauf hin, dass diese Subpopulation der Hugin-Neurone folglich nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell von den übrigen Hugin-Neuronen unterschieden werden kann. Diese Funktion wurde mit Hilfe der CG8784-Promotorlinie untersucht.

Ausgehend vom VNS konnten CG8784-positive Projektionsbahnen identifiziert werden, die direkt mit der Körperwandmuskulatur in den Thorakal- und Abdominalsegmenten in Verbindung stehen. Durch die CG8784-abhängige ektopische Expression von GCamP3 (Tian et al. [2009]) wurde ein optisches Verfahren angewendet, um die neuronale Aktivität im VNS räumlich und zeitlich untersuchen zu können. Dabei zeigte sich entlang des Neuropils ein sich wellenförmig ausbreitendes  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Muster, das von der Spitze des VNS in Richtung SOG und umgekehrt verfolgt werden konnte.

Bei der Fortwärtsbewegung von Larven kontrahieren die Muskeln der einzelnen Körpersegmente von posterior nach anterior in einem peristaltischen Muster. Elektrophysiologische Untersuchungen an den segmentalen Projektionsbahnen des VNS haben gezeigt, dass den Muskelkontraktionen eine Zunahme der neuronalen Aktivität vorausging, die sich wellenförmig anteriorwärts über das Neuropil ausbreitet (Fox et al. [2006]). Es ist daher anzunehmen, dass CG8784 in Motoneuronen exprimiert ist, die an der Regulation der larvalen Fortbewegung beteiligt sind. Zur Bestätigung der Identität der CG8784-Neurone als Motoneurone, könnten diese in weiterführenden Experimenten, auf eine Kollokalisierung mit dem vesikulären Glutamat-Transporter VGlut mittels Antikörperfärbung untersucht werden. VGlut markiert glutamaterge Neurone, zu denen in *Drosophila*, neben glutamatergen Interneuronen, die Motoneurone gehören (Mahr und Aberle [2006]).

Larven verbleiben in der Zeit ihrer Entwicklungsphase in oder auf ihrer Futterquelle. Erst in einer späten Phase des dritten Entwicklungsstadiums stellen sie das Fressen ein und verlassen das Futter, bevor sie sich verpuppen (Zinke et al. [2002]; Sokolowski et al. [1984]). Larven der Fressmutanten *pumpless* und *klumpfuss* entfernen sich bereits frühzeitig von ihrer Nahrungsquelle. In diesen Mutanten konnte eine erhöhte Expression von Hugin festgestellt werden (Zinke et al. [1999]; Melcher und Pankratz [2005]). Ein vergleichbarer Phänotyp zeigte sich durch die ubiquitäre Überexpression von Hugin (Melcher und Pankratz [2005]). Daraus konnte abgeleitet werden, dass Hugin über die Projektionen in das VNS, mittels CG8784, einen Einfluss auf die Fortbewegung der Larven hat. Dies bestärkt die Annahme, dass Hugin an der Entscheidung beteiligt ist, auf einer bestimmten Futterquelle zu bleiben oder aber diese zu meiden und sich von ihr zu entfernen.

### 5.3 Potentieller Einfluss von Hugin auf das Verdauungssystem aufgrund der CG8784-Expression

Die muskelstimulatorische Funktion des Hugin-Spaltprodukts PK-2 konnte in Kakerlaken und in *Drosophila*, hier speziell am Herzen, nachgewiesen werden (Meng et al. [2002]). Daher ist es nicht verwunderlich, dass entlang der Aorta, einem Teil des larvalen Herzens, eine starke Expression des Hugin-Rezeptors mit Hilfe der CG8784-Promotorlinie detektiert werden konnte. In der Publikation von Johnstone und Cooper [2006] wurde gezeigt, dass Motoneurone die Aorta innervieren. Die Gruppe vermutet, dass durch Kontraktion der Aorta ein Blutfluss zum Kopfbereich erhöht und damit eine verbesserte Versorgung der Muskulatur zur Nahrungsaufnahme gewährleistet ist (Johnstone und Cooper [2006]).

Verschiedene Gruppen von Motoneuronen im SOG projizieren über den Antennalnerv (AN), den Maxillarnerv (MN) und den akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) anteriorwärts und innervieren den Muskelapparat, der mit dem Cephalopharyngealen Skelett (CPS) assoziiert ist, die cephalopharyngeale Muskulatur (CPM). Elektrophysiologische Untersuchungen an diesen drei Nerven wiesen auf ein rhythmisches Aktivitätsmuster hin und ließen Rückschlüsse auf ein fiktives Fressverhalten zu (Schoofs et al. [2010]). Eine der Hugin-Projektionen endet im Bereich des CPS (Melcher und Pankratz [2005]; Bader et al. [2007a]). Erste Untersuchungen zeigen, dass diese Projektion über den PaN anteriorwärts führen und es wurde angenommen, dass sie eine Muskelgruppe der CPM innervieren (Bader, R. und Schoofs, A., persönliche Kommunikation). Ein Nachweis des Hugin-Rezeptors konnte in der CPM jedoch nicht gezeigt werden und lässt vermuten, dass CG8784 nicht in der Muskulatur direkt exprimiert wird, sondern nur in Motoneuronen zu finden ist, die mit der CPM assoziiert sind.



## 5 Diskussion

Die ektopische Expression eines Temperatur-abhängigen Ionenkanals in den Hugin-Neuronen ermöglichte eine wärmerregulierte Aktivierung und es konnte eine Modulation des motorischen Musters im AN gemessen werden. Dies ließ auf einen Effekt der Hugin-Neurone auf die Muskulatur zur Nahrungsaufnahme schließen (Schoofs, A., unveröffentlichte Daten). Die Expression von CG8784 konnte mit Hilfe der Promotorkonstrukte im AN und MN nachgewiesen werden, über die CG8784-positive GRNs mit dem SOG in Verbindung stehen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass CG8784-positive Neuronen, ausgehend vom SOG, die CPM innervieren, weil efferente Neurone auch durch diese Nerven verlaufen. Vergleichbar mit der Innervierung der Muskulatur des Fortbewegungsapparats durch CG8784-Neurone, erfolgt in diesem Fall die modulatorische Funktion von Hugin auf die Muskelaktivität des Kauapparats nicht direkt, sondern indirekt über CG8784-positive Motoneurone im SOG. Durch die ektopische Expression eines stabilen, photoaktivierbaren GFPs (PAGFP) in den CG8784-Neuronen wäre es möglich die efferenten Neuriten zu identifizieren. Durch eine Laser-abhängige Aktivierung nimmt die Fluoreszenz des PAGFPs lokal um das etwa 100fache zu und könnte durch Diffusion bis zu den Zellkörpern im SOG zurückverfolgt werden (Murray und Saint [2007]).

