

**Analyse der mechanistischen Grundlagen von
Ethanolpräferenz bei *Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Andrea Benedicte Schneider

aus Lohr a. Main

Köln 2011

Berichterstatter: Prof. Dr. Henrike Scholz
Prof. Dr. Ansgar Büschges

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2011

Meiner Oma und Resi

Drosophila melanogaster and humans have two things in common - an evolutionary origin in Africa and a love of the products of alcoholic fermentation.

M. Ashburner, 1998

Inhalt

1. Einleitung	7
1.1 Ethanol in der Umwelt.....	7
1.2 Ethanolpräferenz.....	7
1.3 Ethanolmetabolismus.....	8
1.4 Das tyraminerge/oktopaminerger System bei <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.5 Geschmackswahrnehmung bei <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.6 Duftwahrnehmung bei <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.7 Ziele der Dissertation	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Fliegenstämme	15
2.2 <i>Drosophila melanogaster</i> Aufzucht und Haltung.....	17
2.3 Chemikalien und Enzyme	17
2.4 Antikörper	17
2.5 Nukleotide.....	17
2.6 Lösungen.....	18
2.6.1 Lösungen für Immunhistochemie.....	18
2.6.2 Lösungen für DNA-Methoden	19
2.7 Molekulargenetische Methoden	19
2.7.1 Isolierung genomischer DNA aus adulten Fliegen	19
2.7.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.7.4 Isolierung von totaler RNA aus adulten Fliegen	20
2.7.5 Reverse Transkription von mRNA	21
2.8 Immunhistochemische Methoden bei <i>Drosophila melanogaster</i>	21
2.8.1 <i>Whole-mount</i> Präparationen und Antikörperfärbungen von larvalen Gehirnen.....	21
2.8.2 <i>Whole-mount</i> Präparationen und Antikörperfärbungen von adulten Gehirnen	21
2.9 Herstellung von Fliegenstöcken	21
2.10 Verhaltensversuche mit adulten <i>Drosophila melanogaster</i>	22

2.10.1 Messung der Ethanolpräferenz.....	22
2.10.2 Optogenetische Aktivierung von Neuronen, die ausreichend für Präferenz sind .	23
2.10.3 Schmeck-Test für Fliegen.....	30
3. Ergebnisse	33
3.1 Hat TβH einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz?	33
3.1.1 <i>TβH^{nm18}</i> Mutanten zeigen keine Ethanolpräferenz	33
3.1.2 Transgene TβH Expression rettet den mutanten Phänotyp von <i>TβH^{nm18}</i> -Fliegen..	35
3.1.3 TβH ist in der adulten Fliege notwendig für die Ethanolpräferenz	39
3.2 Charakterisierung der TβH-positiven Neurone im larvalen zentralen Nervensystem ...	42
3.3 Charakterisierung der TβH-positiven Neurone im adulten Gehirn, die einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz ausüben.....	48
3.3.1 Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen der <i>dTdc2</i> -GAL4-Linie und Vergleich mit der TβH-Expression im adulten Nervensystem	48
3.3.2 Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen der <i>dTdc2</i> -GAL4; <i>Cha</i> GAL80-Linie und Vergleich mit der TβH-Expression im adulten Nervensystem.....	52
3.3.3 Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen der <i>6.2_2TβH</i> -GAL4 Linie und Vergleich mit der TβH-Expression im adulten Nervensystem	54
3.3.4 Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen der <i>Feb15</i> -GAL4-Linie und Vergleich mit der TβH-Expression im adulten Nervensystem	61
3.3.5 Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen der <i>NP7088</i> -GAL4-Linie und Vergleich mit der TβH-Expression im adulten Nervensystem	64
3.3.6 Die für die Ethanolpräferenz notwendigen Neurone können auf wenige Cluster reduziert werden.....	66
3.4 Ist die Aktivierung von Neuronen mit Hilfe von optogenetischen Methoden für die Ausbildung der Ethanolpräferenz ausreichend?	77
3.4.1 Test der Funktionsfähigkeit der neuen Apparatur	77
3.4.2 Optogenetische Aktivierung von Neuronen, die ausreichend für Präferenz sind ...	79
3.4.3 Aktivierung einer Gruppe von Neuronen in blinden Fliegen führt zu Präferenz für blaues Licht.....	84
3.5 Welche externen Stimuli lösen Ethanolpräferenz aus?.....	85
3.5.1 Das Duftbindungsprotein LUSH hat keinen Einfluss auf die Ethanolpräferenz.....	85

3.5.2 Der Duftrezeptor Or83b hat einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz.....	89
<i>w¹¹¹⁸;Or83b¹</i>	95
3.5.3 Fehlende Geschmackswahrnehmung beeinflusst nicht die Ethanolpräferenz.....	98
3.5.4 Die Alkoholdehydrogenase beeinflusst die Ethanolpräferenz	102
4. Diskussion.....	104
4.1 TβH/Oktopamin ist für die Ethanolpräferenz in zwei Zellgruppen von 22 Neuronen wichtig.....	104
4.2 Ethanolpräferenz wird durch einen olfaktorischen Stimulus hervorgerufen.....	108
4.3 Hohe Ethanolkonzentrationen wirken aversiv.....	114
Anhang.....	116
Abkürzungsverzeichnis.....	131
Zusammenfassung.....	133
Abstract.....	135
Literaturverzeichnis	137

1. Einleitung

1.1 Ethanol in der Umwelt

In der Natur kommen über 100 verschiedene Alkohole in verrottenden Früchten vor (Hulme, 1970, 1971). Der Alkohol Ethanol wird von Hefen auf den fleischigen Früchten durch das Fermentieren von Fruchtzucker erzeugt. Während der Reifung der Frucht steigt die Ethanolkonzentration an (Dudley, 2000). Die Ethanolkonzentrationen bleiben jedoch gering und übersteigen fünf Prozent kaum (Gibson *et al.*, 1981).

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* lebt in einer Umwelt mit geringen Alkoholdosen und ihre Nachkommen nehmen alkoholhaltiges Futter auf (McKechnie und Morgan, 1982). Einige dieser Alkohole können von *Drosophila* als Energiequelle verwendet werden, wenn diese in geringen Konzentrationen vorliegen, und steigern sogar die Lebenserwartung der adulten Fliegen (Parson *et al.*, 1979; Van Herrewege und David, 1980; Van Herrewege *et al.*, 1980). Liegt der Alkohol in einer hohen Konzentration vor, so ist er toxisch für die Fliege (Parson *et al.*, 1979).

1.2 Ethanolpräferenz

Da Ethanol in der Umwelt und im Futter von Frugivoren vorkommt, ist es nicht verwunderlich, dass Tiere oft Ethanol attraktiv finden und diesen bevorzugen. Schon früh konnte gezeigt werden, dass Ratten Futter mit einem gewissen Prozentsatz an Ethanol gegenüber dem ethanollosen Futter präferieren. Somit gehört Alkohol zur normalen Ernährung der Ratten (Richter und Campbell, 1940). Ethanol kann z. B. dem trophischen Schmetterling *Bicyclus anynana* dazu dienen, kurzlebige Futterquellen zu lokalisieren (Dierks und Fischer, 2008), ebenso werden auch Laubnutzholzborkenkäfer von den ethanolhaltigen Düften von Bäumen angezogen (Ranger *et al.*, 2010). Jedoch werden nicht nur Käfer und Schmetterlinge von Ethanol angezogen, sondern auch Fliegen. Der Duft überreifer Mangos ist besonders attraktiv für Fliegen, da in diesem Duftgemisch einer der Duftkomponenten Ethanol ist. Fliegen erkennen Ethanol und schätzen diesen als positiv ein (Zhu *et al.*, 2003). Außerdem zeigen Fliegen eine Präferenz dafür, ihre Eier auf ethanolhaltigen Substraten abzulegen (Richmond und Gerking, 1979). Des Weiteren zeigen Fliegen eine Präferenz für ethanolhaltigen Agar (Cadieu *et al.*, 1999) und nehmen sogar ethanolhaltiges Medium zu sich (Ja *et al.*, 2007).

1.3 Ethanolmetabolismus

Ethanol zu metabolisieren ist für die Fliege essenziell, da sie ihn anhand ihrer Nahrung zu sich nimmt. Ethanol kann in der Fliege durch die Enzyme Alkoholdehydrogenase (ADH) in Anwesenheit von NAD^+ zu Acetaldehyd oxidiert werden. Mit Hilfe dieses Enzyms wird in der Larve ca. 90 % des Ethanols in Acetaldehyd abgebaut (Geer *et al.*, 1985; Heinstra *et al.*, 1987). Das restliche Ethanol wird durch andere Enzyme, wie Katalasen abgebaut (Van der Zel *et al.*, 1991). Der durch die ADH produzierte Acetaldehyd ist ein toxischer Metabolit (David *et al.*, 1984). Deshalb wird im Menschen Acetaldehyd hauptsächlich durch das Enzym Aldehyddehydrogenase (ALDH) oxidiert (Weiner, 1979). In *Drosophila* gibt es ebenfalls eine ALDH (Liétaert *et al.*, 1982; Leal und Barbancho, 1992), die ebenso, wie das Enzym ADH Acetaldehyd oxidieren kann (Heinstra *et al.*, 1983; Eisses *et al.*, 1985; Geer *et al.*, 1985). Das Enzym ALDH ist zu ca. 90 % für den Abbau von Acetaldehyd verantwortlich (Abbildung 1.1) (Fry *et al.*, 2004; Fry und Saweikis, 2006). Das Acetat kann anschließend durch die Acetyl-CoA Synthetase zu Acetyl-CoA metabolisiert werden und anschließend für die Fettsynthese und Energiegewinnung verwendet werden (Montooth *et al.*, 2006).

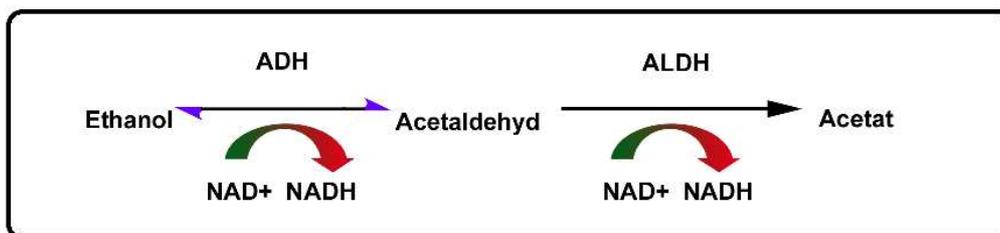


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Ethanolmetabolismus. Ethanol wird durch das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd oxidiert. Dieses wiederum wird durch das Enzym Aldehyddehydrogenase (ALDH) zu Acetat umgewandelt (modifiziert nach medscape http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/pediatrics_cardiac/1331339-1331349-1010220-1766148.jpg).

Bislang konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte ADH-Funktion sowohl die Ethanolpräferenz als auch die Aversion gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen beeinflusst (Ogueta *et al.*, 2010).

1.4 Das tyraminerge/oktopaminerger System bei *Drosophila melanogaster*

Um eine Präferenz für einen Stimulus ausbilden zu können, muss dieser Stimulus als positiv betrachtet werden. Beim olfaktorischen Lernen konnte gezeigt werden, dass das oktopaminerger System für die Weiterleitung und die Verarbeitung des Belohnungssignals notwendig ist, jedoch nicht für die Duftwahrnehmung und die generelle Lernfähigkeit

(Schwärzel *et al.*, 2003; Schroll *et al.*, 2006). Oktopamin ist somit notwendig, um einen Umwelteinfluss als positiv einzuschätzen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ein Lichtstimulus in tyraminergen/oktopaminergen Neuronen ausreichend ist, um das Zuckerbelohnungssignal im larvalen Lernen zu ersetzen (Schroll *et al.*, 2006). Nicht nur in der Fliege ist Oktopamin wichtig, sondern auch in der Honigbiene. Hier konnte gezeigt werden, dass das oktopaminerge Neuron VUMmx1 mit Hilfe von Oktopamin assoziatives Lernen induzieren kann. Um zu überprüfen, ob dieses Neuron als Vermittler für den positiven Stimulus dient, wurde der Duft mit einer Injektion von Oktopamin anstelle einer Zuckerapplikation gepaart. Hierdurch konnte der Rüsselreflex auf den Duft konditioniert werden (Hammer und Menzel, 1998).

Tyramin ist ein Neurotransmitter, der aus der Aminosäure Tyrosin durch die Tyrosin-Decarboxylase (TDC) synthetisiert wird (Livingstone und Tempel, 1983). Das biogene Amin Oktopamin, welches als Neurotransmitter, Neuromodulator und Neurohormon agieren kann, wird durch die Tyramin- β -Hydroxylase (T β H) aus Tyramin (Abbildung 1.2) hydrolysiert (Roeder, 1999). Fliegen, in denen das Gen, welches für das Enzym Tyramin- β -Hydroxylase codiert, mutiert ist, weisen ein erhöhtes Level an Tyramin auf und besitzen kein nachweisbares Level an Oktopamin (Monastirioti *et al.*, 1996).

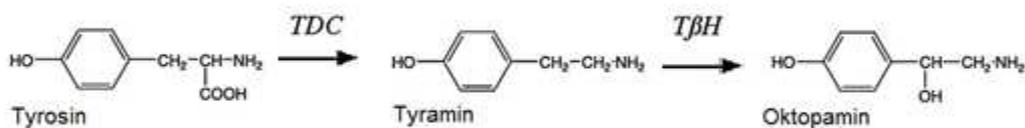


Abbildung 1. 2: Syntheseweg von Oktopamin. Tyrosin wird durch die Tyrosin-Decarboxylase (TDC) zu Tyramin decarboxyliert. Tyramin wird anschließend von der Tyramin- β -Hydroxylase (T β H) zu Oktopamin hydrolysiert (modifiziert nach Roeder, 2005).

Um Defekte oder Veränderungen im Verhalten nachvollziehen zu können, muss auch die zelluläre Ebene betrachtet werden. Daher ist es wichtig zu wissen, in welchem Bereich des Nervensystems Oktopamin-immunreaktive oder Tyramin-immunreaktive Neurone vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass im larvalen zentralen Nervensystem alle Oktopamin-immunreaktiven Somata an der Mittellinie des ventralen Ganglions angeordnet sind, während die optischen Loben keine Oktopamin-immunreaktiven Somata aufweisen (Monastirioti *et al.*, 1995). Die T β H-Expression im larvalen zentralen Nervensystem zeigt ein ähnliches Muster. Jedoch befinden sich mehr Zellkörper in der ventralen Mittellinie der abdominalen Neuromere (Monastirioti *et al.*, 1996). Im adulten zentralen Nervensystem hingegen befinden sich die Oktopamin-immunreaktiven Neurone im Gehirn und nicht nur im

thorakal-abdominalen Ganglion. Diese unpaarigen und bilateralen Neurone befinden sich in Clustern verteilt. Im thorakal-abdominalen Ganglion hingegen befinden sich die Oktopamin-immunreaktiven Zellen wieder entlang der ventralen Mittellinie (Abbildung 1.3). Im larvalen zentralen Nervensystem wurden 40 Oktopamin-immunreaktive Neurone und im adulten zentralen Nervensystem 70 Oktopamin-immunreaktive Neurone in den verschiedenen Clustern gefunden (Monastirioti, 1999).

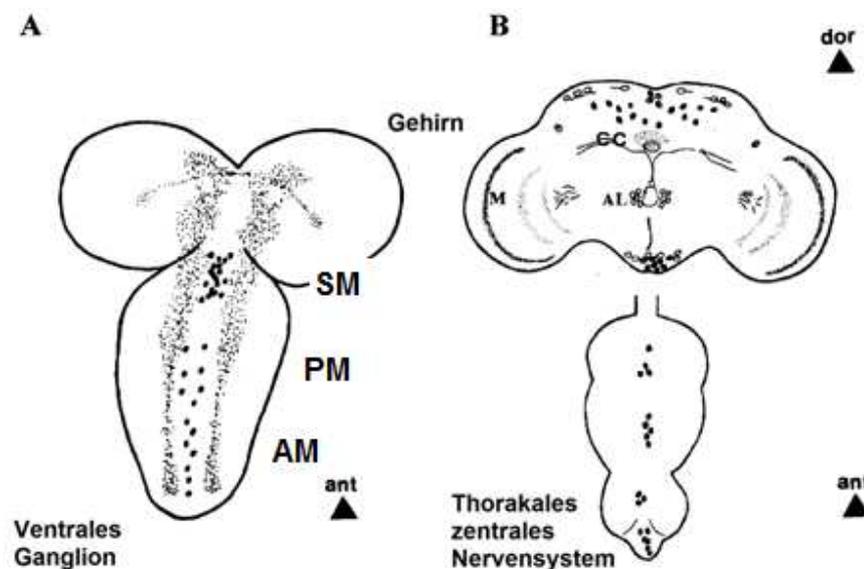


Abbildung 1.3: Übersicht über die Oktopamin-immunreaktiven Neurone im larvalen ventralen Ganglion (A) und im zentralen Nervensystem und dem thorakal-abdominalen Ganglion von adulten *Drosophila melanogaster* (B). Die schwarzen Punkte symbolisieren die Lage der Neurone entlang der Mittellinie des thorakal-abdominalen Ganglions bzw. der verschiedenen Cluster im zentralen Nervensystem und geben nicht die tatsächliche Anzahl wieder. CC: zentraler Komplex, AL: Antennalloben, M: Medulla, ant: anterior, dor: dorsal (modifiziert nach Monastirioti, 1999).

Mit Hilfe von Antikörperfärbungen gegen Oktopamin identifizierten Sinakevitch und Strausfeld 108 Oktopamin-immunreaktive Neurone, welche in 15 Cluster eingeteilt wurden. Diese Oktopamin-immunreaktiven Neurone im Gehirn innervieren die Hauptneuropile, wie die optischen Loben, die Glomeruli der Antennalloben und den Pilzkörper (Sinakevitch und Strausfeld, 2006). Die Oktopamin-immunreaktiven Neurone des thorakal-abdominalen Ganglions hingegen versorgen periphere Effektororgane mit Oktopamin (Monastirioti, 2003).

Eine neuere Arbeit von Busch *et al.* (2009) kartiert die GAL4-Expressionsdomänen zweier GAL4-Linien und identifiziert durch Antikörperfärbungen gegen Oktopamin einzelne Oktopamin-immunreaktive Neurone. Diese Neurone bilden charakteristische Zellcluster, welche anhand ihrer Lage benannt wurden. In adulten Gehirnen von Fliegen der Fliegenlinie *NP7088* wurden ca. 56 und in der Fliegenlinie *dTdc2-GAL4* ca. 61 Oktopamin-immunreaktive Neurone gefunden (Busch *et al.*, 2009). Der Oktopamin-immunreaktive Zellcluster im

Unterschlundganglion (SOG), der VM-Cluster, wird hierbei in drei Untercluster, den VM mandibularen (VMmd), maxillaren (VMmx) und labialen (VMlb) Cluster eingeteilt (Sinakevitch und Strausfeld, 2006; Busch *et al.*, 2009; Busch und Tanimoto, 2010). Sinakevitch und Strausfeld (2006) konnten in *Oregon R*-Fliegen 100 Oktopamin-immunreaktive Neurone in verschiedenen Clustern nachweisen.