Die CG8784-Homologen NMU1R und NMU2R konnten in Mammalia in verschiedenen Bereichen des Darms nachgewiesen werden (Fujii et al. [2000]; Shan et al. [2000]; Szekeres et al. [2000]; Raddatz et al. [2000]). In Darmpräparaten von Mäusen konnte ein nervöser Effekt auf die Darmperistaltik gezeigt werden, der durch NmU und NMU1R vermittelt wurde (Dass et al. [2007]). Mit Hilfe der promotorspezifischen Treiberlinie war eine Expression von CG8784 in einem Teil des Mitteldarms erkennbar. Zusätzlich ließ sich bei der anatomischen Untersuchung der pharyngealen Nerven eine Expression im Rekurrenten Nerv feststellen. Dieser ist Teil des Stomatogastrischen Nervensystems, der eine Verbindung des ZNS mit dem Oesophagus, dem Proventrikulus und dem anterioren Mitteldarm herstellt (Spiess et al. [2008]; Neckameyer und Bhatt [2012]). Es war daher anzunehmen, dass Hugin nervös auf die glatte Muskulatur des Verdauungssystems wirkt und damit nicht nur die Nahrungsaufnahme, sondern auch den Nahrungstransport beeinflusst.

## 5.4 Kontakt der Hugin-Neurone mit gustatorischen GR66a-Rezeptorneuronen

Wie kann ein Organismus entscheiden, ob eine Futterquelle schmackhaft ist und den benötigten Energiebedarf abdeckt oder möglicherweise schadhafte Substanzen enthält? Die Aufnahme dieser Informationen erfolgt primär über das gustatorische System, das über die Verbindungen im ZNS eine der wichtigsten Funktionen aller tierischen Organismen reguliert, die Essenaufnahme. Es ist daher nicht verwunderlich, dass dieses System im Tierreich vergleichbar organisiert ist.

*Despite the fact that vertebrates and insects have independently evolved distinct anatomic and molecular pathways for taste sensation, there are clear parallels in the organization and coding logic between the two systems. There is now persuasive evidence that tastant quality is mediated by labeled lines, whereby distinct and strictly segregated populations of taste receptor cells encode each of the taste qualities (Yarmolinsky et al. [2009]).*

Zwei Kategorien der Geschmackswahrnehmung sind süß und bitter, die auf den Organismus attraktiv bzw. abstoßend wirken und zu entsprechenden Verhaltensweisen führen (Zhao et al. [2003]; Mueller et al. [2005]; Wang et al. [2004]; Thorne et al. [2004]; Marella et al. [2006]; Chyb et al. [2003]). Sie sind sowohl in Mammalia als auch in *Drosophila* auf zwei unterschiedliche Subpopulationen von gustatorischen Rezeptorneuronen (GRNs) festgelegt (Chandrashekar et al. [2006]; Colomb et al. [2007]; Kwon et al. [2011]; Wang et al. [2004]; Thorne et al. [2004]). Als Marker für Rezeptorneurone, die süße, wohlschmeckende Nahrung wahrnehmen, wurde in *Drosophila* der Trehaloserezeptor GR5a identifiziert (Thorne et al. [2004]; Wang et al. [2004]). Die meisten GRs sind allerdings in bitter-rezeptiven Neuronen zu finden und in *Drosophila* mit dem Koffein-Rezeptor GR66a kolokalisiert (Moon et al. [2006]; Thorne et al. [2004]; Wang et al. [2004]). Unklar ist jedoch, wie diese Subpopulationen verschaltet sind, um die gegensätzlichen Verhaltensweisen auszulösen.

Entsprechend ihrer Identität und Lokalisation führen axonale Projektionen der GRNs in verschiedene Areale des SOGs, woraus eine topographische Karte im SOG abgeleitet werden konnte. GR66a-positive Neurone projizieren in einen zentralen Bereich des SOGs (Kwon et al. [2011]; Colomb et al. [2007]), in welchem ein direkter Kontakt mit den Hugin-Neuronen nachgewiesen werden konnte. Die Kontaktaufnahme der Hugin-Neurone mit den GR66a-positiven Zellen erfolgt dabei über glomerulär geformte Dendriten dorsoventral des Foramens im SOG, in einem Bereich, den man, aufgrund seiner embryonalen Herkunft, auch als larvales Tritocerebrum be-

zeichnet (Hirth et al. [2001]; Bader et al. [2007a]).

Die Ausformung von synaptischen Glomeruli zur Weiterleitung sensorischer Informationen, konnte in Insekten und in Mammalia nachgewiesen werden (Steiger [1967]) und ist bislang für das chemosensorische System speziell bei der Weiterleitung olfaktorischer Informationen beschrieben (Vosshall und Stocker [2007]; Gerber et al. [2009]). Es ist möglich, dass über die hier gezeigten glomerulären Strukturen synaptische Kontakte der GR66a-positiven GRNs mit den Hugin-Neuronen bestehen. Dies legt nahe, dass die Hugin-Neurone an der Verarbeitung und Weiterleitung bitter-sensorischer Informationen beteiligt sind.

In *C.elegans* konnte ein Homolog der NmU-Rezeptoren identifiziert werden. Es wird in sensorischen Neuronen und Interneuronen exprimiert und ist an der nahrungsabhängigen Regulation der Lebenserwartung beteiligt, indem es die Signaltransduktion bestimmter sensorischer Rezeptoren moduliert (Maier et al. [2010]). Durch die Expression des Hugin-Rezeptors in den rezeptiven Neuronen der gustatorischen Organe ist anzunehmen, dass Hugin ebenfalls eine modulatorische Funktion auf sensorische Informationen ausübt. Aufgrund des Projektionsmusters der CG8784-positiven Rezeptorneurone kann gefolgert werden, dass diese Modulation in den GR66a-positiven Rezeptorneuronen stattfindet und damit die Wahrnehmung bitter-schmeckender Substanzen beeinflusst wird.

Werden gefütterte Fliegen einer neuen Futterquelle ausgesetzt, warten sie mit der Nahrungsaufnahme zunächst, um möglicherweise den Nährstoffgehalt und die Gefahr toxischer Substanzen abzuschätzen. Wird dagegen die Hugin-abhängige Signalweiterleitung blockiert, ist die Initiationsphase der Nahrungsaufnahme deutlich reduziert (Melcher und Pankratz [2005]). Durch den Verlust bzw. die verminderte Expression der Hugin-Rezeptoren in den Deletionsmutanten ist die Hugin-abhängige Signalweiterleitung eingeschränkt. Da Larven konstitutiv Nahrung aufnehmen, ist eine beschleunigte oder erhöhte Nahrungsaufnahme in diesem Entwicklungsstadium schwer festzustellen und erklärt das Fehlen eines Fressphänotyps in den Larven der Deletionsmutanten. Es wäre daher interessant, die Untersuchungen einer Veränderung der Nahrungsaufnahme in Adulten fortzusetzen.

### **5.5 CG8784-vermittelte Funktion der Hugin-Neurone auf die Insulin-produzierenden Zellen**

Im Protocerebrum war ein CG8784-Expressionsmuster in neun der medianen neurosekretorischen Zellen des *Pars Intercerebralis* erkennbar, von denen sieben als Insulin-produzierende Zellen (IPCs) identifiziert werden konnten. Mit Hilfe der GRASP-Methode konnte gezeigt werden, dass ein direkter Kontakt zwischen den IPCs und den Hugin-Zellen besteht. Die Kontakt-

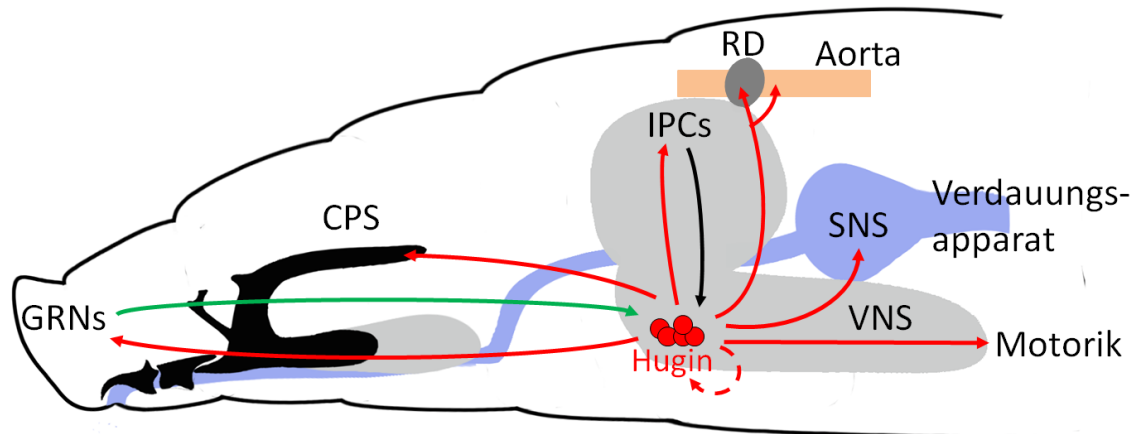
## 5 Diskussion

aufnahme erstreckte sich dabei auf alle Projektionsbahnen der IPCs. Diese verlaufen in den Larven ipsilateral in das Protocerebrum und zum SOG, wo sie im Bereich des larvalen Tritocerebrums enden. Weiterhin überkreuzen sie sich dorsal des Foramens und führen contralateral in die Ringdrüse.

In den IPCs werden die Insulin-Homologe Dilp2, 3 und 5 gebildet (Rulifson et al. [2002]), die Bestandteil der Insulin-abhängigen Signalkaskade sind. Diese spielt bei der Regulierung der metabolischen Homöostase eine bedeutende Rolle, kontrolliert aber auch Wachstum, Entwicklung, Lebenserwartung und Fressverhalten (Baker und Thummel [2007]; Géminard et al. [2009]; Grewal [2009]; Partridge [2009]; Wu et al. [2005]). In einer Publikation von Bader, R. und Sarraf-Zadeh, L. (*in Revision*) konnte durch Antikörperfärbungen in zwölf der Hugin-Zellen eine Aufnahme von Dilp2 nachgewiesen werden, die zu einer lokal erhöhten Insulin-abhängigen Signalkaskade führt. Es wurde gezeigt, dass diese Aufnahme sowohl von der Expression eines Insulin-bindenden Proteins Imp-L2 (engl: Imaginal morphogenesis protein-Late 2), aber auch von der räumlichen Nähe der Neurone abhängig ist. Die Expression des Hugin-Rezeptors CG8784 und der direkte neuronale Kontakt ließen umgekehrt auf eine besondere Funktion von Hugin in den IPCs schließen.

Die IPCs stehen mit den Zellen von CC und CA der RD in Verbindung stehen und werden in ihrer Funktion als Analog zum Pankreas in Mammalia betrachtet (Rulifson et al. [2002]; Lee und Park [2004]; Geminard et al. [2006]; Leopold und Perrimon [2007]). In der Publikation von Kaczmarek et al. [2006] konnte durch in vitro Untersuchungen an isolierten Langerhans Inselzellen der Bauchspeicheldrüse ein direkter Einfluss von NmU auf die Insulinfreisetzung gezeigt werden. Da NmU, neben einer zentralen Expression, auch im Pankreas exprimiert wird (Hedrick et al. [2000]; Raddatz et al. [2000]) vermuteten sie, dass dies ein parakriner Effekt ist, der durch NMU1R vermittelt wird. Aufgrund des Expressionsmusters von CG8784 in den IPCs und der Ergebnisse der GRASP-Untersuchungen wurde eine vergleichbare Funktion in *Drosophila* angenommen, die durch eine intrazelluläre Hugin-abhängige Signalkaskade vermittelt wird.

In gehungerten Larven ist die Konzentration von Dilp2 in den IPCs hoch, bei Aufnahme von proteinreicher Nahrung dagegen signifikant reduziert. Da eine nahrungsabhängige Regulation von Dilp2 auf Transkriptionsebene bisher nicht bekannt ist, wurde dies auf eine Sekretion von Dilp2 zurückgeführt (Géminard et al. [2009]). Durch die lokale Überexpression des Hugin-Rezeptors CG8784 in den IPCs konnte gezeigt werden, dass in gehungerten Larven, im Gegensatz zur Wildtyp-Situation, die Dilp2-Konzentration in den IPCs deutlich reduziert war. Daraus konnte auf eine erhöhte Freisetzung von Dilp2 und folglich auf eine erhöhte systemische Insulin-Signalkaskade (IIS) geschlossen werden. Es ist daher anzunehmen, dass die Hugin-abhängige Signalkaskade an der Regulation der nahrungsabhängigen Energiehomöostase beteiligt ist.