1.5 Geschmackswahrnehmung bei *Drosophila melanogaster*

Der Geschmack von Ethanol wird von den meisten Ethanol-naiven Säugetieren, wie z. B. von Ratten und Menschen, als bitter angesehen (Kiefer und Dopp, 1989; Scinska *et al.*, 2000). Wird den Fliegen an den gustatorischen Neuronen der Tarsen oder des Labellums ein wohlschmeckender Stimulus angeboten, so strecken sie ihren Proboscis aus, um dieses vermeintliche Futter aufzunehmen (Falk und Atida, 1975; Stocker, 1994). Der pure Geschmack von Ethanol alleine kann in verschiedenen Konzentrationen diesen Reflex nicht auslösen, jedoch durch die Zugabe von Saccharose löst Ethanol bis hin zu einer Konzentration von 40 % den Rüsselreflex aus (Devineni und Heberlein, 2009).

Fliegen schmecken durch spezifische chemosensorische Borsten, die auf dem Proboscis, den Tarsen, den Flügelrändern und bei Weibchen auf der Vaginalplatte (Abbildung 1.4 blaue Kreise) vorhanden sind (Stocker, 1994). Die gustatorischen Neurone liegen in Sensillen. Diese Sensillen besitzen nur eine Pore und enthalten chemosensorische und mechanosensorische Zellen (Falk *et al.*, 1976; Hallem *et al.*, 2006). Die Geschmacksneurone projizieren entweder in das subösophageale Ganglion (SOG) oder in periphere Ganglien (Stocker und Schorderet, 1981; Stocker, 1994).

Ein wichtiges Gen bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems ist *pox neuro (poxn)*, welches für einen Transkriptionsfaktor codiert (Bopp *et al.*, 1989). *poxn* bestimmt, ob ein externes sensorisches Organ zu einem monoinnervierten, also zu einem mechanischen Rezeptor, oder zu einem polyinnervierten, also zu einem chemischen Rezeptor, wird (Dambly-CHaudière *et al.*, 1992; Awasaki und Kimura, 1997). Daher werden in *poxn loss-of-function* Mutanten alle chemosensorische Borsten in mechanosensorische Borsten umgewandelt. Hierdurch verlieren die Fliegen die Fähigkeit zu schmecken (Awasaki und Kimura, 1997).

1.6 Duftwahrnehmung bei *Drosophila melanogaster*

Der Geruchssinn vermittelt wichtige Verhaltensantworten in Insekten, wie z. B. die Suche nach Futter oder einem möglichen Partner. Insekten können volatile Düfte mit ihren auf den Antennen und maxillaren Palpen befindlichen olfaktorischen Rezeptorneuronen erkennen (Abbildung 1.4 a: rote Punkte und b). Diese olfaktorischen Rezeptorneurone exprimieren Duftrezeptoren (Or, von *olfactory receptor*), wobei jedes olfaktorische Rezeptorneuron nur einen Rezeptor exprimiert. Die Rezeptorneurone projizieren mit ihren Axonen zu den Glomeruli der Antennalloben und zu höheren Gehirnregionen (Stocker, 1994; Review Imai *et al.*, 2010).

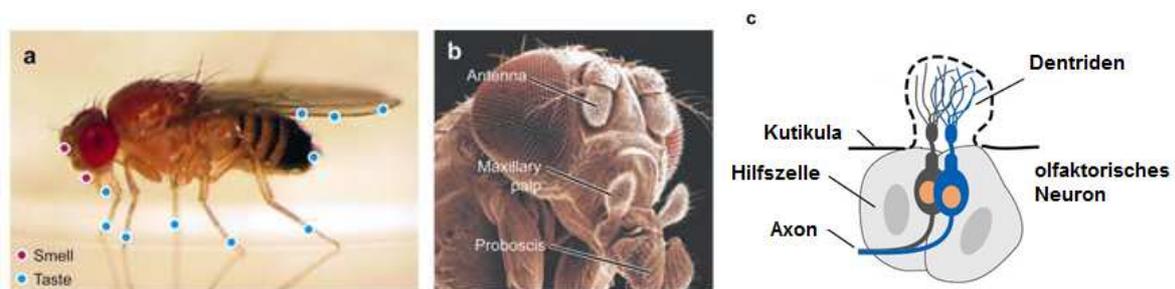


Abbildung 1.4: Lokalisation der Sinnesorgane bei *Drosophila melanogaster*. A) Die Sensillen sind auf den Antennen und den maxillaren Palpen lokalisiert. Rote Punkte symbolisieren olfaktorische und blaue Punkte gustatorische Neurone. B) Lage der Antennen (Antenna), des maxillaren Palpen (Maxillary palp) und des Proboscis am Kopf der Fliege. C) Dargestellt ist ein schematischer Aufbau eines Sensillum mit zwei olfaktorischen Rezeptorneuronen (modifiziert von Vosshall und Stocker, 2007).

Die olfaktorischen Rezeptorneurone liegen in haarähnlichen chemosensorischen Sensillen (Abbildung 1.4 C). Diese sind innen hohl und beherbergen die Dendriten von einem bis vier olfaktorischen Rezeptorneuronen. Durch spezifische Hilfszellen findet die Ausschüttung von Lymph in den Sensillen statt. In dieser befinden sich Duftbindungsproteine, die eine Rolle in der Liganden-spezifischen Duftwahrnehmung spielen (Review Vosshall und Stocker, 2007; Imai *et al.*, 2010).

Ein gut untersuchtes Duftbindungsprotein ist LUSH. Die Duftbindungsprotein-Mutante *lush* wird von hohen Alkoholkonzentrationen mehr angezogen als wildtypische Fliegen, für die hohe Konzentrationen nicht attraktiv sind (Kim *et al.*, 1998). Anhand der Kristallstruktur von LUSH konnte eine einzige Alkoholbindungsstelle im LUSH-Alkoholkomplex identifiziert werden (Kruse *et al.*, 2003; Thode *et al.*, 2008). Die Bindung von Alkohol an LUSH führt zu einer stabileren Konformation von LUSH (Bucci *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu steht eine Arbeit von Zhou *et al.* (2004), die den Defekt der *lush* Mutante in der Vermeidung hoher Alkoholkonzentrationen den in den Plastikgefäßen vorkommenden Weichmachern zuschreibt.

Bei den Duftrezeptoren (Abbildung 1.5) sind zwei Arten zu unterscheiden. Zum einen gibt es Duftrezeptoren, die ein spezielles Duftligandenprofil aufweisen und zum anderen den zwischen den einzelnen Insekten spezialisierten, speziellen Duftrezeptor Or83b (Hill *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2003; Pitts *et al.*, 2004; Larsson *et al.*, 2004). Dieser Duftrezeptor ist nicht direkt in der Dufterkennung involviert (Elmore *et al.*, 2003). Or83b wirkt als chaperonischer Corezeptor, der mit den anderen Duftrezeptoren einen heteromeren Komplex ausbildet (Larsson *et al.*, 2004; Neuhaus *et al.*, 2005; Benton *et al.*, 2006). Außerdem ist Or83b wichtig, um die Duftrezeptoren an die Zilie zu transportieren (Benton *et al.*, 2006). Ist das Gen für *Or83b* deletiert, so zeigen *Drosophila*-Larven keine Chemotaxis gegenüber vielen Düften und adulte *Drosophila*-Fliegen zeigen schwere Defizite in der durch Duft hervorgerufenen elektrophysiologischen Antwort sowie in ihrem Verhalten gegenüber Düften (Larsson *et al.*, 2004). Jedoch gibt es auch von Or83b unabhängige Duftwahrnehmung, wie z. B. die CO₂-Wahrnehmung, die durch gustatorische Rezeptoren erfolgt (Suh *et al.*, 2004). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass auch eine duftabhängige Antwort zu erkennen ist, wenn nur ein normaler Duftrezeptor exprimiert wird (Wetzel *et al.*, 2001; Sakurai *et al.*, 2004), jedoch wird die Antwort mit Or83b stärker ausgeprägt (Neuhaus *et al.*, 2005). Das bedeutet, dass ein Homomer ausreichen würde, um die Dufterkennung zu gewährleisten (Wetzel *et al.*, 2001; Sakurai *et al.*, 2004; Neuhaus *et al.*, 2005). Jedoch wurde die Bildung von Homomeren nur bei Or83b beobachtet und nicht bei anderen Duftrezeptoren (Benton *et al.*, 2006).

Zusätzlich zu den Duft- und den Geschmacksrezeptoren, die für die Duftwahrnehmung eingesetzt werden, gibt es ionotrope Rezeptoren. Diese werden in Sensillen exprimiert, in denen keine Duftrezeptoren und Or83b exprimiert bzw. Geschmacksneurone vorhanden sind. Die ionotropen Rezeptorproteine dienen als ligandenspezifische-chemosensorische Rezeptoren (Benton *et al.*, 2009). Ionotrope Rezeptoren können Ammoniak, Amine, Wasser und Alkohole wahrnehmen (Yao *et al.*, 2005; Benton *et al.*, 2009).

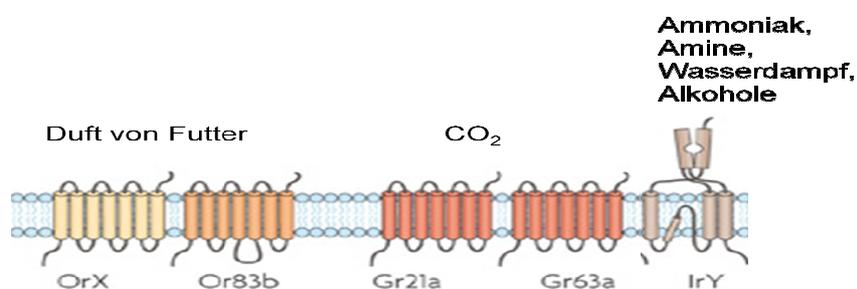


Abbildung 1.5: Übersicht über die Rezeptoren, die an der Duftwahrnehmung beteiligt sind. Die Duftrezeptoren (Or) und der Corezeptor Or83b sind für die Erkennung vieler Düfte von Futter verantwortlich. Die Geschmacksrezeptoren Gr21a und Gr63a detektieren Kohlenstoffdioxid und die ionotropen Rezeptoren (Ir) detektieren Ammoniak, Amine, Wasserdampf und verschiedene Alkohole (modifiziert von Kaupp, 2010).

1.7 Ziele der Dissertation

Ziel dieser Dissertation war es, die mechanistischen Grundlagen der Ethanolpräferenz von *Drosophila melanogaster* zu erforschen. Präferenz ist eine Antwort auf einen Umwelteinfluss, der als positiv bewertet wurde. Da positiv assoziiertes Lernen von Oktopamin abhängt (Schwärzel *et al.*, 2003), sollte die Rolle des für die Oktopaminsynthese wichtigen Enzyms Tyramin- β -Hydroxylase in der Entwicklung von Präferenz näher untersucht werden. Fliegen ohne Oktopamin zeigen keine Ethanolpräferenz. Um zu testen, ob der Verlust der Tyramin- β -Hydroxylase in der $T\beta H^{nM18}$ -Mutante tatsächlich zur fehlenden Präferenz führt, sollte die Präferenz durch Expression von T β H in verschiedenen Neuronen in der $T\beta H^{nM18}$ -Mutante mit Hilfe verschiedener GAL4 Treiberlinien wieder hergestellt werden. Anhand von immun-histochemischen Färbungen sollte anschließend herausgefunden werden, welche Neurone benötigt werden, um eine Präferenz für Ethanol auszubilden. Weiterhin sollte der Einfluss der olfaktorischen und gustatorischen Sinneswahrnehmung auf die Präferenz untersucht werden. Da Ogueta *et al.* (2010) zeigen konnte, dass das erste Enzym im Ethanolmetabolismus, die Alkoholdehydrogenase, einen Einfluss auf die Präferenz ausübt, sollte untersucht werden, ob dieser Einfluss auf die Anreicherung des toxischen Zwischenprodukts Acetaldehyd zurückzuführen ist.

Mit Hilfe der Expression des kationenselektiven Ionenkanals Channelrhodopsin-2 (ChR2) in tyraminerger/oktopaminerger Neuronen konnten in Larven Neurone aktiviert werden und der Einfluss dieser Aktivierung auf das Verhalten untersucht werden (Nagel *et al.*, 2003; Schroll *et al.*, 2006). Mit Hilfe von optogenetischen Manipulationen und Lichtimpulsen sollte im Gehirn der adulten Fliege tyraminerge/oktopaminerger Neurone aktiviert werden und damit eine Präferenz ausgelöst werden.

2. Material und Methoden

2.1 Fliegenstämme

w^{1118}	Lindsley und Zimm, 1992
$w^-; +; Or83b^1$	Larsson <i>et al.</i> , 2004
$w^-; +; Or83b^2$	Larsson <i>et al.</i> , 2004
$w^{1118}, T\beta H^{nM18}/FM7$	Monastirioti <i>et al.</i> , 1996
$w^{1118}, T\beta H^{nM18}, UAS-T\beta H/FM7$	Scholz, Universität zu Köln
$w^+/FM7$	Scholz, Universität zu Köln
$w^+, T\beta H^{nM18}/FM7$	Scholz, Universität zu Köln
$w^{1118}; pUAS-T\beta H/FM7$	Scholz, Universität zu Köln
$w^{1118};; 6.2_2T\beta H-GAL4$	Hampel, 2007
$w^{1118};; 1.3T\beta H-GAL4_1$	Hampel, 2007
$w^{1118}; dTdc2-GAL4$	Cole <i>et al.</i> , 2005
$w^{1118}; +; Cha^{3.3kb}-GAL80$	Keene <i>et al.</i> , 2004
$w^{1118}; NP7088$	Bush <i>et al.</i> , 2009, ausgekreuzt M. Ruppert
$w^{1118}; Feb\ 15-GAL4$	Siegmund und Korge, 2001
$w^{1118}; Jan178-GAL4$	Siegmund und Korge, 2001
$w^{1118}; Jan191-GAL4$	Siegmund und Korge, 2001
$w^{1118} Sep54-GAL4/FM7-GFP$	Siegmund und Korge, 2001
$w^{1118}; +; Mai301-GAL4$	Siegmund und Korge, 2001
$y^1 w^-; P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL5$	Lee und Luo, 1999
$w^{1118}; dTdc2-GAL4; Cha^{3.3kb}-GAL80$	Schneider, Universität zu Köln
$w^-; Poxn^{\Delta M22-B5} P\{W6\ poxn_resc\} SuperA158$	Boll und Noll, 2002

<i>w</i> ⁻ ; <i>Poxn</i> ^{ΔM22-B5} P{W6 <i>poxn_resc</i> } Δ <i>SfoBs</i> 105	Boll und Noll, Universität Zürich
<i>w</i> ⁻ ; <i>Poxn</i> ^{ΔM22-B5} P{W6 <i>poxn_resc</i> } Δ <i>SfoBs</i> 127	Boll und Noll, Universität Zürich
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>tubP</i> -GAL80 ^{ts} ; <i>UAS-Kir</i> 2.1	Claridge-Chang <i>et al.</i> , 2009
<i>w</i> ⁻ ; P{ <i>tubP</i> -GAL80 ^{ts} }10; <i>TM2/TM6b, Tb</i> ¹	McGuire <i>et al.</i> , 2003
<i>y</i> ¹ <i>w</i> ⁻ ; <i>Pin</i> ^{Yt} /CyO; P{ <i>UAS-mCD8::GFP.L</i> }LL6	Lee und Lou, 1999
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; P{ <i>tubP</i> -GAL80 ^{ts} }10; P{ <i>UAS-mCD8::GFP.L</i> }LL6	Schneider, Universität zu Köln
<i>norpA</i> ⁻ ; <i>UAS-ChR2</i> ; <i>UAS-ChR2</i>	Nuwal, 2010
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>UAS-Chr2</i> ; <i>UAS-ChR2</i>	Schroll <i>et al.</i> , 2006
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>sp</i> /CyO; <i>TM2/TM6b, Tb</i> ¹	Klämbt, Universität Münster
<i>Df(2L)N22-14/CyO</i>	Collier und Gubb, 1997
24 <i>J</i> (ALDH Mutante)	Fry, Universität Rochester
14 <i>B</i> (ALDH Kontrolle)	Fry, Universität Rochester
17 <i>H</i> (ALDH Mutante)	Fry, Universität Rochester
<i>w</i> ⁻ ; +; <i>lush</i> ⁻ (<i>obp76a</i>)	Kim <i>et al.</i> , 1998
<i>w</i> ⁻ ; <i>ET249</i>	Kim <i>et al.</i> , 1998
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>Lush Rescue obp76a</i>	Kim <i>et al.</i> , 1998
<i>w</i> ⁻ ; +; <i>th, lush, e</i>	Kim <i>et al.</i> , 1998
<i>w</i> ¹¹¹⁸ (genetischer Hintergrund für <i>lush</i> ⁻)	Kim <i>et al.</i> , 1998
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>dTdc2</i> -GAL4/CyO; <i>Cha</i> ^{3.3kb} -GAL80/ <i>TM6, Tb</i> ¹	Schneider, Universität zu Köln
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>sp</i> /CyO; 6.2_2 <i>TβH</i> -GAL4/ <i>TM6, Tb</i> ¹	Schneider, Universität zu Köln
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>sp</i> /CyO; 6.2_2 <i>TβH</i> -GAL4/ <i>TM2</i>	Schneider, Universität zu Köln
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>sp</i> /CyO; <i>lush</i> ⁻ / <i>TM2</i>	Schneider, Universität zu Köln
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>sp</i> /CyO; <i>lush</i> ⁻	Schneider, Universität zu Köln

2.2 *Drosophila melanogaster* Aufzucht und Haltung

Die Aufzucht und Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgt auf einem Nährbrei aus 180 g Maisgries, 1 l Wasser, 10 g Sojamehl, 18,5 g Cenovis, 7,5 g Agar-Agar, 40 g Zuckerrübensirup, 40 g Diamalt und 2,5 g Nipagin. Sowie einem Brei, der 60 g Maisgries, 15 g Hefe, 8 g Agar, 0,08 l Zuckerrübensirup, 2,87 ml Propionsäure und 8 ml Nipagin gelöst in 100 % Alkohol enthält. Die Fliegenstöcke werden in Klimaräumen bzw. Brutschränken mit einem definierten Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h bei 18 °C bzw. bei 25 °C mit 65 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

2.3 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Serva, Sigma, AppliChem, Serva und GibcoBRL bezogen. Enzyme wurden von Fermentas, Roche, ABgene und Invitrogen bezogen und laut Herstellerangaben verwendet. *All-trans* Retinal wurde von Roche und von Molekula bezogen.