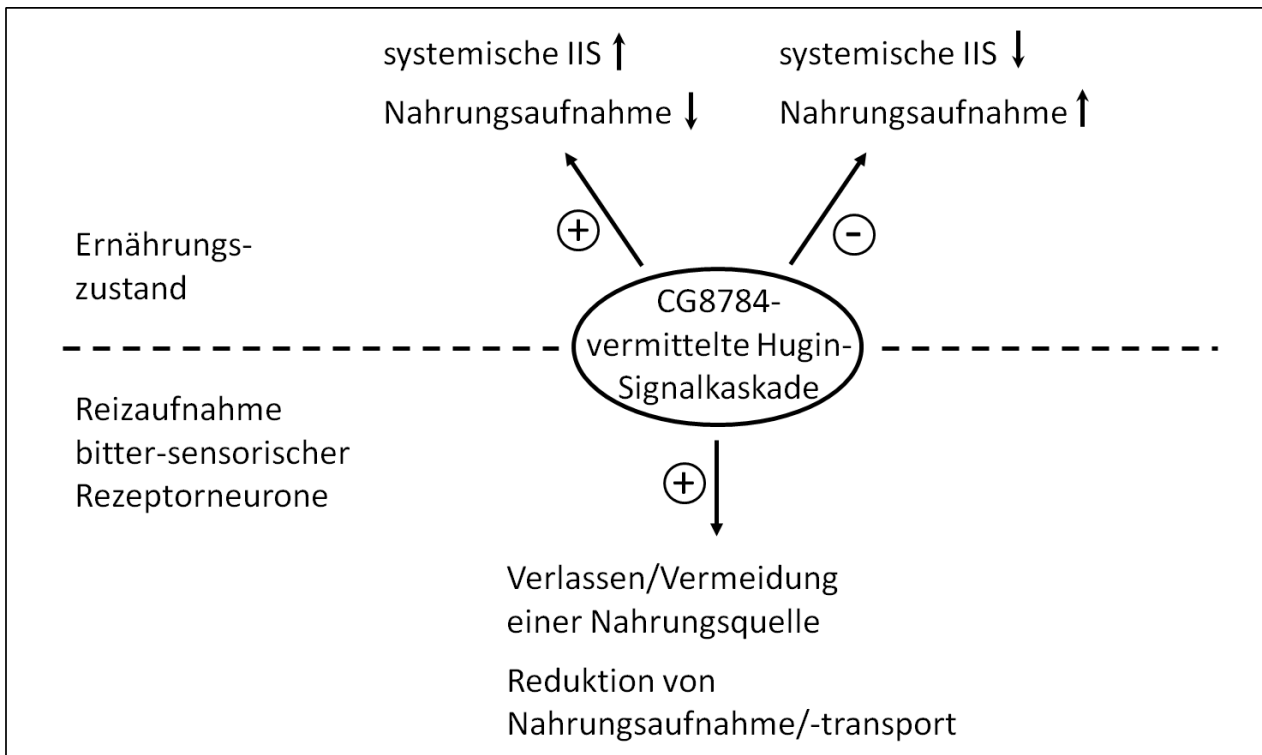
### Abbildung 5.1: Der Hugin-abhängige neuronale Schaltkreis

Die Hugin-Neurone (rote Kreise) nehmen bitter-sensorische Informationen GR66a-positiver, gustatorischer Rezeptorneurone (GRNs) auf (grüner Pfeil). Dilp2 wird über Imp-L2 in den Hugin-Zellen, durch eine direkte neuronale Verbindung mit den Insulin-produzierenden Zellen (IPCs), aufgenommen (schwarzer Pfeil) (Bader, R., Sarraf-Zadeh, L. (*in Revision*)). CG8795 ermöglicht eine autokrine Funktion von Hugin (roter, unterbrochener Pfeil). CG8784 vermittelt die Hugin-abhängige Signaltransduktion in GR66a-positiven GRNs und in Zielzellen und -organen, die mit der Nahrungssuche/-aufnahme und dem Nahrungstransport in Verbindung stehen (rote Pfeile). CPS - Cephalopharyngeales Skelett, SNS - Stomatogastrisches Nervensystem, VNS - ventrales Nervensystem.

## 5.6 Funktion des neuronalen Hugin-Schaltkreises

Aufgrund des Expressionsmusters von CG8795 konnte auf eine autokrine, möglicherweise selbst-regulierende Funktion von Hugin in 16 von 20 Hugin-Neuronen geschlossen werden. Das Expressionsmuster von CG8784 weist dagegen auf eine Verbindung der Hugin-Neurone mit Organen hin, die an der gustatorischen Wahrnehmung, der Nahrungssuche, -aufnahme und dem -transport in Verbindung stehen. Außerdem konnte eine Lokalisation von CG8784 in den IPCs gezeigt werden, die direkt mit den Hugin-Neuronen in Verbindung stehen. Diese übernehmen eine übergeordnete Funktion bei der Regulation der Energiehomöostase. Bader, R. und Sarraf-Zadeh, L. (*in Revision*) konnten eine Imp-L2 vermittelte Aufnahme von Dilp2 in einer Subpopulation der Hugin-Neurone zeigen, die zu einer lokal erhöhten Insulin-Signalkaskade führt (Abbildung 5.1).

Aus den vorhandenen morphologischen und funktionellen Daten konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass Hugin mittels CG8784 über zwei verschiedene Mechanismen auf die Nahrungsaufnahme und das nahrungsabhängige Verhalten wirkt. Eine kurzfristige Reaktion, durch die Aufnahme bitter-sensorischer Informationen, führt zu einer erhöhten Hugin-Signalkaskade, die ein Verlassen/Vermeiden der Futterquelle und eine reduzierte Nahrungsaufnahme bzw. einen reduzierten Nahrungstransport zur Folge hat. Eine langfristige Reaktion wird durch den Ernährungszustand ausgelöst. In gefütterten Tieren führt eine gesteigerte Hugin-Signalkaskade in



**Abbildung 5.2: CG8784-vermittelte nahrungsabhängige Funktion der Hugin-Signalkaskade**

Abhängig vom Ernährungszustand vermittelt CG8784 eine Funktion auf die Energiehomöostase. In gefütterten Tieren führt eine lokal erhöhte Hugin-Signalkaskade zu einer erhöhten systemischen Insulin-Signalkaskade (IIS) und einer verminderten Nahrungsaufnahme. In gehungerten Tieren ist ein umgekehrter Effekt zu erwarten. Durch die Aufnahme bitter-sensorischer Geschmacksinformationen werden kurzfristig CG8784-vermittelt nahrungsabhängige Verhaltensweisen reguliert.

den Zielzellen zu einer erhöhten Freisetzung von Insulin und damit zu einer gesteigerten systemischen IIS. Als Folge ist eine verminderte Nahrungsaufnahme anzunehmen. Im gehungerten Zustand ist dagegen der umgekehrte Effekt zu erwarten.

## Literatur

- Altstein, M. und Nässel, D. R. (2010). Neuropeptide signaling in insects. *Advances in experimental medicine and biology*, 692:155–65.
- Amrein, H. und Thorne, N. (2005). Gustatory perception and behavior in *Drosophila melanogaster*. *Current biology : CB*, 15(17):R673–84.
- Apitz, H. (2002). pChs-GAL4, a vector for the generation of *Drosophila* Gal4 lines driven by identified enhancer elements. *Dros Inf Serv*, 85:118–20.
- Bader, R., Colomb, J., Pankratz, B., Schröck, A., Stocker, R. F., und Pankratz, M. J. (2007a). Genetic dissection of neural circuit anatomy underlying feeding behavior in *Drosophila*: distinct classes of hugin-expressing neurons. *The Journal of comparative neurology*, 502(5):848–56.
- Bader, R., Wegener, C., und Pankratz, M. J. (2007b). Comparative neuroanatomy and genomics of hugin and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN). *Fly*, 1(4):228–31.
- Baker, K. D. und Thummel, C. S. (2007). Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell metabolism*, 6(4):257–66.
- Belgacem, Y. H. und Martin, J.-R. (2006). Disruption of insulin pathways alters trehalose level and abolishes sexual dimorphism in locomotor activity in *Drosophila*. *Journal of neurobiology*, 66(1):19–32.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., und Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9):3312–7.
- Brand, A. H. und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2):401–15.
- Brody, T. und Cravchik, a. (2000). *Drosophila melanogaster* G protein-coupled receptors. *The Journal of cell biology*, 150(2):F83–8.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., und Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current biology : CB*, 11(4):213–21.

## Literatur

- Broughton, S. J., Piper, M. D. W., Ikeya, T., Bass, T. M., Jacobson, J., Drieger, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D. J., Leever, S. J., und Partridge, L. (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8):3105–10.
- Buch, S. und Pankratz, M. J. (2009). Making metabolic decisions in *Drosophila*. *Fly*, 3(1):74–7.
- Chandrashekar, J., Hoon, M. a., Ryba, N. J. P., und Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444(7117):288–94.
- Chintapalli, V. R., Wang, J., und Dow, J. a. T. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature genetics*, 39(6):715–20.
- Choi, M.-Y., Fuerst, E.-J., Rafaeli, A., und Jurenka, R. (2003). Identification of a G protein-coupled receptor for pheromone biosynthesis activating neuropeptide from pheromone glands of the moth *Helicoverpa zea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17):9721–6.
- Chyb, S., Dahanukar, A., Wickens, A., und Carlson, J. R. (2003). *Drosophila* Gr5a encodes a taste receptor tuned to trehalose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl:14526–30.
- Clyne, P. J. (2000). Candidate Taste Receptors in *Drosophila*. *Science*, 287(5459):1830–1834.
- Colomb, J., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., und Stocker, R. F. (2007). Architecture of the primary taste center of *Drosophila melanogaster* larvae. *The Journal of comparative neurology*, 502(5):834–47.
- Colombani, J., Andersen, D. S., und Léopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science (New York, N. Y.)*, 336(6081):582–5.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., und Léopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell*, 114(6):739–49.
- Dahanukar, a., Foster, K., van der Goes van Naters, W. M., und Carlson, J. R. (2001). A Gr receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of *Drosophila*. *Nature neuroscience*, 4(12):1182–6.



## Literatur

- Dass, N. B., Bassil, a. K., North-Laidler, V. J., Morrow, R., Aziz, E., Tuladhar, B. R., und Sanger, G. J. (2007). Neuromedin U can exert colon-specific, enteric nerve-mediated prokinetic activity, via a pathway involving NMU1 receptor activation. *British journal of pharmacology*, 150(4):502–8.
- de Velasco, B., Erclik, T., Shy, D., Sclafani, J., Lipshitz, H., McInnes, R., und Hartenstein, V. (2007). Specification and development of the pars intercerebralis and pars lateralis, neuroendocrine command centers in the *Drosophila* brain. *Developmental biology*, 302(1):309–23.
- De Velasco, B., Shen, J., Go, S., und Hartenstein, V. (2004). Embryonic development of the *Drosophila* corpus cardiacum, a neuroendocrine gland with similarity to the vertebrate pituitary, is controlled by sine oculis and glass. *Developmental biology*, 274(2):280–94.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist’s Swiss army knife. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 34(1-2):1–15.
- Dunipace, L., Meister, S., McNealy, C., und Amrein, H. (2001). Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system. *Current biology : CB*, 11(11):822–35.
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., und French, K. (2000). *Tierphysiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 3. edition.
- Enell, L. E., Kapan, N., Söderberg, J. a. E., Kahsai, L., und Nässel, D. R. (2010). Insulin signaling, lifespan and stress resistance are modulated by metabotropic GABA receptors on insulin producing cells in the brain of *Drosophila*. *PloS one*, 5(12):e15780.
- Feinberg, E. H., Vanhoven, M. K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R. D., Shen, K., und Bargmann, C. I. (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron*, 57(3):353–63.
- Fishilevich, E., Domingos, A. I., Asahina, K., Naef, F., Voss hall, L. B., und Louis, M. (2005). Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*. *Current biology : CB*, 15(23):2086–96.
- Fox, L. E., Soll, D. R., und Wu, C.-F. (2006). Coordination and modulation of locomotion pattern generators in *Drosophila* larvae: effects of altered biogenic amine levels by the tyramine beta hydroxlyase mutation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(5):1486–98.

## Literatur

- Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Habata, Y., Hinuma, S., Onda, H., Nishimura, O., und Fujino, M. (2000). Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3. *The Journal of biological chemistry*, 275(28):21068–74.
- Funes, S., Hedrick, J. a., Yang, S., Shan, L., Bayne, M., Monsma, F. J., und Gustafson, E. L. (2002). Cloning and characterization of murine neuromedin U receptors. *Peptides*, 23(9):1607–15.
- Garelli, A., Gontijo, A. M., Miguela, V., Caparros, E., und Dominguez, M. (2012). Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6081):579–82.
- Geminard, C., Arquier, N., Layalle, S., Bourouis, M., Slaidina, M., Delanoue, R., Bjordal, M., Ohanna, M., Ma, M., Colombani, J., und Leopold, P. (2006). Control of Metabolism and Growth Through Insulin-Like Peptides in *Drosophila*. *Diabetes*, 55(Supplement\_2):S5–S8.
- Géminard, C., Rulifson, E. J., und Léopold, P. (2009). Remote control of insulin secretion by fat cells in *Drosophila*. *Cell metabolism*, 10(3):199–207.
- Gendre, N., Lüer, K., Friche, S., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Technau, G. M., und Stocker, R. F. (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 131(1):83–92.
- Gerber, B. und Stocker, R. F. (2007). The *Drosophila* larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: a review. *Chemical senses*, 32(1):65–89.
- Gerber, B., Stocker, R. F., Tanimura, T., und Thum, a. S. (2009). Smelling, tasting, learning: *Drosophila* as a study case. *Results and problems in cell differentiation*, 47:139–85.
- Gomez-Marin, A., Stephens, G. J., und Louis, M. (2011). Active sampling and decision making in *Drosophila* chemotaxis. *Nature communications*, 2:441.
- Gordon, M. D. und Scott, K. (2009). Motor control in a *Drosophila* taste circuit. *Neuron*, 61(3):373–84.
- Graveley, B. R., Brooks, A. N., Carlson, J. W., Duff, M. O., Landolin, J. M., Yang, L., Artieri, C. G., van Baren, M. J., Boley, N., Booth, B. W., Brown, J. B., Cherbas, L., Davis, C. a., Dobin, A., Li, R., Lin, W., Malone, J. H., Mattiuzzo, N. R., Miller, D., Sturgill, D., Tuch, B. B.,