2.4 Antikörper

Mouse anti-GFP	1:50	Invitrogen
Chicken anti-GFP	1:1000	Gene Tex
Rabbit anti-TβH	1:500	Zhou <i>et al.</i> , 2008
Goat anti-Chicken Alexa Fluor 488	1:1000	Invitrogen
Goat anti-Rabbit Cy3	1:200	Jackson Immuno Research
Goat anti-Mouse Alexa Fluor 488	1:200	Invitrogen
Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 546	1:500	Invitrogen

2.5 Nukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Metabion bezogen und in einer Konzentration von 10 pmol verwendet.

Primer für *lush* aus Kim *et al.*, 1998 (modifiziert)

- lush-Kim sense 5'- GAA GCT TGT CGG GAT ACG- 3'
- lush-Kim anti 5'- TTA AGG CCA CAT GAA CTG- 3'

Das unterstrichene C ist in Kim *et al.* (1998) als A angegeben, laut Flybase ist die richtige Sequenz ein C. Diese Oligonukleotide amplifizieren eine cDNA Sequenz von 108 bp und eine DNA-Sequenz von 172 bp im Gen für *lush* (+6 bis +178)

- G6PDF-Primer 5' - ATG ACG GAC GCA CTG GCT TCG AGC TGC – 3'
- G6PD2.antigroß 5' - GCC CAG CAC CAT GTC ATC CA – 3'

amplifiziert mit G6PDF-Primer eine cDNA Sequenz von 583 bp und eine DNA-Sequenz von 699 bp im Gen für *zwischenferment* (+347 bis +1046)

2.6 Lösungen

2.6.1 Lösungen für Immunhistochemie

PBS (10x)	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	2 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7.4
PBT	1x PBS mit 0,3 % bzw.
	1x PBS mit 0,5 % Triton X-100
<i>Drosophila</i> Ringer	110 mM NaCl
	4,7 mM KCl
	20 mM MgCl ₂
	0,74 mM KH ₂ PO ₄
	0,35 mM Na ₂ PO ₄
	pH 7,4

2.6.2 Lösungen für DNA-Methoden

Homogenisierungspuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM EDTA 0,5 % SDS
TE-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM EDTA pH 8,0 ddH ₂ O, auf 1 Liter auffüllen pH 8,0
Beladungspuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glycerol 1 % SDS
TBE (10x)	500 mM Tris/HCl pH 8,0 500 mM Borsäure H ₃ BO ₃ 25 mM EDTA pH 8,0

2.7 Molekulargenetische Methoden

2.7.1 Isolierung genomischer DNA aus adulten Fliegen

Die Isolierung genomischer DNA aus adulten *Drosophila* erfolgt nach dem Protokoll von Steller und Pirrotta von 1986. Die isolierte genomische DNA wird in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Um RNA-Verunreinigungen zu entfernen, wird ein RNase-Verdau bei 37 °C angeschlossen.

2.7.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion wird der Thermo-Start Master Mix von ABgene verwendet. Für einen 50 µl Ansatz werden 35 µl Master Mix, jeweils 1 µl 10 pmol Primer und die gewünschte Menge cDNA eingesetzt und mit ddH₂O aufgefüllt. Das Programm wird wie folgt gewählt:

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1. Initiale Denaturierung	95	15
2. Denaturierung	95	1
3. Primer-Hybridisierung	50	1
4. Polymerisation	72	1
Wiederholung der Schritte 2 - 4: 25, 28, 31 und 34-mal		
Abschließende Polymerisation	72	10

2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Es werden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,8 – 2,0 % Agarose, je nach Fragmentgröße, verwendet. Für die Bestimmung der Fragmentgrößen wird der Größenmarker GeneRuler 50 bp DNA Ladder von Fermentas verwendet.

2.7.4 Isolierung von totaler RNA aus adulten Fliegen

Mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits von QIAGEN wird die gesamte totale RNA aus adulten Fliegen gewonnen. Die Arbeitsschritte erfolgen auf Eis nach dem Protokoll des Herstellers. Die isolierte totale RNA wird durch einen einstündigen DNase-Verdau (1 µl DNase pro Ansatz) bei 37 °C von genomischer DNA befreit. Der Verdau wird durch zehnmütiges Erhitzen auf 95 °C abgestoppt. In einer anschließenden reversen Transkription wird die RNA in cDNA umgeschrieben.

2.7.5 Reverse Transkription von mRNA

Die isolierte RNA wird mit Hilfe der reversen Transkriptase (SuperScript II von Invitrogen) laut Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Nach dem Umschreiben wird die in der Reaktion verbliebene RNA durch Zugabe von 1 µl DNase-freier RNase (Roche) bei 37 °C für 30 Minuten verdaut.

2.8 Immunhistochemische Methoden bei *Drosophila melanogaster*

2.8.1 *Whole-mount* Präparationen und Antikörperfärbungen von larvalen Gehirnen

Whole-mount Präparationen und die anschließende Immunhistochemie von larvalen Gehirnen werden an Larven des dritten Larvenstadiums nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Die Waschschriffe erfolgen mit 0,3 % PBT. Das Blockieren freier Bindungsstellen erfolgt mit 5%igen fetalem Kälberserum verdünnt in 0,3 % PBT. Die in Glycerin/PBS-Gemisch entwässerten larvalen Gehirne werden auf einen Objektträger in einem Tropfen Vectashield (Burlingame, CA) eingebettet.

2.8.2 *Whole-mount* Präparationen und Antikörperfärbungen von adulten Gehirnen

Die zwei bis fünf Tage alten adulten Fliegen werden mit Hilfe von CO₂ betäubt und in ein Schälchen mit 100%igem Alkohol überführt. Die Präparation erfolgt nach dem Standardprotokoll. Die Waschschriffe erfolgen mit 0,5 % PBT und das Blockieren freier Bindungsstellen mit 5%igem fetalem Kälberserum. Nach dem Aufklären in 50 % Glycerin/50 % PBS werden die adulten Gehirne in Vectashield (Burlingame, CA) eingebettet.

2.9 Herstellung von Fliegenstöcken

Zur Herstellung von Fliegenstämmen mit mehreren Konstrukten wurde ein Multibalancer-Stock (Klämbt, Universität Münster) verwendet.

Die GAL4 Treiberlinie *dTdc2-GAL4* (Cole *et al.*, 2005) wurde mit der Fliegenlinie *Cha*^{3.3kb}-GAL80 (Keene *et al.*, 2004) gekreuzt, um eine verringerte Anzahl der GAL4-

Expressionsdomänen zu erhalten. Durch den cholinergen Promotor wird GAL80 in allen cholinergen Zellen exprimiert und es reprimiert in diesen GAL4 (Review Duffy, 2002).

Die Fliegenlinien $w; P\{tubP-GAL80^{ts}\}10; TM2/TM6b, Tb^1$ (McGuire *et al.*, 2003) und $y^1 w; Pin^{Yt}/CyO; P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL6$ (Lee und Lou, 1999) wurden gekreuzt, um den Einfluss eines zusätzlichen Konstrukts auf das Verhalten zu untersuchen.

2.10 Verhaltensversuche mit adulten *Drosophila melanogaster*

2.10.1 Messung der Ethanolpräferenz

Um die Präferenz von Fliegen für eine bestimmte Substanz, hier vor allem Ethanol, zu untersuchen, wird der Präferenz-Assay verwendet. Dieser wird wie in Ogueta *et al.* (2010) beschrieben durchgeführt. Der Aufbau des Assays ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

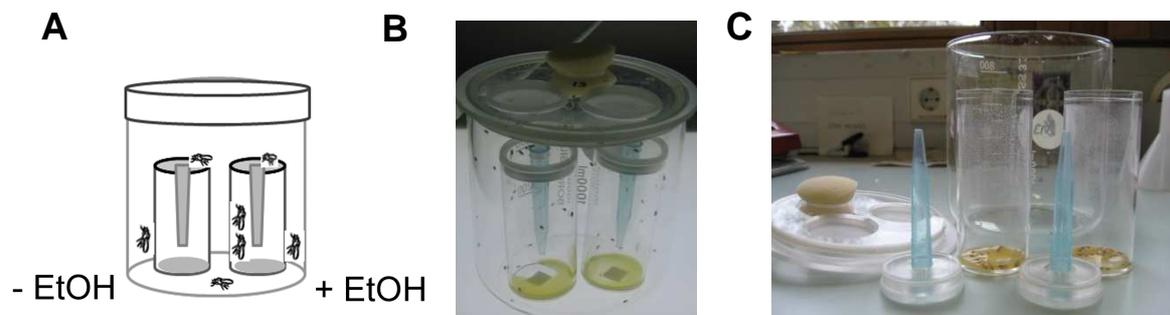


Abbildung 2.1: Aufbau des Präferenz-Assays. A zeigt den schematischen Aufbau der Messapparatur für Ethanolpräferenz. B) Der Versuch wird auf einer Kaltlichtquelle durchgeführt. C) Gezeigt sind die einzelnen Bestandteile des Assays (modifiziert von Larsson *et al.*, 2004).

Nachdem die Fliegen für ca. 16 Stunden zwischen zwei Lösungen – mit Alkohol bzw. ohne Alkohol – wählen konnten, wurde die Anzahl der Fliegen in beiden Lösungen und außerhalb der Gefäße bestimmt. Mit Hilfe folgender Formel wurde der Präferenzindex (PI) berechnet:

$$PI = \frac{\text{Anzahl der Fliegen im Saft mit Ethanol} - \text{Anzahl der Fliegen im Saft}}{\text{Anzahl der Fliegen in beiden Ansätzen}}$$

Der Präferenzindex liegt zwischen -1 und +1 und gibt an, wie viele Fliegen sich für die zu testende Substanz entschieden haben. Es wird definiert, dass ein positiver PI-Wert als Präferenz angesehen wird und ein negativer PI-Wert als Aversion bezeichnet wird. Von den PI-Werten der Wiederholungen wird jeweils der Mittelwert berechnet und grafisch dargestellt. Die angegebenen Fehler entsprechen den Standardfehlern (SEM). Statistisch wird der Präferenz-Assay entweder durch ANOVA mit dem Posthoc-Test Tukey HSD oder bei zwei Gruppen durch den T-Test ausgewertet (vgl. Schneider, 2008; Ogueta *et al.*, 2010).

Außerdem wird durch den One sample Sign-Test der signifikante Unterschied zu null getestet. Ist der Wert unterschiedlich von null, so wird dies mit einem „a“ gekennzeichnet.

2.10.2 Optogenetische Aktivierung von Neuronen, die ausreichend für Präferenz sind

2.10.2.1 Aufbau der Apparatur

Um die optogenetische Aktivierung von Neuronen zu testen, die ausreichend für Präferenz sind, wurde eine neue Apparatur entwickelt. Diese Apparatur sollte dem Grundprinzip des Assays zur Messung der Ethanolpräferenz (siehe 2.10.1) entsprechen. Deswegen werden ebenfalls zwei mittlere Plexigläser mit ca. 68 ml Volumen mit dem passgenauen durchsichtigen Deckel, in den eine MultiFit 1000 µl Pipettenspitze von peqlab (Erlangen, Deutschland) exakt passt, verwendet. Diese Pipettenspitzen werden zuvor abgeschnitten, wodurch eine ca. 2 mm große Öffnung entsteht. In beiden Futterröhrchen wird ein ml Apfel-Mangosaft (Alnatura, Deutschland) eingefüllt und damit sollten beide Röhrchen für die Fliegen gleich attraktiv sein.

Um Lichtreize aus der Umgebung abzuschirmen, werden die Röhrchen mit dunkelgrauem Plastik umhüllt. Eine Bodenplatte stabilisiert den Aufbau. Auf dieser Platte befinden sich zwei graue Rohre, in die die beiden Futterröhrchen passen, so dass diese oben bündig mit einer Platte abschließen. Der Hohlraum über den Röhrchen ist 4,5 cm hoch und hat einen Innendurchmesser von 10,3 cm. Die Höhe der Plattform wurde so gewählt, dass das Licht der in den Deckel eingebauten Dioden (siehe Tabelle 2.1 und Anhang) nur den Deckel eines der beiden Futterröhrchen beleuchtet. Der Deckel hat einen Außendurchmesser von 11,5 cm und einen Innendurchmesser von ca. 10 cm. Die Dioden sind mittig im Abstand von 5 cm zueinander angebracht. Vor jeder Diode befindet sich eine Linse (Carclo Linse für Cree XR-E, Lumitronix; Tabelle 2.1 und Anhang), um das Licht zu bündeln und eine genaue Ausleuchtung des Futterröhrchens zu gewährleisten. Durch eine Nut in der Plattformwand und der im Deckel befindlichen passenden Nase ist ein Verrutschen des Deckels nicht möglich. Der Deckel hat außerdem ein mit Gaze verschlossenes Belüftungsloch mit 3 cm Durchmesser, das 1,7 cm vom Mittelpunkt des Deckels entfernt ist und ein Loch zum Befüllen der Apparatur mit einem 2 cm Durchmesser, das 2,4 cm vom Mittelpunkt des Deckels entfernt ist. Die Dioden können jeweils getrennt voneinander angesteuert werden (Schaltplan im Anhang). Um später verschiedene Filter vor den Dioden testen zu können, wurden in den Deckel Einschübe gefräst. Der Aufbau und die elektrische Steuerung wurden in Zusammenarbeit mit J. Kaderschabek und K. Öchsner aus Würzburg entwickelt und gebaut. Die Ansteuerung erfolgt mithilfe eines Computers über den Druckerport. Das

Programm LPTfreq für die Ansteuerung der Dioden wurde von A. Eckart, Würzburg, über HiResTimer programmiert. In Abbildung 2.2 sind ein schematischer Aufbau des Korpus und des Deckels und vier einzelne Apparaturen dargestellt.

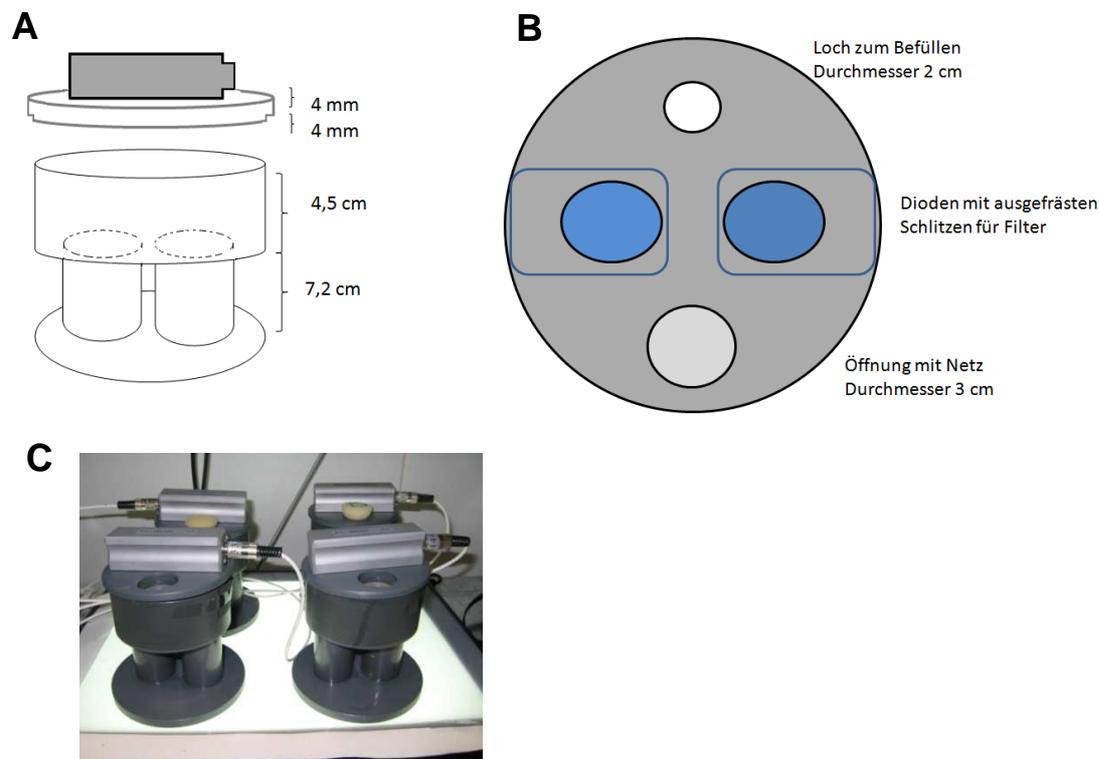


Abbildung 2.2: Aufbau der Messapparatur. A) Die beiden Wahlmöglichkeiten sind getrennt voneinander in lichtundurchlässigen Plastikrohren untergebracht. Die Fliegen können sich in der Plattform frei bewegen und sich damit frei zwischen den beiden Angeboten entscheiden. B) Schematische Ansicht des Deckels von unten mit den beiden Löchern und den beiden Dioden. C) Foto von vier Messapparaturen auf einer Kaltlichtquelle.

Tabelle 2.1: Bezeichnungsübersicht und Herstellerangaben der verwendeten Dioden, Linsen und Filter

Bezeichnung	Abkürzung im Text	Firma/bezogen	Bestellnummer
XR-E Cold White Q5	Kaltweiße Diode	Cree, Deutschland	XREWHT-L1-0000-00D01
XR-E Warm White P3	Warmweiße Diode	Cree, Deutschland	XREWHT-L1-0000-008E7
XR-E Blue K (465 – 485 nm)	Blaue Diode	Cree, Deutschland	XREBLU-L1-0000-00K01
Carclo Linse für Cree XR-E, 20-mm-Einstecklinse, frosted narrow	Linse	Lumitronix, Deutschland	60362
HEBO Y510; beidseitig poliert, 2 mm dick, 50x50 mm	Gelbfilter (510 nm)	HEBO Spezialglas, Deutschland	http://www.hebo-glass.com/table/detail_de/5

Um die Dioden auf die gleiche Beleuchtungsstärke einzustellen, wird der Deckel mit den Dioden auf den Korpus gesetzt, sodass die Dioden jeweils mit demselben Abstand vermessen werden können. Die Einstellung der Beleuchtungsstärke einer Diode bei konstantem Licht erfolgt mit Hilfe eines Luxmeters (Light Meter PeakTech 5025 von PeakTech, Deutschland). Hierfür wird die Einheit 200 x 10 Lux gewählt und die Stärke damit insgesamt auf 2000 Lux eingestellt. Die Genauigkeit beträgt ca. ± 500 Lux.