## Literatur

- Zaleski, C., Zhang, D., Blanchette, M., Dudoit, S., Eads, B., Green, R. E., Hammonds, A., Jiang, L., Kapranov, P., Langton, L., Perrimon, N., Sandler, J. E., Wan, K. H., Willingham, A., Zhang, Y., Zou, Y., Andrews, J., Bickel, P. J., Brenner, S. E., Brent, M. R., Cherbas, P., Gingeras, T. R., Hoskins, R. a., Kaufman, T. C., Oliver, B., und Celniker, S. E. (2011). The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 471(7339):473–9.
- Grewal, S. S. (2009). Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(5):1006–10.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R., und Calos, M. P. (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics*, 166(4):1775–82.
- Hanada, R., Teranishi, H., Pearson, J. T., Kurokawa, M., Hosoda, H., Fukushima, N., Fukue, Y., Serino, R., Fujihara, H., Ueta, Y., Ikawa, M., Okabe, M., Murakami, N., Shirai, M., Yoshimatsu, H., Kangawa, K., und Kojima, M. (2004). Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nature medicine*, 10(10):1067–73.
- Hartenstein, V. (2006). The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *The Journal of endocrinology*, 190(3):555–70.
- Hazelrigg, T., Levis, R., und Rubin, G. M. (1984). Transformation of white locus DNA in *drosophila*: dosage compensation, zeste interaction, and position effects. *Cell*, 36(2):469–81.
- Hedrick, J. a., Morse, K., Shan, L., Qiao, X., Pang, L., Wang, S., Laz, T., Gustafson, E. L., Bayne, M., und Monsma, F. J. (2000). Identification of a human gastrointestinal tract and immune system receptor for the peptide neuromedin U. *Molecular pharmacology*, 58(4):870–5.
- Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Häberlin, C., und Stocker, R. F. (1999). Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: toxin expression studies in chemosensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(15):6599–609.
- Hewes, R. S. und Taghert, P. H. (2001). Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome research*, 11(6):1126–42.
- Hiroi, M., Tanimura, T., und Marion-Poll, F. (2008). Hedonic taste in *Drosophila* revealed by olfactory receptors expressed in taste neurons. *PloS one*, 3(7):e2610.

## Literatur

- Hirth, F., Loop, T., Egger, B., Miller, D. F., Kaufman, T. C., und Reichert, H. (2001). Functional equivalence of Hox gene products in the specification of the tritocerebrum during embryonic brain development of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 128(23):4781–8.
- Honegger, B., Galic, M., Köhler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E., und Stocker, H. (2008). Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. *Journal of biology*, 7(3):10.
- Hosoya, M., Moriya, T., Kawamata, Y., Ohkubo, S., Fujii, R., Matsui, H., Shintani, Y., Fukusumi, S., Habata, Y., Hinuma, S., Onda, H., Nishimura, O., und Fujino, M. (2000). Identification and functional characterization of a novel subtype of neuromedin U receptor. *The Journal of biological chemistry*, 275(38):29528–32.
- Howard, a. D., Wang, R., Pong, S. S., Mellin, T. N., Strack, A., Guan, X. M., Zeng, Z., Williams, D. L., Feighner, S. D., Nunes, C. N., Murphy, B., Stair, J. N., Yu, H., Jiang, Q., Clements, M. K., Tan, C. P., McKee, K. K., Hreniuk, D. L., McDonald, T. P., Lynch, K. R., Evans, J. F., Austin, C. P., Caskey, C. T., Van der Ploeg, L. H., und Liu, Q. (2000). Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature*, 406(6791):70–4.
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., und Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Current biology : CB*, 12(15):1293–300.
- Johnstone, A. F. M. und Cooper, R. L. (2006). Direct innervation of the *Drosophila melanogaster* larval aorta. *Brain research*, 1083(1):159–63.
- Kaczmarek, P., Malendowicz, L. K., Fabis, M., Ziolkowska, A., Pruszyńska-Oszmalek, E., Sassek, M., Wojciechowicz, T., Szczepankiewicz, D., Andralojc, K., Szkudelski, T., Strowski, M. Z., und Nowak, K. W. (2009). Does somatostatin confer insulinostatic effects of neuromedin u in the rat pancreas? *Pancreas*, 38(2):208–12.
- Kaczmarek, P., Malendowicz, L. K., Pruszyńska-Oszmalek, E., Wojciechowicz, T., Szczepankiewicz, D., Szkudelski, T., und Nowak, K. W. (2006). Neuromedin U receptor 1 expression in the rat endocrine pancreas and evidence suggesting neuromedin U suppressive effect on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *International journal of molecular medicine*, 18(5):951–5.

## Literatur

- Kaplan, D. D., Zimmermann, G., Suyama, K., Meyer, T., und Scott, M. P. (2008). A nucleos-temin family GTPase, NS3, acts in serotonergic neurons to regulate insulin signaling and control body size. *Genes & development*, 22(14):1877–93.
- Kim, M. D., Wen, Y., und Jan, Y.-n. (2009). Patterning and organization of motor neuron dendrites in the *Drosophila* larva. *Developmental biology*, 336(2):213–21.
- Kim, S. K. und Rulifson, E. J. (2004). Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. *Nature*, 431(7006):316–20.
- Kim, Y.-J., Nachman, R. J., Aimanova, K., Gill, S., und Adams, M. E. (2008). The pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) receptor of *Heliothis virescens*: identification, functional expression, and structure-activity relationships of ligand analogs. *Peptides*, 29(2):268–75.
- King, R. C., Aggarwal, S. K., und Bodenstein, D. (1966). The comparative submicroscopic morphology of the ring gland of *Drosophila melanogaster* during the second and third larval instars. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*, 73(2):272–85.
- Kotlikoff, M. I. (2007). Genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators: using genetics and molecular design to understand complex physiology. *The Journal of physiology*, 578(Pt 1):55–67.
- Kwon, J. Y., Dahanukar, A., Weiss, L. a., und Carlson, J. R. (2011). Molecular and cellular organization of the taste system in the *Drosophila* larva. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(43):15300–9.
- Lai, S.-L. und Lee, T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nature neuroscience*, 9(5):703–9.
- Laski, F. a., Rio, D. C., und Rubin, G. M. (1986). Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell*, 44(1):7–19.
- Lee, G. und Park, J. H. (2004). Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167(1):311–23.
- Lee, K.-S., Kwon, O.-Y., Lee, J. H., Kwon, K., Min, K.-J., Jung, S.-A., Kim, A.-K., You, K.-H., Tatar, M., und Yu, K. (2008). *Drosophila* short neuropeptide F signalling regulates growth by ERK-mediated insulin signalling. *Nature cell biology*, 10(4):468–75.

## Literatur

- Leopold, P. und Perrimon, N. (2007). *Drosophila* and the genetics of the internal milieu. *Nature*, 450(7167):186–8.
- Lindemann, B. (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature*, 413(6852):219–25.
- Liu, L., Yermolaieva, O., Johnson, W. a., Abboud, F. M., und Welsh, M. J. (2003). Identification and function of thermosensory neurons in *Drosophila* larvae. *Nature neuroscience*, 6(3):267–73.
- Luo, J., Becnel, J., Nichols, C. D., und Nässel, D. R. (2012). Insulin-producing cells in the brain of adult *Drosophila* are regulated by the serotonin 5-HT1A receptor. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69(3):471–84.
- Mahr, A. und Aberle, H. (2006). The expression pattern of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. *Gene expression patterns : GEP*, 6(3):299–309.
- Maier, W., Adilov, B., Regenass, M., und Alcedo, J. (2010). A neuromedin U receptor acts with the sensory system to modulate food type-dependent effects on *C. elegans* lifespan. *PLoS biology*, 8(5):e1000376.
- Marella, S., Fischler, W., Kong, P., Asgarian, S., Rueckert, E., und Scott, K. (2006). Imaging taste responses in the fly brain reveals a functional map of taste category and behavior. *Neuron*, 49(2):285–95.
- Markstein, M., Pitsouli, C., Villalta, C., Celniker, S. E., und Perrimon, N. (2008). Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nature genetics*, 40(4):476–83.
- Matsunami, H. und Amrein, H. (2003). Taste and pheromone perception in mammals and flies. *Genome biology*, 4(7):220.
- Meadows, R. (2009). Bad taste protects fruit flies from eating a toxic amino acid in plants. *PLoS biology*, 7(6):e1000128.
- Melcher, C., Bader, R., und Pankratz, M. J. (2007). Amino acids, taste circuits, and feeding behavior in *Drosophila*: towards understanding the psychology of feeding in flies and man. *The Journal of endocrinology*, 192(3):467–72.

## Literatur

- Melcher, C., Bader, R., Walther, S., Simakov, O., und Pankratz, M. J. (2006). Neuromedin U and its putative *Drosophila* homolog hugin. *PLoS biology*, 4(3):e68.
- Melcher, C. und Pankratz, M. J. (2005). Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain. *PLoS biology*, 3(9):e305.
- Meng, X., Wahlström, G., Immonen, T., Kolmer, M., Tirronen, M., Predel, R., Kalkkinen, N., Heino, T. I., Sariola, H., und Roos, C. (2002). The *Drosophila* hugin gene codes for myostimulatory and ecdysis-modifying neuropeptides. *Mechanisms of development*, 117(1-2):5–13.
- Moon, S. J., Köttgen, M., Jiao, Y., Xu, H., und Montell, C. (2006). A taste receptor required for the caffeine response in vivo. *Current biology : CB*, 16(18):1812–7.
- Mueller, K. L., Hoon, M. A., Erlenbach, I., Chandrashekar, J., Zuker, C. S., und Ryba, N. J. P. (2005). The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature*, 434(7030):225–9.
- Munk, K. (2002). *Grundstudium Biologie - Zoologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin.
- Murray, M. J. und Saint, R. (2007). Photoactivatable GFP resolves *Drosophila* mesoderm migration behaviour. *Development (Cambridge, England)*, 134(22):3975–83.
- Nakai, J., Ohkura, M., und Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 19(2):137–41.
- Nakazato, M., Hanada, R., Murakami, N., Date, Y., Mondal, M. S., Kojima, M., Yoshimatsu, H., Kangawa, K., und Matsukura, S. (2000). Central effects of neuromedin U in the regulation of energy homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications*, 277(1):191–4.
- Nässel, D. R. und Winther, A. M. E. (2010). *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in neurobiology*, 92(1):42–104.
- Neckameyer, W. S. und Bhatt, P. (2012). Neurotrophic actions of dopamine on the development of a serotonergic feeding circuit in *Drosophila melanogaster*. *BMC neuroscience*, 13(1):26.
- Park, Y., Kim, Y.-J., und Adams, M. E. (2002). Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17):11423–8.

## Literatur

- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. a., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E., Deal-Herr, M. E., Grant, D., Marcinko, M., Miyazaki, W. Y., Robertson, S., Shaw, K. J., Tabios, M., Vysotskaia, V., Zhao, L., Andrade, R. S., Edgar, K. a., Howie, E., Killpack, K., Milash, B., Norton, A., Thao, D., Whittaker, K., Winner, M. a., Friedman, L., Margolis, J., Singer, M. a., Kopczynski, C., Curtis, D., Kaufman, T. C., Plowman, G. D., Duyk, G., und Francis-Lang, H. L. (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nature genetics*, 36(3):288–92.
- Partridge, L. (2009). Some highlights of research on aging with invertebrates, 2009. *Aging cell*, 8(5):509–13.
- Pfeiffer, B. D., Ngo, T.-T. B., Hibbard, K. L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J. W., und Rubin, G. M. (2010). Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics*, 186(2):735–55.
- Phelps, C. B. und Brand, a. H. (1998). Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods (San Diego, Calif.)*, 14(4):367–79.
- Porte, D., Baskin, D. G., und Schwartz, M. W. (2005). Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes*, 54(5):1264–76.
- Python, F. und Stocker, R. F. (2002). Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *The Journal of comparative neurology*, 445(4):374–87.
- Raddatz, R., Wilson, a. E., Artymyshyn, R., Bonini, J. a., Borowsky, B., Boteju, L. W., Zhou, S., Kouranova, E. V., Nagorny, R., Guevarra, M. S., Dai, M., Lerman, G. S., Vaysse, P. J., Branchek, T. a., Gerald, C., Forray, C., und Adham, N. (2000). Identification and characterization of two neuromedin U receptors differentially expressed in peripheral tissues and the central nervous system. *The Journal of biological chemistry*, 275(42):32452–9.
- Rajan, A. und Perrimon, N. (2012). *Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. *Cell*, 151(1):123–37.
- Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K., und Engels, W. R. (1988). A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 118(3):461–70.



## Literatur

- Robertson, H. M., Warr, C. G., und Carlson, J. R. (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl:14537–42.
- Rosenkilde, C., Cazzamali, G., Williamson, M., Hauser, F., Søndergaard, L., DeLotto, R., und Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2003). Molecular cloning, functional expression, and gene silencing of two *Drosophila* receptors for the *Drosophila* neuropeptide pyrokinin-2. *Biochemical and biophysical research communications*, 309(2):485–94.
- Rubin, G. M. und Spradling, a. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science (New York, N.Y.)*, 218(4570):348–53.
- Rulifson, E. J., Kim, S. K., und Nusse, R. (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5570):1118–20.
- Ryder, E., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Drummond, J., Webster, J., Johnson, G., Morley, T., Chan, Y. S., Blows, F., Coulson, D., Reuter, G., Baisch, H., Apelt, C., Kauk, A., Rudolph, T., Kube, M., Klimm, M., Nickel, C., Szidonya, J., Maróy, P., Pal, M., Rasmuson-Lestander, A., Ekström, K., Stocker, H., Hugentobler, C., Hafen, E., Gubb, D., Pflugfelder, G., Dorner, C., Mechler, B., Schenkel, H., Marhold, J., Serras, F., Corominas, M., Punset, A., Roote, J., und Russell, S. (2007). The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics*, 177(1):615–29.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G., O’Kane, C. J., Huen, D., Sharma, P., Asztalos, Z., Baisch, H., Schulze, J., Kube, M., Kittlaus, K., Reuter, G., Maroy, P., Szidonya, J., Rasmuson-Lestander, A., Ekström, K., Dickson, B., Hugentobler, C., Stocker, H., Hafen, E., Lepesant, J. A., Pflugfelder, G., Heisenberg, M., Mechler, B., Serras, F., Corominas, M., Schneuwly, S., Preat, T., Roote, J., und Russell, S. (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167(2):797–813.
- Schipanski, A., Yarali, A., Niewalda, T., und Gerber, B. (2008). Behavioral analyses of sugar processing in choice, feeding, and learning in larval *Drosophila*. *Chemical senses*, 33(6):563–73.
- Schoofs, A., Niederegger, S., van Ooyen, A., Heinzl, H.-G., und Spiess, R. (2010). The brain can eat: establishing the existence of a central pattern generator for feeding in third instar larvae