Wie in Abbildung 2.3 gezeigt, präferieren w^{1118} Fliegen keine Seite der Apparatur, wenn beide Dioden blau sind (465 – 485 nm, Cree, Deutschland). In diesem Versuch waren die Dioden zwei Sekunden mit einer Pulsfrequenz von 50 Hz, 16 Sekunden mit 5 Hz und zwei Sekunden mit einer Frequenz von 0 Hz angeschaltet. Als rechts wird die Diode bezeichnet, die am nächsten am Strom- und Steuerungssteckers ist. Das Ergebnis zeigt, dass beide Seiten für die Fliegen gleich attraktiv sind.

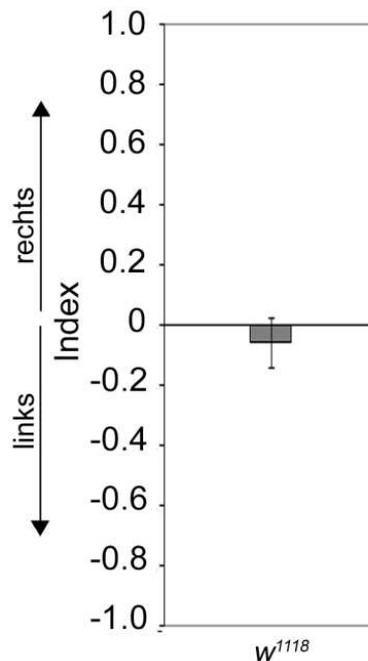


Abbildung 2.3: Fliegen zeigen in der Verhaltensapparatur keine Präferenz für eine Seite. Test von w^{1118} -Fliegen mit der Frequenz von 2 s 50 Hz, 16 s 5 Hz und 2 s 0 Hz (w^{1118} -0,06 \pm 0,08, n 0 19). Der Index wurde durch rechts/ (links + rechts) berechnet. Mittelwert \pm SEM. One sample Sign-Test für signifikanten Unterschied zu null (α , $p < 0,05$), T-Test $p^* < 0,05$.

Um die Funktionalität der Aktivierung von *UAS-ChR2* in tyraminergen/ $T\beta H$ -positiven Neurone durch die *dTdc2-GAL4*-Treiberlinie zu testen, wurde ein Ansatz mit zwei verschiedenen starken Weißlichtdioden gewählt. Eine Diode (Q5, 5.000 -10.000 K, Cree, Deutschland; kalt weiß; siehe auch Anhang) strahlt kaltes weißes Licht mit einem hohen Blauanteil ab (Abbildung 2.4, blaue Kennlinie). Während die andere Diode (P3, 2.600 - 3.700 K, Cree Deutschland;

warm weiß, siehe auch Anhang) ein wärmeres weißes Licht abgibt mit verringertem Blauanteil und erhöhten Anteil anderer Wellenlängen (Abbildung 2.4, rote Kennlinie).

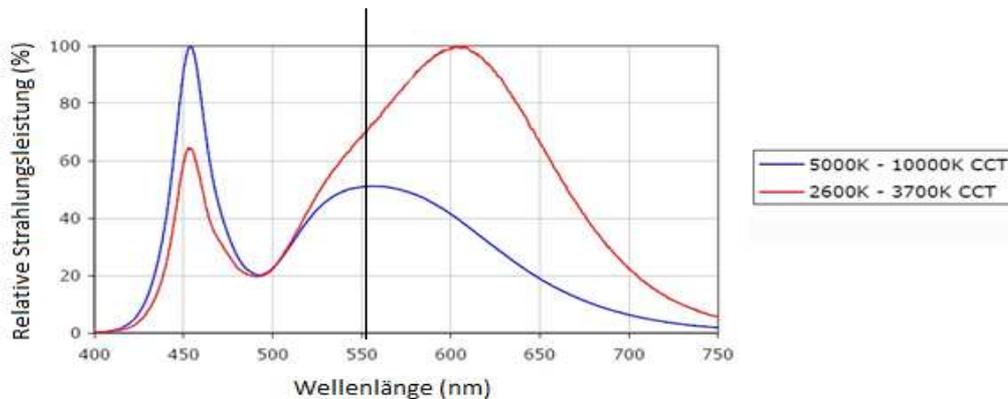


Abbildung 2.4: Übersicht über die Strahlungsleistung und die Wellenlänge der beiden verwendeten Weißlichtdioden. Die blaue Kennlinie ist die Kennlinie der kaltweißen Diode und die rote Linie der warmweißen Diode. Der senkrechte schwarze Strich zeigt die Wellenlänge des Gelbfilters an. Wellenlängen bis 510 nm werden durch diesen Filter herausgefiltert.

2.10.2.2 Aktivierung des Channelrhodopsin-2 (ChR2)

Der Kationenkanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) wird durch Anwesenheit von *all-trans* Retinal durch blaues Licht induziert (Nagel *et al.*, 2003; Schroll *et al.*, 2006). Die Versuchsgruppe wird mit *all-trans* Retinal haltigen Futter während der gesamten Entwicklung gefüttert. Die Kontrollgruppe wird mit Futter, in dem das Lösungsmittel enthalten ist, gefüttert. Für die Fütterung werden 150 µl entweder von 250 mM in Ethanol gelöstem *all-trans* Retinal oder 100 % Ethanol in ein mittleres Futterröhrchen mit Futterbrei eingerührt. Da *all-trans* Retinal lichtempfindlich ist, werden die Futterröhrchen mit Aluminiumfolie lichtdicht umwickelt. Auf diesen so präparierten Futtergläsern werden die Kreuzungen *dTdc2-GAL4* mit *UAS-ChR2*; *UAS-ChR2* bzw. *norpA*; *UAS-ChR2*; *UAS-ChR2* angesetzt. Nach dem Schlüpfen werden 85 - 100 männliche Fliegen gesammelt, für zwei Tage auf ein frisches mit *all-trans* Retinal oder Ethanol präpariertes Futter gesetzt und anschließend getestet.

2.10.2.3 Installation des Programms

Für die Installation des Programms LPTfreq wird das Betriebssystem Windows XP benötigt. Durch Doppelklicken auf das File RegisterXP.bat im Ordner HiResTimer wird HiResTimer installiert. Anschließend wird die Datei inpout32.dll nach c:\windows\system32\ kopiert. Nun kann das File LPTxyz.exe an die gewünschte Stelle, z. B. den Desktop kopiert werden. Nach der Installation des Programms kann der Paralleldruckerport des Computers mit einem 25-

poligen Druckerkabel mit dem Ansteuerungsgerät verbunden werden. Durch Einschalten des Schalters ist das Ansteuerungsgerät betriebsbereit.

2.10.2.4 Durchführung einer Versuchsreihe

Die in Abbildung 2.5 dargestellte Oberfläche des Programms LPTfreq bietet verschiedene Einstellungsmöglichkeiten. Mit dem rot umrandeten Bereich des LPT Ports, also der Ansteuerung des Druckerports, kann eingestellt werden, ob das Licht zu Beginn des Protokolls an oder aus ist, d. h. in der ersten oder zweiten Periodenhälfte der Frequenz die LEDs leuchten oder ausgeschaltet sind. Die dritte Zeile „stopped exp.“ gibt an, wie die Dioden geschaltet sind, wenn das Experiment noch nicht gestartet wurde. Ist hier nichts selektiert, so sind die Dioden aus. Der gelb umrandete Bereich des „Exp Time Table“ (Experiment Time Table) dient der Einstellung der im Versuch benötigten Frequenzen. Hier können drei verschiedene Zeitintervalle mit den entsprechenden Frequenzen eingestellt werden, die nacheinander angesteuert werden. Im hellblau umrandeten Feld „iterations“ werden die Wiederholungen der oben eingestellten Frequenzen festgelegt. In dem orange umkreisten Feld wird dann die gesamte Dauer des Versuchs in Millisekunden angezeigt (expected length). Mit dem Start-Button (lila Pfeil) wird das Programm gestartet. Nach dem Start wird aus diesem Button ein Stopp Button. Der pink gekennzeichnete Bereich zeigt den gerade durchlaufenen Frequenzzyklus an. Durch den Exit-Button (hellblauer Pfeil) wird das Programm verlassen.

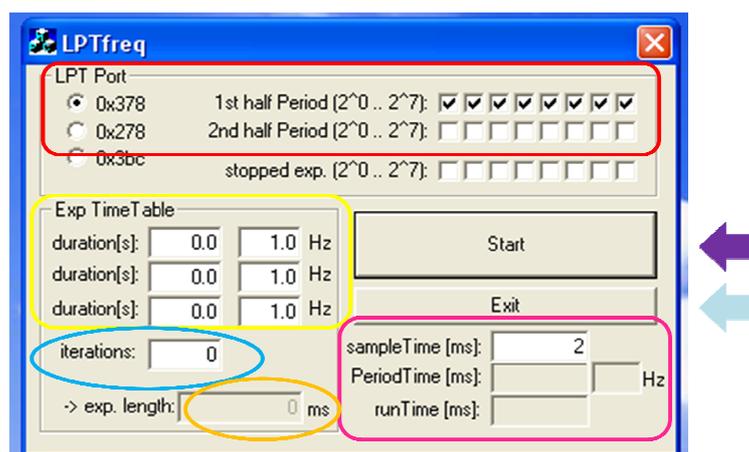


Abbildung 2.5: Oberflächenmaske des LPTfreq Programms. Die durch verschiedene Farben markierten Bereiche stellen die verschiedenen Funktionen des Programms dar. Eine nähere Erläuterung befindet sich im Text.

In dem gelben Bereich kann nun eine Frequenz, z. B. des spezifischen Hammer-Aktivierungsmusters (siehe Kapitel 3.4.1, Abbildung 3.31) eingestellt werden (Abbildung 2.6).

Hierfür wird links die Zeit in Sekunden eingetragen (blau umrandet) und rechts die gewünschte Frequenz in Hertz (schwarz gerahmt). Im Feld für die Wiederholungen kann die gewünschte Anzahl gewählt werden. Hier sind als Beispiel 60 000 Wiederholungen eingetragen. Diese Wiederholungen beziehen sich auf die Summe der zuvor eingetragenen Sekunden, also hier 20 Sekunden. Damit würde das Programm 60 000 Wiederholungen von 20 Sekunden machen und damit über 300 Stunden laufen, was an der angegebenen Laufzeit (exp. length) von 1 200 020 000 ms zu sehen ist. Im LPT-Port verbleiben alle Haken in der oberen Reihe, wodurch bei null Hertz das Licht ausgeschaltet wird. Nach einem Klick auf den Start Button wird das Programm gestartet.

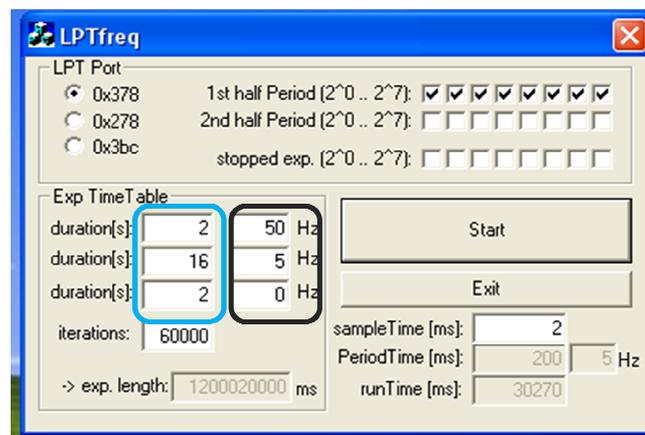


Abbildung 2.6: Maske des LPTfreq Programms mit der Einstellung des spezifischen Hammer-Aktivierungsmusters. In den blau umrandeten Feldern werden die Sekunden angegeben und in den schwarz umrandeten Feldern werden die dazugehörigen Frequenzen in Hertz angegeben. Hier im Beispiel wurde das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster gewählt mit 2 s mit 50 Hz, 16 s mit 5 Hz und 2 s mit 0 Hz.

Nachdem das Programm gestartet wurde, wird in dem in Abbildung 2.5 pink umrandeten Feld der Fortschritt des Programms angezeigt. Exemplarisch sind in Abbildung 2.7 die Anzeige für 50 und 0 Hertz dargestellt (rot umrandet).

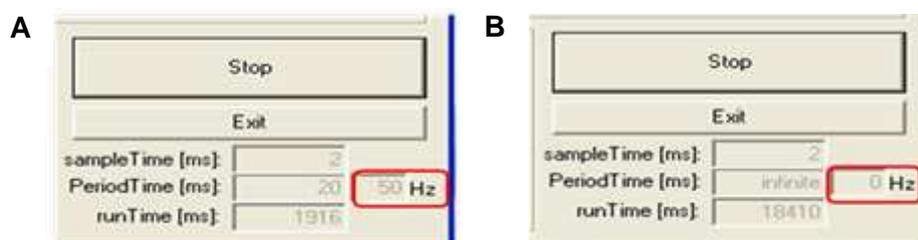


Abbildung 2.7: Ausschnitte aus der Oberflächenmaske von LPTfreq. Gezeigt ist das Anzeigefeld der momentanen Frequenz, wenn das Programm läuft. A) Links im Bild wird eine Frequenz von 50 Hz durchlaufen und B) rechts im Bild eine Frequenz von 0 Hz.

Mit den Programmen LPTfreq_v0.2 und LPTfreq_AB_v3.0 können zusätzlich die beiden Dioden unabhängig voneinander angesteuert werden. Im Programm LPTfreq_v0.2 (Abbildung 2.8) kann eine bestimmte Frequenz, wie z. B. das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster, gewählt und in die Maske eingetragen (gelb umrandet) werden. Diese Frequenz liegt nun auf einer Diode. Die andere Diode wird durch die Quersumme der eingestellten Frequenz angesteuert. In diesem Beispiel entspricht das Muster das $50 \text{ Hz} \times 2 \text{ s} + 5 \text{ Hz} \times 16 \text{ s} + 0 \text{ Hz} \times 2 \text{ s} = 180 \text{ Hz} \times \text{s}$. Diese $180 \text{ Hz} \times \text{s}$ werden gleichmäßig auf die gesamten 20 s aufgeteilt, was eine Frequenz von 9 Hz ergibt. Die zweite Diode wird also mit 9 Hz angesteuert. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Haken im LPT Port (rot umrandet) auf „2nd half Period“ gestellt sind. In diesem und im LPTfreq_AB_v3.0 ist standardmäßig in der ersten Periode das Licht als an definiert.



Abbildung 2.8: Maske des Programms LPTfreq_v2.0. Auf der linken Seite ist die Startmaske zu sehen, in der die Haken auf die zweite Reihe gesetzt wurden. Auf der rechten Seite ist im gelben Kasten das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster mit 2 s mit 50 Hz , 16 s mit 5 Hz und 2 s mit 0 Hz eingestellt. Hierdurch flackert eine Diode mit diesem Muster. Die andere Diode wird durch die Quersumme, also durch die äquivalente Dauer von 9 Hz angesteuert (blauer Kasten, equiv. duration).

Mit dem Programm, LPTfreq_AB_v3.0 können zwei verschiedene Programme auf die beiden Dioden gelegt werden. Die „Exp. Time Table“ ist in Line A (Abbildung 2.9 grün gekennzeichnet) und Line B (gelb umrandet) eingeteilt. In der gezeigten Einstellung ist in A das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster eingestellt und in B konstantes Licht (Abbildung 2.9). Hierbei ist darauf zu achten, dass im Abschnitt LPT Port (rot umrahmt) die Haken für Line A in die zweite Reihe gesetzt wurden, denn ansonsten ist null Hertz als Licht an definiert. In der Line B hingegen soll null Hertz als Licht an definiert sein und die Haken verbleiben in der ersten Reihe.

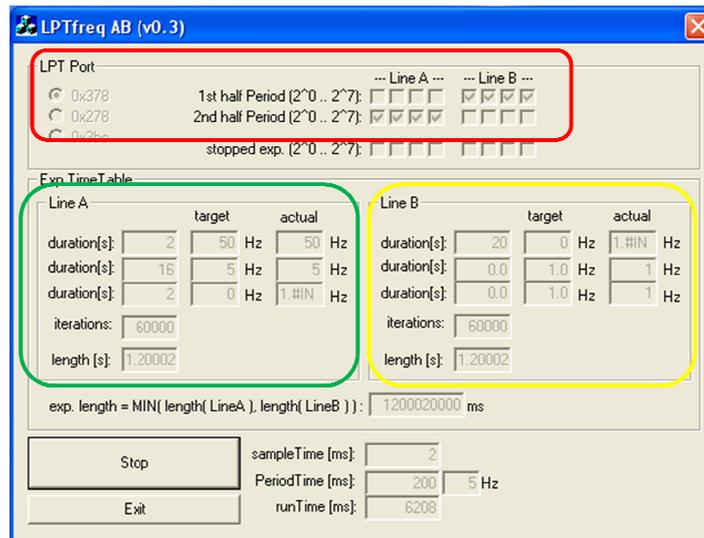


Abbildung 2.9: Maske des Programms LPTfreq_AB_v3.0. Gezeigt ist die Einstellung für das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster für eine Diode (grüner Kasten). Da im gelben Kasten eine Frequenz von 0 Hz gewählt wurde und die Haken bei Line B (roter Kasten) auf 1st half Period gesetzt sind, leuchtet die zweite Diode mit konstantem Licht.

Nachdem das gewünschte Programm eingestellt wurde, wird die Lichtplatte eingeschaltet, die Gefäße werden in die Apparaturen gestellt und der Deckel verschlossen. Nun können die gesammelten und gefütterten Fliegen mit Hilfe eines Trichters in die Apparaturen eingebracht, die Öffnung mit einem Fliegenstopfen verschlossen und der Versuch gestartet werden.

Die Auswertung des Versuchs und die statistische Analyse werden wie in 2.10.1 beschrieben durchgeführt.

2.10.3 Schmeck-Test für Fliegen

Der Schmeck-Test wird nach Singhal (2007) in Anlehnung an den Test für das Schmecken von Bitterstoffen von Ueno *et al.* (2006) durchgeführt. Für den Fliegenschmecktest wird eine Zellkulturplatte mit vier Vertiefungen verwendet (4 Well Multischale für IVF, Nunc). Zwei der Vertiefungen enthalten eine Agarlösung mit 0,1 M Saccharose. In die anderen beiden wird eine Agarlösung ohne Saccharose gefüllt (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.2). Die beiden Lösungen werden jeweils mit verschiedenen Lebensmittelfarben versehen (siehe Abbildung 2.10). Die hier verwendeten Farben wurden von backfun.de bezogen und sind blau (Blau, E132, E131, E151) und rot (Erdbeerrot, E124, E110, E104).

Fünfzehn bis zwanzig weibliche Fliegen werden gesammelt und 16 Stunden lang bei 18 °C ohne Futter gehalten. Für den Test wird ein ca. 3 mm dicker selbst angefertigter

Abstandshalter zwischen den Deckel und die Zellkulturplatte geschoben. In den Deckel wurde mittig eine Öffnung zum Einbringen der Fliegen gebohrt. Diese wird nach dem Einbringen der Fliegen mit einem Stück Papier verschlossen. Der Aufbau wird für eine Stunde abgedunkelt, damit die Fliegen nicht durch äußere Lichteinflüsse beeinflusst werden, und anschließend unter dem Binokular ausgewertet.