## Literatur

- of *Drosophila virilis* and *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 56(7):695–705.
- Scott, K., Brady, R., Cravchik, a., Morozov, P., Rzhetsky, a., Zuker, C., und Axel, R. (2001). A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 104(5):661–73.
- Scott, R. C., Schuldiner, O., und Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental cell*, 7(2):167–78.
- Shan, L., Qiao, X., Crona, J. H., Behan, J., Wang, S., Laz, T., Bayne, M., Gustafson, E. L., Monsma, F. J., und Hedrick, J. a. (2000). Identification of a novel neuromedin U receptor subtype expressed in the central nervous system. *The Journal of biological chemistry*, 275(50):39482–6.
- Shiga, S. (2003). Anatomy and functions of brain neurosecretory cells in diptera. *Microscopy research and technique*, 62(2):114–31.
- Shingleton, A. W. (2010). The regulation of organ size in *Drosophila*: physiology, plasticity, patterning and physical force. *Organogenesis*, 6(2):76–87.
- Siegmund, T. und Korge, G. (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of comparative neurology*, 431(4):481–91.
- Singh, R. N. (1997). Neurobiology of the gustatory systems of *Drosophila* and some terrestrial insects. *Microscopy research and technique*, 39(6):547–63.
- Sokolowski, M. B. (1980). Foraging strategies of *Drosophila melanogaster*: a chromosomal analysis. *Behavior genetics*, 10(3):291–302.
- Sokolowski, M. B., Kent, C., und Wong, J. (1984). *Drosophila* larval foraging behaviour: Developmental stages. *Animal Behaviour*, 32(3):645–651.
- Spiess, R., Schoofs, A., und Heinzl, H.-G. (2008). Anatomy of the stomatogastric nervous system associated with the foregut in *Drosophila melanogaster* and *Calliphora vicina* third instar larvae. *Journal of Morphology*, 269(3):272–282.
- Spradling, a. C. und Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science (New York, N. Y.)*, 218(4570):341–7.

## Literatur

- Steiger, U. (1967). Über den Feinbau des Neuropils im Corpus pedunculatum der Waldameise. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 81(4):511–536.
- Stocker, R. F. (2001). *Drosophila* as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microscopy research and technique*, 55(5):284–96.
- Szekeres, P. G., Muir, a. I., Spinage, L. D., Miller, J. E., Butler, S. I., Smith, A., Rennie, G. I., Murdock, P. R., Fitzgerald, L. R., Wu, H. L., McMillan, L. J., Guerrero, S., Vawter, L., Elshourbagy, N. a., Mooney, J. L., Bergsma, D. J., Wilson, S., und Chambers, J. K. (2000). Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3. *The Journal of biological chemistry*, 275(27):20247–50.
- Terhzaz, S., Cabrero, P., Robben, J. H., Radford, J. C., Hudson, B. D., Milligan, G., Dow, J. a. T., und Davies, S.-A. (2012). Mechanism and function of *Drosophila* *capa* GPCR: a desiccation stress-responsive receptor with functional homology to human neuromedinU receptor. *PloS one*, 7(1):e29897.
- Thibault, S. T., Singer, M. a., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. a., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L., Ryner, L., Cheung, L. M., Chong, A., Erickson, C., Fisher, W. W., Greer, K., Hartouni, S. R., Howie, E., Jakkula, L., Joo, D., Killpack, K., Laufer, A., Mazzotta, J., Smith, R. D., Stevens, L. M., Stuber, C., Tan, L. R., Ventura, R., Woo, A., Zakrajsek, I., Zhao, L., Chen, F., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Winberg, M. L., und Margolis, J. (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nature genetics*, 36(3):283–7.
- Thorne, N., Chromey, C., Bray, S., und Amrein, H. (2004). Taste perception and coding in *Drosophila*. *Current biology : CB*, 14(12):1065–79.
- Tian, L., Hires, S. A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M. E., Chalasani, S. H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S. a., Schreiter, E. R., Bargmann, C. I., Jayaraman, V., Svoboda, K., und Looger, L. L. (2009). Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature methods*, 6(12):875–81.
- Van der Horst, D. J. (2003). Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(2):217–226.

## Literatur

- Vosshall, L. B. und Stocker, R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual review of neuroscience*, 30:505–33.
- Vosshall, L. B., Wong, A. M., und Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, 102(2):147–59.
- Wagh, D. a., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Dürrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M.-C., Schmidt, M., Qin, G., Wichmann, C., Kittel, R., Sigrist, S. J., und Buchner, E. (2006). Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron*, 49(6):833–44.
- Wang, Z., Singhvi, A., Kong, P., und Scott, K. (2004). Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell*, 117(7):981–91.
- Wu, Q. und Brown, M. R. (2006). Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annual review of entomology*, 51:1–24.
- Wu, Q., Zhang, Y., Xu, J., und Shen, P. (2005). Regulation of hunger-driven behaviors by neural ribosomal S6 kinase in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37):13289–94.
- Yarmolinsky, D. a., Zuker, C. S., und Ryba, N. J. P. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139(2):234–44.
- Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J. P., und Zuker, C. S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, 115(3):255–66.
- Zinke, I., Kirchner, C., Chao, L. C., Tetzlaff, M. T., und Pankratz, M. J. (1999). Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumpless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development (Cambridge, England)*, 126(23):5275–84.
- Zinke, I., Schütz, C. S., Katzenberger, J. D., Bauer, M., und Pankratz, M. J. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *The EMBO journal*, 21(22):6162–73.





# Danksagung

Ich danke

Michael für seine Betreuung und Unterstützung bei diesem interessanten Projekt

Prof. Dr. Michael Hoch für die Übernahme der Zweitkorrektur und ihm und seiner Arbeitsgruppe für die Hilfe vor und nach dem Umzug

dem gesamten Labor für die positive Zusammenarbeit - Andreas, Anton, David, Ingo, Jacqueline, Julia, Marius, Margret, Martina, Nina, Philipp, Rüdi, Sebastian, Susanne, Tania, Tatjana und Torsten

Dana, Pilar und Sonja für die wissenschaftliche Diskussion

meiner Familie und ganz besonders meiner Frau für das Verständnis, das Vertrauen und den Zuspruch über die gesamte Zeit der Doktorarbeit