	Mit Saccharose	Ohne Saccharose
Farbe (rot oder blau)	1 ml	1 ml
1M Saccharoselösung	1 ml	-
1%ige Agarlösung	5 ml	5 ml
Wasser	3 ml	4 ml
Gesamt	10 ml	10 ml

Tabelle 2.2: Übersicht über die Zusammensetzung des angefärbten Agars

Um auszuschließen, dass eine Stelle bzw. eine Farbe bevorzugt wird, wird die belohnte und unbelohnte Speisefarbe ausgetauscht und auch die Reihenfolge der Vertiefungen gewechselt.

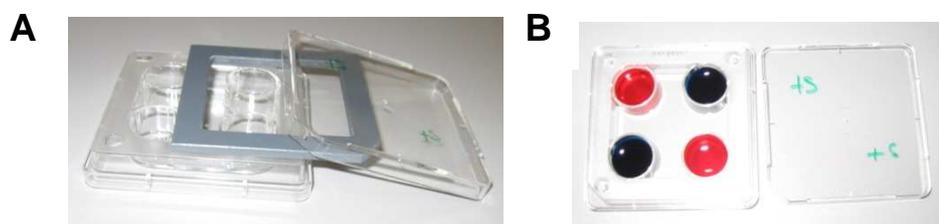


Abbildung 2.10: Aufbau eines Tests zur Erfassung der Schmeckfähigkeit. A) Zellkulturplatte mit grauem selbst angefertigtem Abstandshalter. B) Zellkulturplatte, die mit roter Farbe mit Saccharose und blauer Farbe ohne Saccharose befüllt ist.

Fliegen, die nur roten Farbstoff zu sich genommen haben, zeigen eine rote Färbung des Abdomens. Dasselbe gilt bei der alleinigen Aufnahme von blauer Farbe. Haben hingegen die Fliegen beide Farben zu sich genommen, so sind die Abdomen der Fliegen violett gefärbt (siehe Abbildung 2.11).

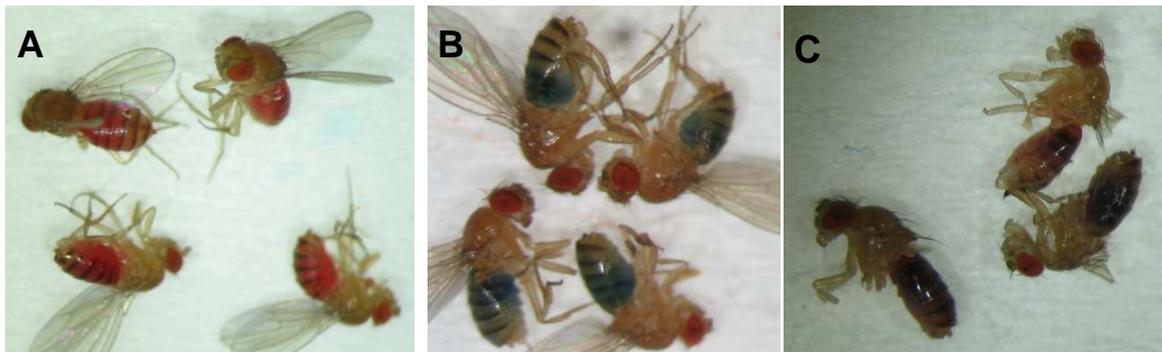


Abbildung 2.11: Färbung des Abdomens nach Aufnahme von farbiger Speisefarbe. Gezeigt ist die Färbung des Abdomens nach Aufnahme von roter Speisefarbe (A) und blauer Speisefarbe (B). Eine violette Färbung kommt nach der Aufnahme von roter und blauer Speisefarbe zusande (C).

Die Anzahl der verschieden angefärbten Tiere wurde in zwei Kategorien aufgeteilt. Eine Kategorie wurde von denjenigen Fliegen gebildet, die die belohnte Farbe aufgenommen haben. Die zweite Kategorie wurde von den Fliegen gebildet, die die unbelohnte Farbe aufgenommen haben. Daraus wurde nach folgendem Schema ein Index berechnet:

$$\frac{\text{belohnte Farbe} - \text{unbelohnte Farbe}}{\text{komplette Anzahl der Fliegen}}$$

Die Statistik wird wie in 3.10.1 beschrieben durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Hat T β H einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz?

Das biogene Amin Oktopamin ist bei der Steuerung vieler Verhaltensweisen von Insekten involviert. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Oktopamin für die Belohnung beim olfaktorischen Lernen eine wichtige Rolle spielt (Schwärzel *et al.*, 2003). Präferenz wird durch die Attraktion eines externen Stimulus ausgelöst. Um zu testen, ob die Bewertung dieses externen Stimulus von Oktopamin abhängt, wurden oktopaminlose Mutanten untersucht. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Ethanolpräferenz und Oktopamin kann mit Hilfe der $T\beta H^{nM18}$ -Mutante untersucht werden. Diese Fliegen weisen eine Mutation im Enzym für die Tyramin- β -Hydroxylase auf und haben kein Oktopamin, dafür ein um sechs- bis achtfach erhöhtes Level an Tyramin (Monastirioti *et al.*, 1996).

3.1.1 $T\beta H^{nM18}$ Mutanten zeigen keine Ethanolpräferenz

Es wurden $T\beta H^{nM18}$ -Fliegen mit und ohne w^{1118} -Mutation und die dazugehörenden Kontrollen auf ihre Präferenz für 5%iges Ethanol verdünnt in Apfel-Mangosaft getestet. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, zeigen weder die $w^+ T\beta H^{nM18}$ - noch die $w^{1118} T\beta H^{nM18}$ -Fliegen eine Präferenz und haben zu ihrer jeweiligen genetischen Kontrolle eine signifikant reduzierte Präferenz. Dies legt nahe, dass der Verlust der T β H-Funktion mit dem Verlust der Präferenz assoziiert werden kann. Das Fehlen der Präferenz kann nicht auf die w^{1118} -Mutation zurückgeführt werden, da ebenfalls die $w^+ T\beta H^{nM18}$ -Fliegen keine Präferenz zeigen. Das heißt, die Präferenz ist unabhängig von der Mutation im *white*-Gen.

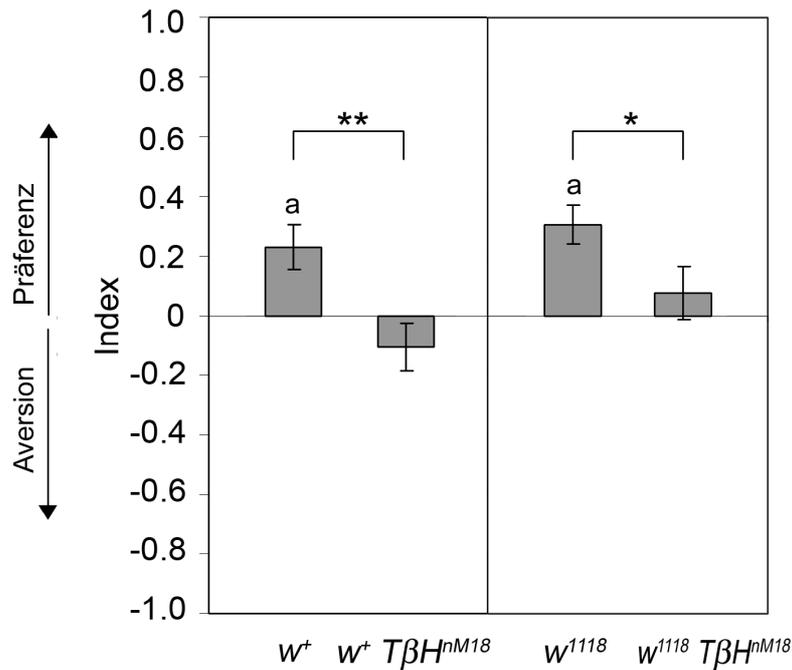


Abbildung 3.1: Der Verlust von T β H kann mit dem Verlust von Präferenz assoziiert werden. Die *white*-Mutation hat keinen Einfluss auf die Präferenz. T β H^{nM18}-Mutanten wurden auf ihre Ethanolpräferenz für fünf prozentiges Ethanol verdünnt in Apfel-Mangosaft getestet. w^+ T β H^{nM18}- und w^{1118} T β H^{nM18}-Fliegen zeigten eine zur Kontrolle signifikant reduzierte Ethanolpräferenz (w^+ $0,23 \pm 0,08$, w^+ T β H^{nM18} $0,09 \pm 0,09$; w^{1118} $0,31 \pm 0,06$, w^{1118} T β H^{nM18} $0,08 \pm 0,09$; n = 21, 23, 26, 17). a, p < 0,05; * p < 0,05; ** p < 0,01. Diese Daten wurden mit Hilfe von M. Ogueta erhoben.

Es könnte sein, dass der Verlust von Präferenz darauf zurückzuführen ist, dass die w^{1118} T β H^{nM18}-Fliegen kein Ethanol wahrnehmen können. Deswegen wurden die w^{1118} T β H^{nM18}-Fliegen für fünf Prozent Ethanol verdünnt in Wasser gegen Wasser getestet. Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, zeigen w^{1118} - und w^{1118} T β H^{nM18}-Mutanten eine Präferenz für Ethanol. w^{1118} -Fliegen zeigen eine signifikant höhere Präferenz für Ethanol als w^{1118} T β H^{nM18}-Fliegen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Wahrnehmung von Ethanol an sich nicht gestört ist. Die reduzierte Präferenz kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass diese Fliegen an sich keine Präferenz ausbilden, da ihnen das hierzu benötigte T β H fehlt.

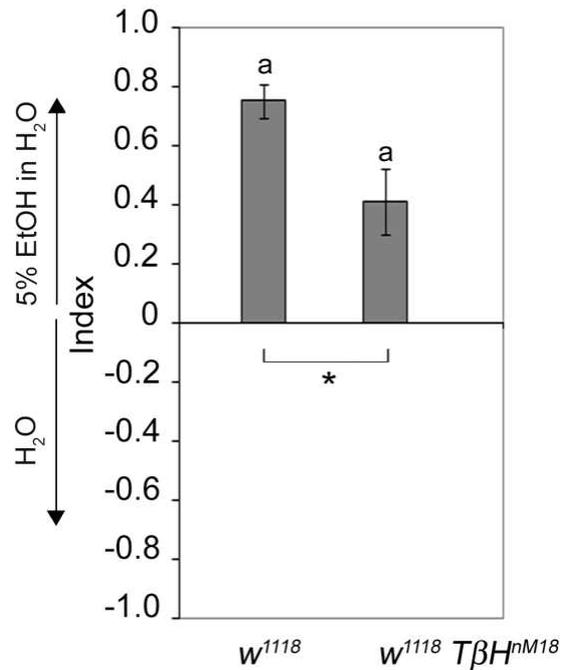


Abbildung 3.2: *w¹¹¹⁸ TβH^{nM18}*-Fliegen können Ethanol wahrnehmen. Ein Vergleich zwischen Wasser und fünf Prozent Ethanol verdünnt in Wasser zeigt, dass die *w¹¹¹⁸ TβH^{nM18}*-Fliegen Ethanol detektieren können, dies jedoch signifikant schlechter als *w¹¹¹⁸*-Fliegen (*w¹¹¹⁸* 0,77 ± 0,06; *w¹¹¹⁸ TβH^{nM18}* 0,42 ± 0,13; n= 15, 14). a, p<0,05; *p < 0.05.

3.1.2 Transgene TβH Expression rettet den mutanten Phänotyp von *TβH^{nM18}*-Fliegen

Um zu überprüfen, ob der Verlust der Tyramin-β-Hydroxylase in der *TβH^{nM18}*-Mutante tatsächlich zur fehlenden Präferenz führt, sollte die Präferenz durch Expression von TβH in verschiedenen Neuronen in der *TβH^{nM18}*-Mutante mit Hilfe verschiedener GAL4-Treiberlinien wieder hergestellt werden. Hierfür wurde zunächst die *dTdc2*-GAL4-Linie getestet, da in dieser Linie das GAL4 unter dem Promotor für das Enzym Tyrosin-Decarboxylase (TDC) steht (Cole *et al.*, 2005). Da die Tyrosin-Decarboxylase das erste Enzym im Syntheseweg für Oktopamin darstellt, wird GAL4 in tyraminergen und oktopaminergen Neuronen exprimiert (Cole *et al.*, 2005; Busch *et al.*, 2009). Um einen möglichen Einfluss der P-Elementinsertion in der *dTdc2*-GAL4-Linie und des *UAS-TβH*-Rettungskonstrukts auszuschließen, wurden diese sowohl in der *w¹¹¹⁸*-Mutante wie auch in der *w¹¹¹⁸ TβH^{nM18}*-Mutante getestet. Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, zeigen die Fliegen mit dem *dTdc2*-GAL4 und *UAS-TβH*-Konstrukten mit der *w¹¹¹⁸*-Mutation eine Präferenz für fünf Prozent Ethanol. Hingegen zeigen Fliegen dieser Linien eine signifikante Reduktion der Präferenz in der *w¹¹¹⁸ TβH^{nM18}*-Mutante. Wird das *UAS-TβH*-Transgen mit Hilfe der *dTdc2*-GAL4-Linie in den tyraminergen/oktopaminergen Neuronen in der *w¹¹¹⁸ TβH^{nM18}*-Mutante exprimiert, so wird die

Präferenz wieder hergestellt. Dies bedeutet, dass T β H in einer Gruppe von tyraminergen/oktopaminergen Neuronen notwendig für die Entwicklung von Präferenz ist.

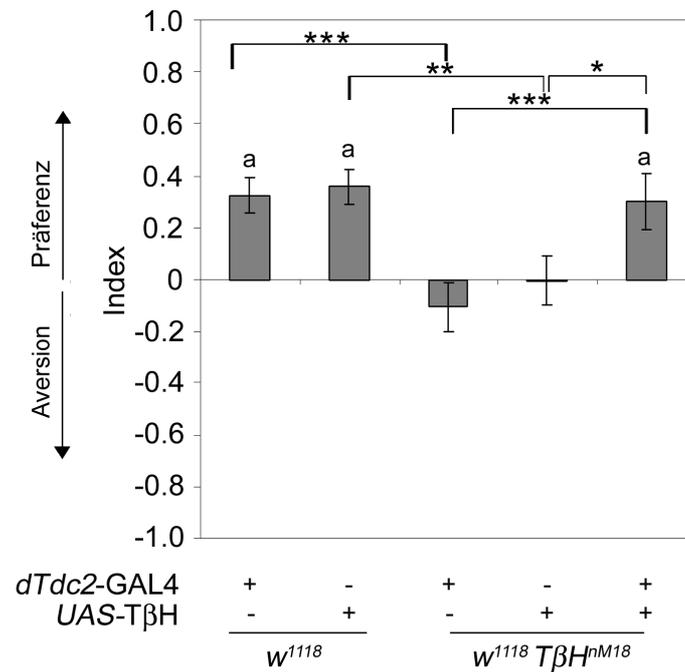


Abbildung 3.3: Der Verlust von Präferenz in der $w^{1118} T\beta H^{nM18}$ -Mutante kann durch die Expression von *UAS-T β H* unter Kontrolle von *dTdc2-GAL4* wieder hergestellt werden. Fliegen, die eine Kopie des *dTdc2-GAL4*-Konstrukts oder eine Kopie des *UAS-T β H*-Konstrukts tragen, entwickeln Präferenz für fünf Prozent Ethanol. Wenn diese Konstrukte in der $T\beta H^{nM18}$ -Mutante vorhanden sind, haben sie keinen Einfluss auf die Präferenz der Mutante (w^{1118} ; *dTdc2-GAL4* $0,34 \pm 0,05$; $w^{1118} UAS-T\beta H$ $0,36 \pm 0,07$; $w^{1118} T\beta H^{nM18}$; *dTdc2-GAL4* $-0,14 \pm 0,08$; $w^{1118} T\beta H^{nM18}$, *UAS-T β H* $0,01 \pm 0,08$; $w^{1118} T\beta H^{nM18} UAS-T\beta H$; *dTdc2-GAL4* $0,34 \pm 0,1$; $n = 21, 28, 23, 21, 21$). a, $p < 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Da die *dTdc2-GAL4*-Linie in ca. 137 Neuronen Transgene im Gehirn von *Drosophila* aktiviert (Busch *et al.*, 2009), wurden weitere GAL4-Treiberlinien, die eine reduzierte Anzahl von T β H-positiven Neuronen ansteuern, getestet.

Die *Feb15-GAL4*-Linie wurde ausgewählt, da sie in Larven neurosekretorische Neurone der Pars intercerebralis aktiviert, in denen T β H vorkommt (Siegmond und Korge, 2001). Hier wurde ebenso *Feb15-GAL4* in der w^{1118} - und in der $w^{1118} T\beta H^{nM18}$ -Mutante getestet, um einen möglichen Einfluss des P-Elementinsertionsortes auf die Präferenz zu untersuchen.

Wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, zeigen Fliegen mit den Konstrukten w^{1118} , *Feb15-GAL4* und $w^{1118} T\beta H^{nM18}$; *Feb15-GAL4* eine Präferenz bzw. keine Präferenz für fünf prozentiges Ethanol. Die Expression des *UAS-T β H*-Konstrukts unter der Kontrolle von *Feb15-GAL4* stellt die fehlende Präferenz von $w^{1118} T\beta H^{nM18}$ -Mutanten wieder her. Dies zeigt, dass *Feb15-GAL4*

und *dTdc2*-GAL4 in Neuronen die Expression von T β H wieder herstellen, die für die Entwicklung der Präferenz wichtig sind.

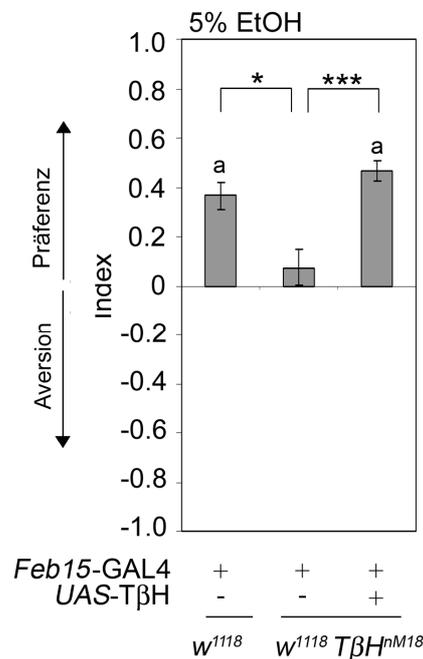


Abbildung 3.4: Expression von T β H mit Hilfe der *Feb15*-GAL4-Treiberlinie in *w¹¹¹⁸ T β H^{nM18}*-Mutanten stellt die Ethanolpräferenz wieder her. Eine Kopie des *Feb15*-GAL4 Konstrukts hat keinen Einfluss auf die Ethanolpräferenz in *w¹¹¹⁸*- Fliegen bzw. in *w¹¹¹⁸ T β H^{nM18}*-Mutanten. (*w¹¹¹⁸;Feb15-GAL4* 0,37 ± 0,07; *w¹¹¹⁸ T β H^{nM18};Feb15-GAL4* 0,14 ± 0,07; *w¹¹¹⁸ T β H^{nM18} UAS-T β H;Feb15-GAL4* 0,47 ± 0,04; n= 28, 33, 36). a, p<0,05, *p< 0.05, ***p<0,001.

Zur genaueren Analyse der T β H-positiven Neuronen, die für die Ethanolpräferenz wichtig sind, wurde die *6.2_2T β H*-GAL4-Treiberlinie verwendet, die ein T β H-Promotor-Element enthält und in 65-70 Zellen transgen exprimiert wird (Hampel, 2007). Ferner wurde die GAL4-Expressionsdomäne von *dTdc2*-GAL4 (Cole *et al.*, 2005) mit Hilfe der *w¹¹¹⁸;+; Cha^{3.3kb}*-GAL80-Linie (Keene *et al.*, 2004) eingeschränkt. Hierdurch bleiben nur noch 2 -5 Neurone im VM-Cluster übrig (Zhou *et al.*, 2008). Diese Linie wird hier kurz als *dTdc2*-GAL4; *Cha*GAL80 bezeichnet. In dieser Linie werden in allen cholinergen Neuronen die GAL4-Expression durch die Expression des Inhibitors GAL80 reprimiert und damit die Anzahl der tyraminergeren/T β H-positiven Neurone reduziert. Die Anwesenheit der GAL4- und GAL80-Konstrukte hat keinen Einfluss auf die Präferenz. Die Expression des *UAS-T β H*-Konstrukts unter der Kontrolle von *6.2_2T β H*-GAL4 oder *dTdc2*-GAL4; *Cha*GAL80 kann die fehlende Präferenz in den *T β H^{nM18}*-Mutanten nicht wieder herstellen. Dies verdeutlicht, dass die aktivierten tyraminergeren/T β H-positiven Neurone nicht ausreichen, um die Ethanolpräferenz der *T β H^{nM18}*-Mutante wieder herzustellen. Durch die Expression von GAL80 wird die Expression von GAL4 der *dTdc2*-GAL4-Linie inhibiert, die normalerweise wichtig für die

Ethanolpräferenz ist. Hingegen scheinen die GAL4-Expressionsdomänen von *6.2_2TβH*-GAL4 nicht die für die Präferenz notwendigen tyraminergeren/TβH-positiven Neurone abzudecken.

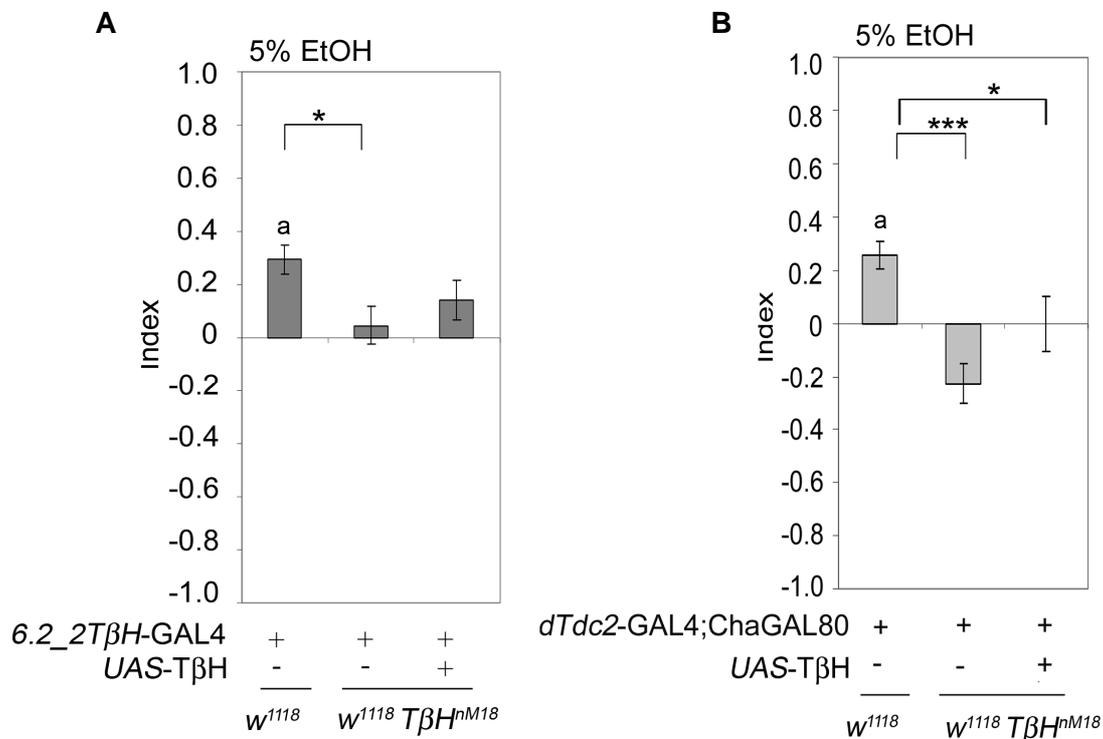


Abbildung 3.5: Expression von *UAS-TβH* mit Hilfe der A) *6.2_2TβH*-GAL4 und B) *dTdc2*-GAL4; *ChaGAL80* Treiberlinie in *w*¹¹¹⁸ *TβH*^{nM18}-Mutanten kann die Ethanolpräferenz nicht wieder herstellen. Eine Kopie der GAL4 Konstrukte hat keinen Einfluss auf die Ethanolpräferenz in *w*¹¹¹⁸-Fliegen bzw. in *w*¹¹¹⁸ *TβH*^{nM18}-Mutanten (*w*¹¹¹⁸; *6.2_2TβH*-GAL4 0,29 ± 0,06; *w*¹¹¹⁸ *TβH*^{nM18}; *6.2_2TβH*-GAL4 0,06 ± 0,08; *w*¹¹¹⁸ *TβH*^{nM18} *UAS-TβH*; *6.2_2TβH*-GAL4 0,13 ± 0,08; n = 46, 26, 36; *w*¹¹¹⁸; *dTdc2*-GAL4; *Cha3.3kb*-GAL80 0,26 ± 0,05; *w*¹¹¹⁸; *TβH*^{nM18}; *dTdc2*-GAL4; *Cha3.3kb*-GAL80 -0,23 ± 0,08; *w*¹¹¹⁸ *TβH*^{nM18} *UAS-TβH*; *dTdc2*-GAL4; *Cha3.3kb*-GAL80 0,00 ± 0,10; n = 27, 22, 25). a, p < 0,05, *p < 0,05, ***p < 0,001.

Eine weitere GAL4-Treiberlinie, die in tyraminergeren/TβH-positiven Neuronen exprimiert, ist die Linie *NP7088*. Diese Linie exprimiert in ca. 333 Neuronen GFP, die in zwei Clustern mit der *dTdc2*-GAL4-Linie übereinstimmen. Diese Cluster sind der AL2-Cluster und der VM-Cluster (Busch *et al.*, 2009). Hierdurch soll getestet werden, ob diese beiden Cluster für die Vermittlung der Präferenz notwendig sind. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, beeinflusst der P-Elementinsertionsort die Ethanolpräferenz von *w*¹¹¹⁸- und *w*¹¹¹⁸ *TβH*^{nM18}-Mutanten, da auch die Mutanten Ethanolpräferenz zeigen. *TβH*^{nM18}-Mutanten, in denen das *UAS-TβH*-Konstrukt unter der Kontrolle von *NP7088* exprimiert wurde, zeigen Präferenz für fünf Prozent Ethanol. Durch den Einfluss der P-Elementinsertion der *NP7088*-Linie kann keine Aussage über eine Rettung der Präferenz getroffen werden.

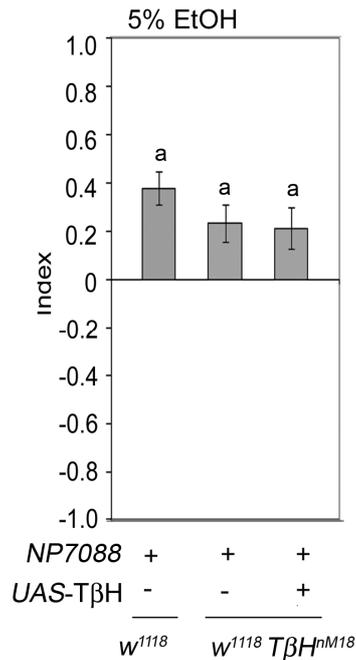


Abbildung 3.6: Die P-Elementinsertion der *NP7088*-Linie hat einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz. Fliegen mit einer Kopie des *NP7088*-Konstrukts entwickeln eine erhöhte Präferenz. Ebenso zeigen Mutanten mit einer Kopie des *NP7088*-Konstrukts Präferenz. *w¹¹¹⁸ TβH^{nM18}*-Mutanten mit der Expression von *UAS-TβH* unter der Kontrolle von *NP7088* weisen ebenfalls Ethanolpräferenz auf (*w¹¹¹⁸; NP7088* 0,38 ± 0,07; *w¹¹¹⁸ TβH^{nM18}; NP7088* 0,23 ± 0,08; *w¹¹¹⁸ TβH^{nM18} UAS-TβH; NP7088* 0,21 ± 0,09; n= 51, 38, 36). a, p<0,05; *p < 0.05.

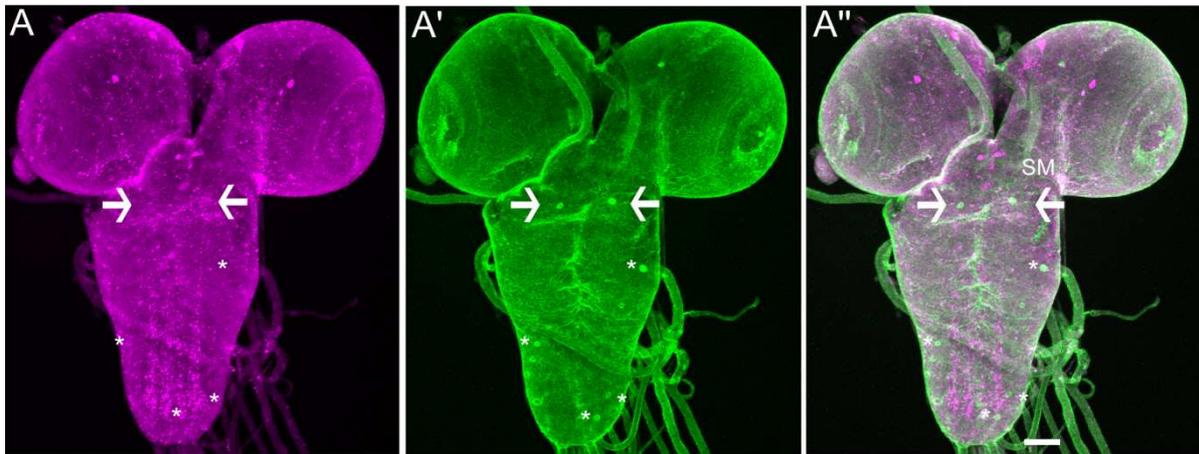
3.1.3 TβH ist in der adulten Fliege notwendig für die Ethanolpräferenz

Bislang konnte gezeigt werden, dass TβH für die Ausbildung von Ethanolpräferenz notwendig ist. Jedoch bleibt die Frage bestehen, ob die Aktivität der TβH-exprimierenden Neurone während der Entwicklung bzw. in der adulten Fliege für die Präferenz wichtig ist. Dies sollte geklärt werden, indem der nach innen gerichtete Kaliumkanal (Kir2.1) unter der Kontrolle eines hitzeinduzierbaren Promotors von Tubulin verwendet wird (Claridge-Chang *et al.*, 2009) (Abbildung 3.9). Mit Hilfe dieses Kaliumkanals kann sowohl die Erzeugung von Aktionspotenzialen als auch die Freisetzung von Neurotransmittern unterdrückt werden (Johns *et al.*, 1999; Baines *et al.*, 2001). Außerdem sollte überprüft werden, ob die Expression des *UAS-Kir2.1; TubGAL80^{ts}*-Konstrukts an sich einen Einfluss auf die Präferenz mit und ohne Hitzeschock ausübt. Ferner sollte geklärt werden, ob die unspezifische Expression von Transgenen in *dTdc2*-GAL4-abhängigen Neuronen einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz hat. Hierfür wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle der *UAS*-Sequenz transgen in Fliegen aktiviert. Zum Test der Funktionalität der Konstrukte in den *w¹¹¹⁸; tubP-GAL80^{ts}; UAS-mCD8::GFP*-Fliegen wurden Antikörperfärbungen an larvalen Gehirnen durchgeführt (Abbildung 3.7). Alle in diesem Versuch verwendeten Fliegen wuchsen bei der permissiven Temperatur von 18 °C auf, bei der die

Expression des Kaliumkanals bzw. des GFPs durch GAL80^{ts} reprimiert ist (McGuire *et al.*, 2003). Um entweder den Kaliumkanal oder GFP zu aktivieren, wurden die Fliegen für 16 Stunden auf die restriktive Temperatur von 33 °C gebracht. Im Anschluss konnten sich die Fliegen für sechs bis acht Stunden bei 18 °C erholen (McGuire *et al.*, 2003; Poeck *et al.*, 2008). Danach wurden die Fliegen mit und ohne Hitzeschock bei 25 °C auf ihre Ethanolpräferenz für fünf Prozent Ethanol getestet.

In Abbildung 3.7 sind die Färbungen der larvalen Gehirne von *w¹¹¹⁸; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-mCD8::GFP* jeweils mit und ohne Hitzeschock dargestellt. Wird kein Hitzeschock gegeben und damit GAL4 durch GAL80^{ts} reprimiert (McGuire *et al.*, 2003), so ist die Expression von GFP im ventralen Ganglion reduziert (Abbildung 3.7 A'). Im ventralen Ganglion sind ein Paar GFP-positive Neurone lateral zur Mittellinie zu erkennen (Pfeil) und einige Neurone, die lateral im ventralen Ganglion gelegen sind (Sterne). Wird jedoch GAL80^{ts} durch den Hitzeschock von GAL4 gelöst, so wird GFP in den *dTdc2*-GAL4-positiven Neuronen exprimiert (Abbildung 3.7 B' und B''). Dieses Muster ist mit dem in Abbildung 3.11 gezeigten Expressionsmuster vergleichbar. Damit funktionieren die in die Fliege eingebrachten Konstrukte.

Ohne Hitzeschock



Mit Hitzeschock

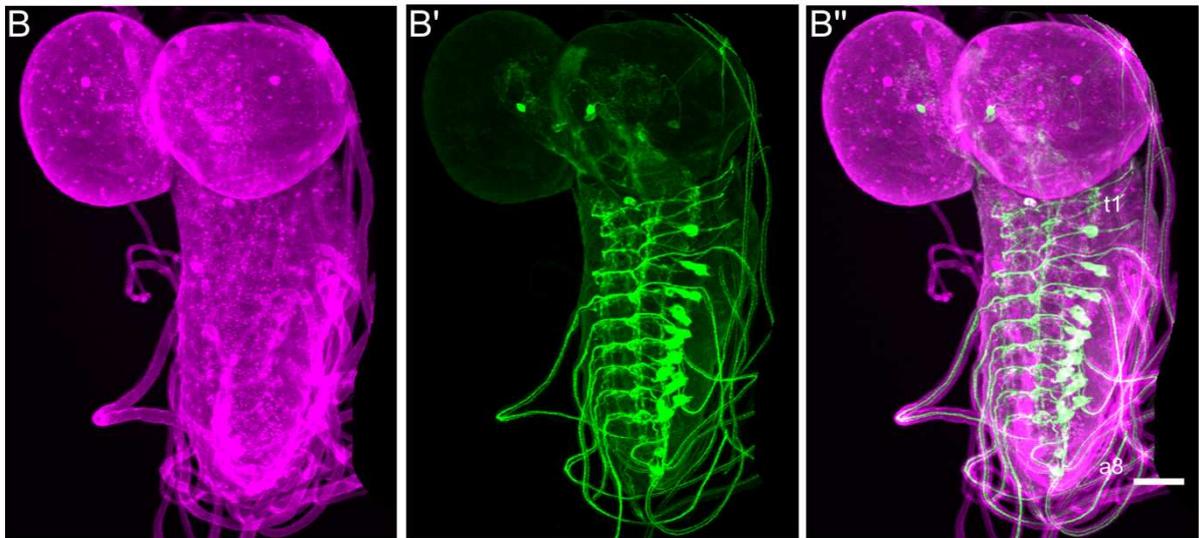


Abbildung 3.7: GFP ist durch den Hitzeschock induzierbar. A-A'') Gehirne von $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-mCD8::GFP$ -Larven ohne Hitzeschock zeigen eine Reduktion der GFP-positiven Neurone, da durch $GAL80^{ts}$ $GAL4$ reprimiert ist (McGuire *et al.*, 2003). B'-B'') Mit Hitzeschock ist in larvalen Gehirnen eine Expression des GFP-Konstrukts ersichtlich. Die weißen Balken entsprechen 50 μm .

Die $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-Kir2.1$ -Fliegen zeigen ohne Hitzeschock eine Ethanolpräferenz, während diese mit Hitzeschock nicht ausgebildet werden kann (Abbildung 3.8). Dies zeigt, dass die neuronale Aktivierung der von $dTdc2-GAL4$ markierten Neurone im adulten Tier für die Ethanolpräferenz wichtig ist. $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}; UAS-Kir2.1$ -Fliegen mit Hitzeschock unterscheiden sich nicht signifikant von den $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}; UAS-Kir2.1$ -Fliegen ohne Hitzeschock, jedoch sind $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}; UAS-Kir2.1$ -Fliegen mit Hitzeschock signifikant unterschiedlich zu null, jedoch Fliegen ohne Hitzeschock nicht. Dies zeigt, dass der Hitzeschock die Präferenz steigern kann. $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-mCD8::GFP$ -Fliegen mit und ohne Hitzeschock verhalten sich gleich. Jedoch zeigen $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-mCD8::GFP$ -Fliegen mit Hitzeschock eine deutlich

von null unterschiedliche Ethanolpräferenz und ohne Hitzeschock nicht. Jedoch ist die Anzahl der Versuchswiederholungen gering und bedingt dadurch eine hohe Varianz. Auch sind $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-mCD8::GFP$ -Fliegen mit Hitzeschock signifikant unterschiedlich zu $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-Kir2.1$ -Fliegen mit Hitzeschock. Dies zeigt, dass der Hitzeschock einen Einfluss ausübt, da er die Präferenz steigert. Trotz des Hitzeschocks führt die Blockade der elektrischen Aktivierung in T β H-positiven Neuronen durch die Expression des Kationenkanals nicht zu Ethanolpräferenz.

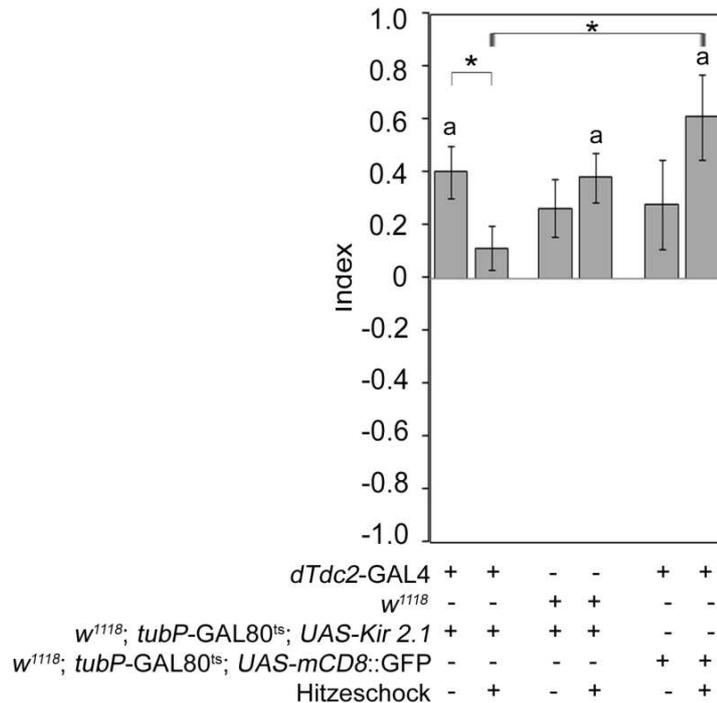


Abbildung 3.8: Neuronale Aktivität ist in adulten Fliegen für Ethanolpräferenz wichtig. $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-Kir2.1$ -Fliegen, in denen die *Tdc2*-GAL4-positiven Neurone durch Kir2.1 blockiert sind, können keine Ethanolpräferenz ausbilden. Hingegen zeigen $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-mCD8::GFP$ - und $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-Kir2.1$ -Fliegen eine Präferenz nach einem Hitzeschock ($w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-Kir2.1$ ohne Hitzeschock $0,4 \pm 0,10$, mit Hitzeschock $0,1 \pm 0,09$; $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}; UAS-Kir2.1$ Fliegen ohne Hitzeschock $0,3 \pm 0,11$ mit Hitzeschock $0,4 \pm 0,09$; $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/dTdc2-GAL4; UAS-mCD8::GFP$ ohne Hitzeschock $0,3 \pm 0,15$, mit Hitzeschock $0,6 \pm 0,017$; $n = 22, 22, 27, 28, 14, 14$). a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$.

3.2 Charakterisierung der T β H-positiven Neurone im larvalen zentralen Nervensystem

Die Expression von T β H-positiven Neuronen wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antiserums im larvalen Gehirn ermittelt (Monastirioti *et al.*, 1996). Das verwendete Antiserum erkennt Zellkörper unterhalb des Ösophagus. Zwei bis drei Zellkerne pro Neuomer liegen entlang der ventralen Mittellinie. Zusätzlich befinden sich im ersten abdominalen und in den

thorakalen Neuromeren jeweils ein paariges paramedial gelegenes Neuron. Alle Zellen, außer den paarigen paramedial gelegenen Zellen, colokalisieren mit den GFP-positiven Zellen (Monastirioti *et al.*, 1996; Vömel und Wegener, 2008). Das Antiserum erkennt ungefähr 37 Neurone im ventralen Ganglion der Larve, aber keine Neurone in den beiden Gehirnhemisphären (Monastirioti *et al.*, 1996). Um die Spezifität des hier verwendeten Antiserums (Zhou *et al.*, 2008) zu überprüfen und um einen möglichen Einfluss des verwendeten *UAS-mCD8::GFP*- und *dTdc2-GAL4*-Konstrukts auf die tyraminergen/T β H-positiven Neurone auszuschließen, wurde untersucht, was dieses α -T β H-Serum im larvalen zentralen Nervensystem erkennt. Zu diesem Zweck wurden sowohl die T β H-immunreaktiven Neurone in *w¹¹¹⁸; dTdc2-GAL4*-Larven als auch das zentrale Nervensystem von *w¹¹¹⁸; UAS-mCD8::GFP/dTdc2-GAL4*-Larven immunhistochemisch untersucht.

In Abbildung 3.9 ist die Färbung der *w¹¹¹⁸; dTdc2-GAL4*-Larven dargestellt. Diese wurde mit Antikörpern gegen GFP und gegen T β H angefärbt. Wie erwartet, lässt sich keine GFP-Expression mit Hilfe des GFP-Antikörpers nachweisen (Abbildung 3.9 A' und A''). Wie in Abbildung 3.9 A zu sehen ist, befinden sich in den beiden Gehirnhemisphären zwei paarige T β H-positiv Neurone, welche nicht von Monastirioti *et al.* (1996) beschrieben wurden. Im SM-Cluster (A'' weißer Kasten, B und Abbildung 3.10) und in den thorakalen und abdominalen Neuromeren (A'' gelber Kasten, C und Abbildung 3.10) befinden sich ebenfalls T β H-positiv Neurone. Im SM-Cluster ist zu erkennen, dass ca. 18 Zellen um die Mittellinie herum angeordnet sind und ein Paar von Neuronen lateral gelegen ist (Abbildung 3.9 B). Die Vergrößerung des in gelb eingezeichneten Abschnitts des ventralen Ganglions zeigt die abdominalen Neuromere. Hier liegen zwei oder drei T β H-positiv Neurone pro Neuomer entlang der Mittellinie (weiße Pfeile). Diese ca. 20 Neurone waren teilweise schwach angefärbt oder nicht vorhanden. Das Expressionsmuster und die Anzahl der thorakalen und abdominalen Neuomere stimmt mit dem von Vömel und Wegner (2008) und Monastirioti *et al.* (1996) beschriebenen Muster von T β H-immunreaktiven Neuronen überein.

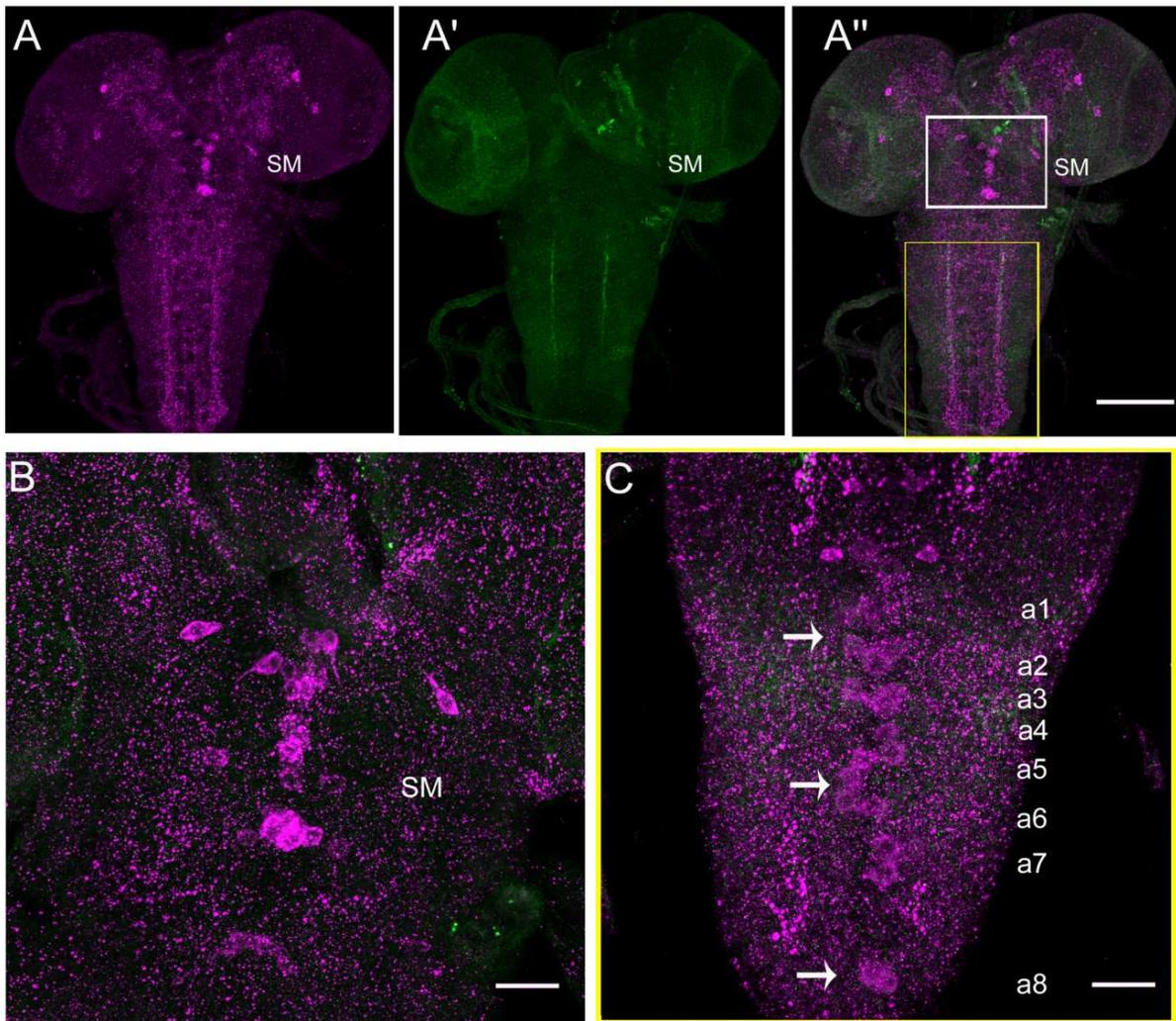


Abbildung 3.9: T β H wird in der Larve in den Gehirnhemisphären und im ventralen Ganglion exprimiert. Die $w^{1118}; dTdc2$ -GAL4-Larven wurden mit den Antikörpern gegen T β H (magenta) und GFP (grün) angefärbt. Die Übersicht (A-A'') zeigt, dass in den optischen Loben, sowie im ventralen Ganglion eine T β H-Färbung zu erkennen ist, jedoch keine GFP-Färbung. Das Cluster SM (weißer Kasten) ist in B vergrößert dargestellt. Hier liegen die Zellkerne entlang der ventralen Mittellinie und lateral davon. Gelb umrandet ist der thorakale und abdominale Bereich des ventralen Ganglions. In C ist der Bereich von a1 bis a8 vergrößert dargestellt. Die weißen Pfeile deuten auf die entlang der ventralen Mittellinie angeordneten Neurone. Der weiße Balken entspricht 100 μ m in der Übersicht und 25 μ m in den Vergrößerungen.

Die Expression im larvalen zentralen Nervensystem ist in Abbildung 3.10 in einer Übersicht zusammengefasst. Die roten Punkte stellen die beiden paarigen Neurone in den Gehirnhemisphären dar. Die blauen Punkte symbolisieren den SM-Cluster. In den drei abdominalen Neuromeren befindet sich jeweils ein Paar T β H-positive Neurone (grüne Punkte) und im thorakalen Abschnitt befinden sich zwei bis drei Neurone pro Neuomer (schwarze Punkte).

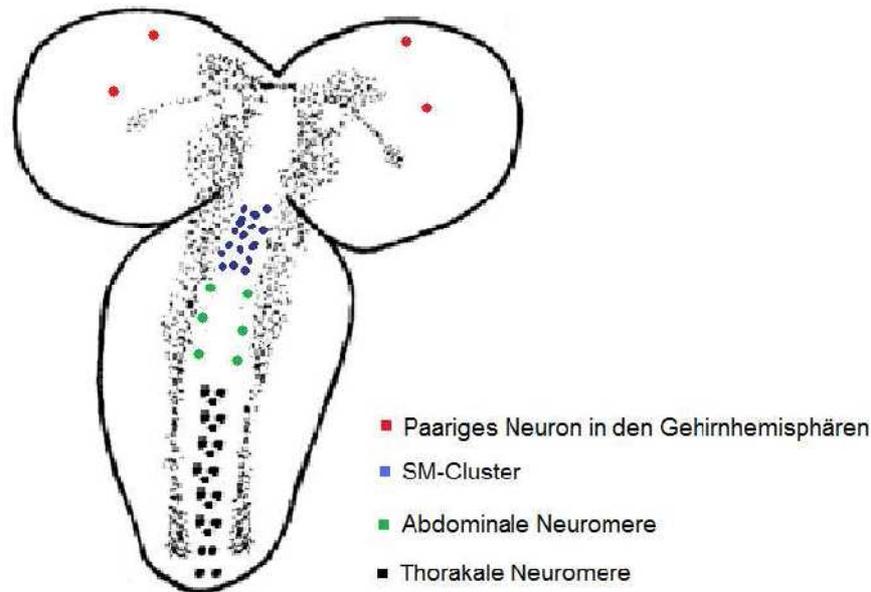


Abbildung 3.10: Schematische Übersicht der T β H-positiven Neurone im larvalen zentralen Nervensystem (modifiziert nach Monastirioti *et al.*, 1996).

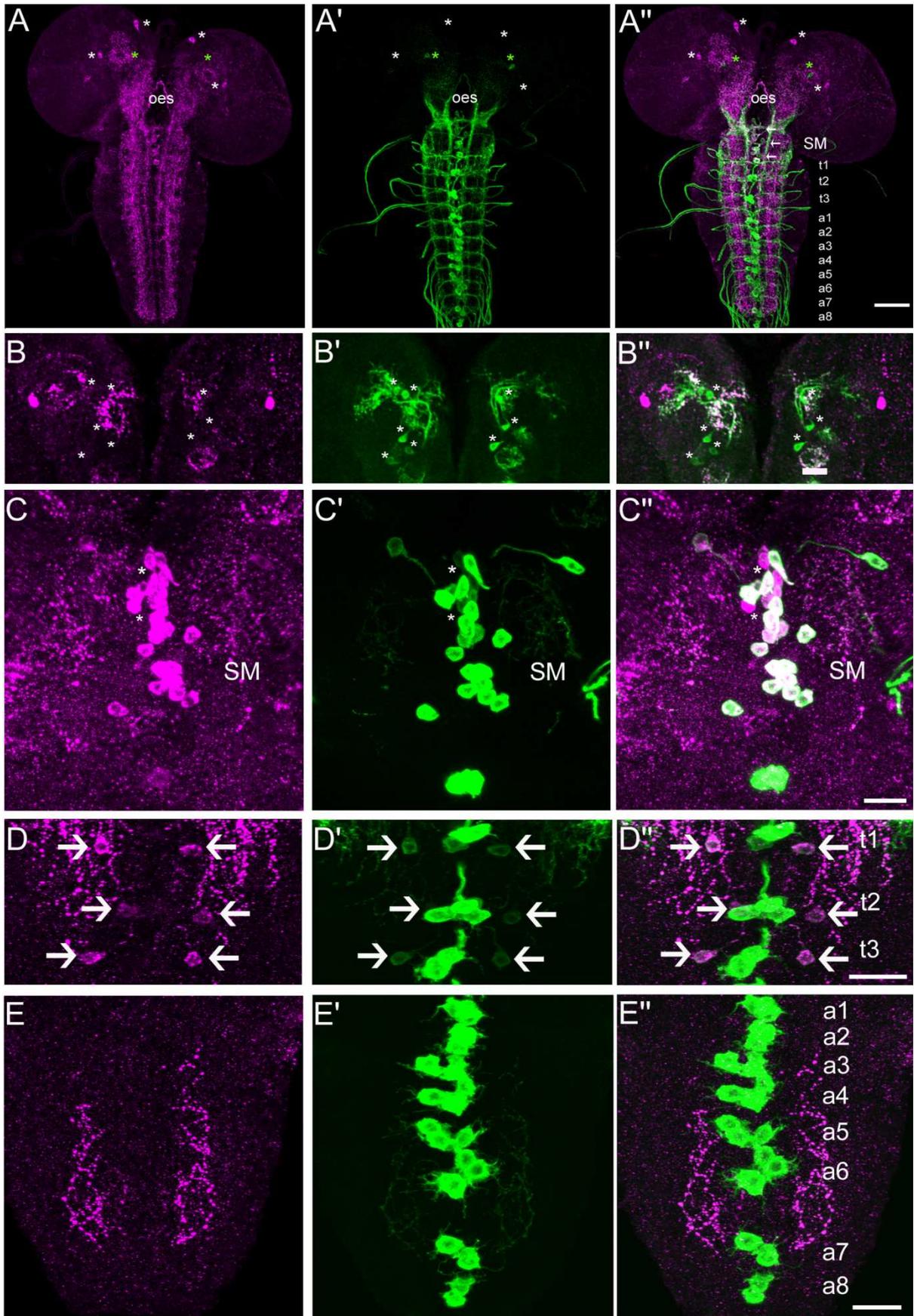
Durch die Expression des *UAS-mCD8::GFP*-Konstrukts unter der Kontrolle von *dTdc2-GAL4* lassen sich die GAL4-Expressionsdomänen mit Hilfe eines Antikörpers gegen GFP sichtbar machen und mit den T β H-positiven Neuronen vergleichen. Hierdurch kann festgestellt werden, ob die *dTdc2-GAL4*-Linie alle T β H-positiven Neurone abdeckt.

In Abbildung 3.11 A bis A'' ist eine Übersicht über das gesamte larvale zentrale Nervensystem dargestellt, mit den insgesamt $48 \pm 1,4$ T β H-positiven und $29 \pm 1,4$ GFP-positiven Neuronen, die in $19 \pm 1,4$ Neuronen colokalisieren (Mittelwert \pm SEM). In den Gehirnhemisphären sind die zwei Paar T β H-positiv Neurone (Abbildung 3.11 A weiße Sterne) zu erkennen und ein prominentes Paar GFP-positiver Neurone (A, grüne Sterne), die nicht mit den T β H-positiven Neuronen überlappen. Ein bis fünf weitere GFP-positive Neurone konnten in den Gehirnhemisphären gefunden werden, welche jedoch sehr schwach GFP exprimierten und ebenfalls nicht mit den T β H-positiven Neuronen überlappen (Abbildung 3.11 B-B'' Sterne). Der SM-Cluster (Abbildung 3.11 C-C''), die thorakalen Neuomere t1-3 (D-D'') und die abdominalen Neuomere a1-8 (E-E'') sind jeweils vergrößert dargestellt. Der ventral gelegene SM-Cluster weist $20 \pm 0,3$ T β H-positiv und $18 \pm 0,4$ GFP-positiv Neurone auf, die in $18 \pm 0,4$ Neuronen überlappen. Die beiden T β H-positiven, aber nicht GFP-positiven Neurone, sind in Abbildung 3.11 C-C'' mit jeweils einem Stern gekennzeichnet. Die Neurone des SM-Clusters befinden sich um die ventrale Mittellinie angeordnet und nur wenige Neurone befinden sich paramedial von dieser. Auf Höhe des SM-Clusters, jedoch dorsal gelegen befindet sich ein großes Neuron, das sowohl T β H als auch GFP exprimiert.

Die thorakalen Neuromere t1 bis t3 enthalten jeweils drei median gelegene GFP-positive Neurone und drei paarige paramedial gelegene GFP-positive Neurone (Abbildung 3.11 D'-D''). T β H- und GFP-Expression lässt sich nur in drei paarigen paramedial gelegenen Neuronen pro Segmentabschnitt nachweisen (D-D'' Pfeile). In den Abschnitten a1 bis a6 befinden sich jeweils drei GFP-positive Neurone und in a7 und a8 jeweils nur zwei GFP-positive Neurone entlang der Mittellinie. In den Neuromeren a1 bis a8 konnten nur schwach gefärbte oder keine T β H-positive Neurone gefunden werden (Abbildung 3.11 E). Im Neuomer a1 war oftmals schwach ein paramediales T β H-positives Neuronenpaar zu erkennen.

Dies deutet darauf hin, dass die GAL4-Expressionsdomänen von *dTdc2*-GAL4 nicht mit allen T β H-positiven Neuronen im larvalen zentralen Nervensystem colokalisieren. Die abgeschwächte T β H-Expression deutet auf einen Einfluss des zusätzlichen Konstrukts beziehungsweise eine unterschiedliche zeitliche Expression von T β H hin.

Abbildung 3.11: Die GAL4-Expressionsdomänen der *dTdc2*-GAL4-Linie sind mit Hilfe des *UAS-mCD8::GFP* sichtbar gemacht worden. GFP-positive (grün) Neurone und T β H-positive (magenta) Neurone sind in Larven von *w¹¹¹⁸; dTdc2/UAS-mCD8::GFP* um die ventrale Mittellinie angeordnet. A) Übersicht über das larvale Gehirn mit den beiden optischen Loben und dem ventral-abdominalen Ganglion. In den optischen Loben sind GFP-positive (grüne Sterne) und nur T β H-positive (weiße Sterne) Neurone zu erkennen. B) In den Hemisphären sind ein bis fünf GFP-positive Neurone zu erkennen, die nicht mit T β H überlappen. C) Der SM-Cluster beinhaltet 20 T β H-positive Neurone, die nur in 18 Neuronen mit GFP überlappen. Die beiden nur T β H-positive Neurone sind mit Sternen markiert. In D-D'' ist eine Vergrößerung der thorakalen Neuromere t1 bis t3 dargestellt. T β H- und GFP-Expression lässt sich nur in drei paarigen paramedial gelegenen Neuronen pro Segmentabschnitt nachweisen. Die medial gelegenen drei Zellen pro Neuomer sind nur GFP-positiv. E-E'' Die abdominalen Neuromere a1 bis a8 weisen zwei bis drei GFP-positive Neurone pro Segment auf, die nur schwach oder nicht T β H-positiv sind. Der weiße Balken entspricht 100 μ m in der Übersicht und in den Vergrößerungen 25 μ m.



3.3 Charakterisierung der T β H-positiven Neurone im adulten Gehirn, die einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz ausüben

3.3.1 Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen der *dTdc2*-GAL4-Linie und Vergleich mit der T β H-Expression im adulten Nervensystem

Wie die Verhaltensanalysen gezeigt haben, ist die Expression von T β H nur in einem Teil der Neurone für die Ethanolpräferenz notwendig. Zur Bestimmung dieser Neurone wurden die GAL4-Expressionsdomänen der verwendeten GAL4-Treiberlinien mit Hilfe eines *UAS-mDC8::GFP*-Konstrukts (Lee und Luo, 1999) näher untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von T β H relativ zur GFP-Expression untersucht.

Nur die Neurone beziehungsweise Neuronen-Cluster, in denen eine Colokalisation vorliegt, sind für die Ethanolpräferenz notwendig. In Gehirnen von Fliegen, die eine Kopie von *dTdc2*-GAL4 tragen, wurden 97 T β H-positive und 78 GFP-positive Neurone gefunden.

Die T β H -positiven Neurone konnten den Clustern AL2, VMmd, VMmx, VMIb, G0a, G0b, G2a,b, PB1 und PSM zugeordnet werden (Tabelle 3.1, Kapitel 3.3.5). In Abbildung 3.12 A, B und C ist die Antikörperfärbung gegen T β H dargestellt. Die jeweils durchschnittlich sieben Zellen des AL2-Clusters liegen ventromedial des Antennallobus. (Abbildung 3.13 B). Der dreigeteilte VM-Cluster ist an der ventralen Mittellinie des subösophagealen Ganglions lokalisiert und beinhaltet insgesamt 27 Zellen, durchschnittlich wurden jedoch nur 24 Zellen gefunden (Abbildung 3.12 A, B, C). Ein Beispiel für diese 27 Zellen ist in Abbildung 3.19 B dargestellt. In dem am weitesten anterior gelegenen Cluster VMmd konnten durchschnittlich neun Neurone gefunden werden (Abbildung 3.13 C) und im Cluster VMmx acht (Abbildung 3.13 D). Im posterior gelegenen dritten Cluster VMIb wurden durchschnittlich sieben Zellen (Abbildung 3.13 C) angefärbt. Die weiter posterior gelegenen Cluster G0a und G0b beinhalten jeweils eine T β H-positive Zelle pro Cluster und befinden sich lateral-superior des optischen Pedunkels und lateral der vertikalen Loben des Pilzkörpers (Abbildung 3.12 A). G2a,b umfasst im Durchschnitt drei Neurone und ist dorsolateral des ventromedial Protocerebrums gelegen (Abbildung 3.12 A). Die Cluster PSM und PB1 liegen am weitesten posterior (Abbildung 3.12 B, C). Der Cluster PSM hat pro Hemisphäre ein T β H-positives Neuron (Abbildung 3.13 F Stern) und liegt ebenso wie der PB1-Cluster (Abbildung 3.12 C, und 3.13 F und G) um die protocerebrale Brücke herum. Die Zellen des PSM-Clusters unterscheiden sich von den Zellen des PB1-Clusters durch ihre Größe. Der PB1-Cluster variiert stark in der Anzahl der Neurone. Je nach Stärke der Färbung konnten 13 bis 63 Somata gezählt werden. Durchschnittlich wurden hier 46 T β H-positive Neurone gefunden.

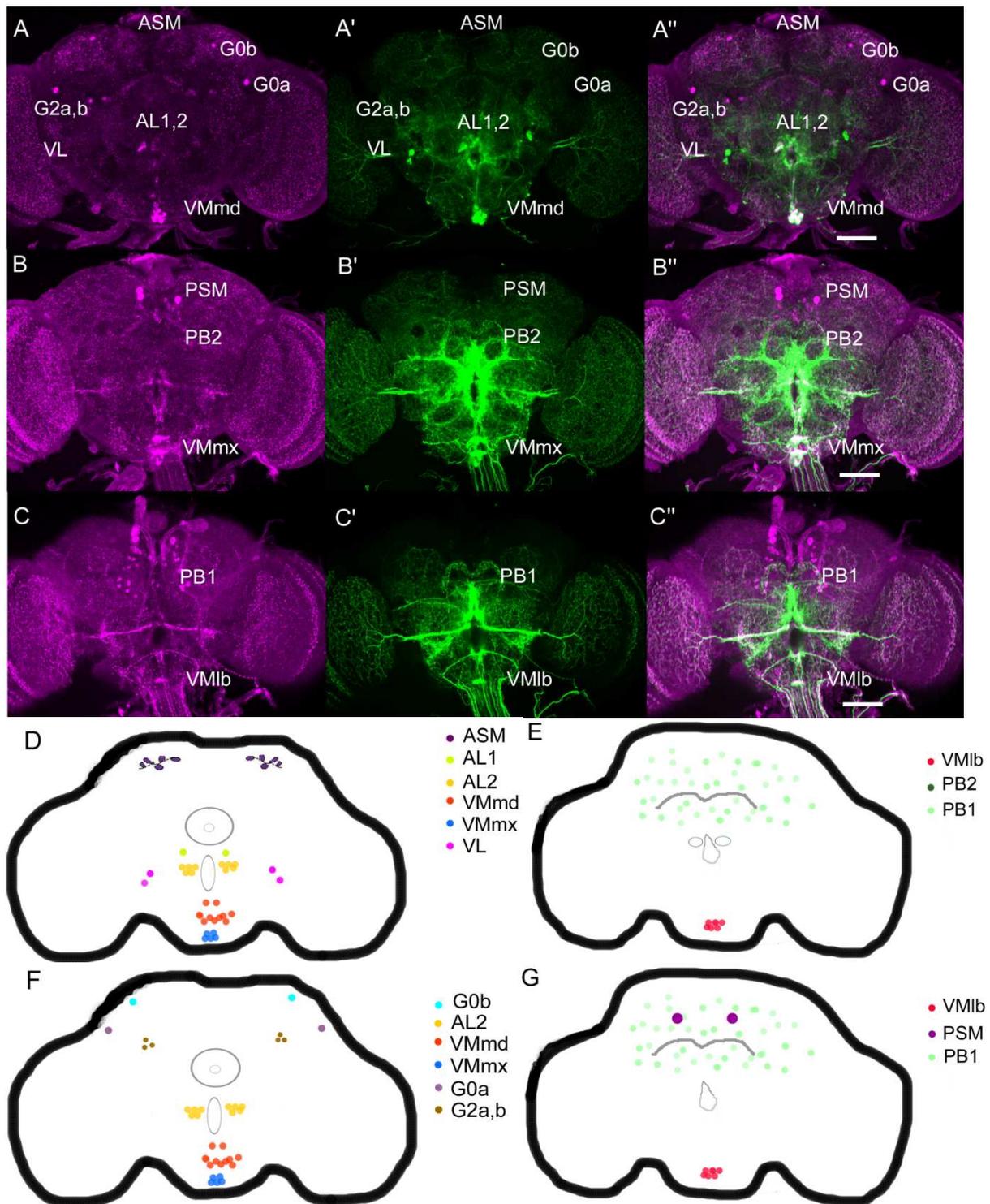
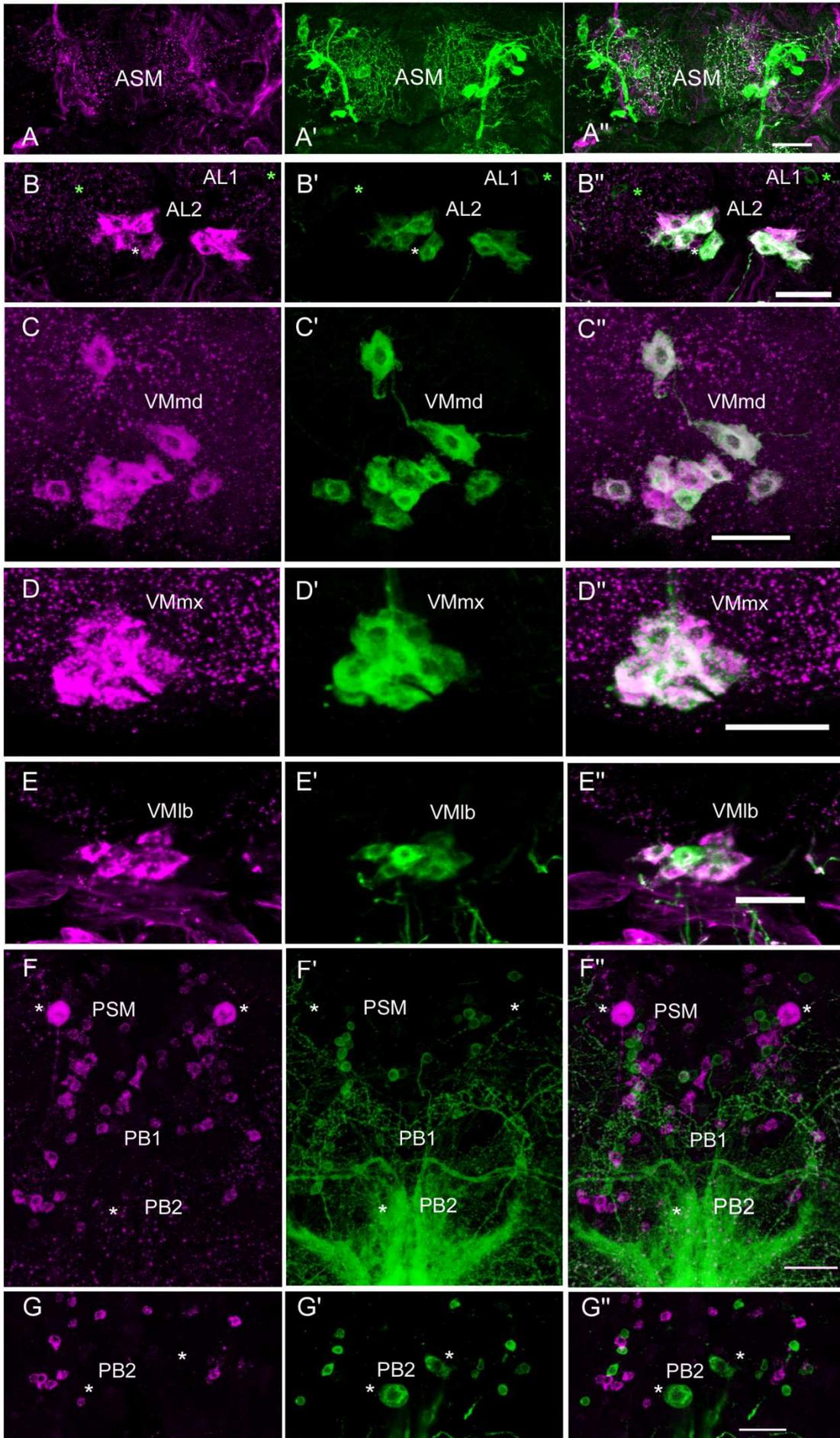


Abbildung 3.12: Die GAL4-Expressionsdomänen der *dTdc2-GAL4* Linie sind mit Hilfe des *UAS-mCD8::GFP* sichtbar gemacht. Dargestellt sind konfokale Bilderstapel, die jeweils in drei Gruppen von anterior nach posterior zusammengefasst wurden, ausgehend vom anterioren Teil des Gehirns (A-A'') bis zum posterioren Teil des Gehirns (C-C''). TβH-positive Neurone (magenta) lassen sich in den Clustern G0a, G0b, AL2, G2a,b, VMmd (A), PSM, VMmx (B), PB1 und VMLb (C) zuordnen. GFP-positive Neurone (grün) sind in den Clustern ASM, AL1, AL2 VL, VMmd (A'), PB2, VMmx (B'), PB1 und VMLb (C') zu erkennen. Eine Colokalisation (weiß) von GFP- und TβH-positiven Neuronen ist nur in den Clustern AL2, VMmd (A''), VMmx (B'') und VMLb (C'') ersichtlich. D-E) Schematische Übersicht über die Lage der anterior (D) und posterior (E) gelegenen GAL4-Expressionsdomänen von *dTdc2-GAL4*. F-G) Schematische Übersicht über die TβH-positiven Cluster anterior (F) und posterior (G) im Fliegenhirn. Balken entsprechen 100 μm. Die Abbildung wurde von H. Scholz als Übersicht zur Verfügung gestellt.

GFP-positive Neurone wurden in den Clustern ASM, AL1, AL2, VL, VM und PB2 gefunden (Tabelle 3.1). Der ASM-Cluster setzt sich aus durchschnittlich fünf Neuronen zusammen, die anterior-superior-medial des Protocerebrums liegen (Abbildung 3.12 A', Abbildung 3.13 A'). AL1 ist am weitesten anterior gelegen auf Höhe der Antennalloben und besitzt ein GFP-positives Neuron pro Gehirnhälfte (Abbildung 3.13 B' grüne Sterne). Im Cluster AL2 werden durchschnittlich sieben GFP-positive Neurone gefunden (Abbildung 3.12 A' und 3.13 B'). Der VL-Cluster hat jeweils zwei GFP-positive Neurone und ist zwischen den Antennalloben und dem ventrolateral gelegenen Protocerebrum lokalisiert (Abbildung 3.12 A'). Der Cluster PB2 beinhaltet jeweils ein Neuron, das ventral der protocerebralen Brücke liegt (Abbildung 3.12 B', und 3.13 F' Sterne, G'). Ebenso sind Neurone im Cluster PB1 und VM zu erkennen. PB1 beinhaltet durchschnittlich 22 GFP-positive Somata (Abbildung 3.12 C' und 3.13 F' und G'). Die drei VM-Cluster weisen durchschnittlich 24 Neurone auf. Hier sind in VMmd neun, in VMmx acht und in VMlb sieben GFP-positive Neurone zu erkennen (Abbildung 3.12 B', C' und D' und 3.13 C', D' und E').

Eine Colokalisation der GFP- und T β H- Antikörperfärbung ist nur in den Clustern AL2 und VM zu erkennen (Abbildung 3.12 A'', B'' und C'' und Tabelle 3.2). Im AL2-Cluster exprimieren durchschnittlich sieben Zellen T β H und GFP. Es gibt jedoch selten zusätzliche T β H-positive Neurone (Abbildung 3.13 B-B'' weißer Stern). Im VMmd-Cluster exprimieren neun Neurone T β H und GFP, im VMmx-Cluster acht Neurone und im VMlb-Cluster sieben Neurone (Abbildung 3.13 C'', D'' und E''). Im PB1-Cluster ist sowohl eine GFP-Expression als auch T β H-Expression zu finden, jedoch nicht in den gleichen Zellen (Abbildung 3.12 C'' und 3.13 F'' und G''). Dies deutet darauf hin, dass nur Neurone des AL2- und VM-Clusters sowohl GFP und T β H exprimieren. Die Expression von T β H in diesen Kandidatenneuronen in der $w^{1118}; T\beta H^{nM18}$ Mutante führte zur Wiederherstellung der Präferenz der Mutante.

Abbildung 3.13: Im AL2- und VM-Cluster von $dTdc2$ -GAL4; UAS - $mCD8$::GFP-Fliegen ist sowohl GFP als auch T β H exprimiert. Gezeigt sind die Vergrößerungen der einzelnen Cluster. Die T β H-Expression ist in magenta dargestellt, die GFP-positiven Neurone in grün und eine Colokalisation in weiß. Die Aufnahmen wurden von anterior nach posterior aufgenommen. A-A'') Der ASM-Cluster ist nur GFP-positiv. B-B'') Der AL1-Cluster (grüne Sterne) ist nur GFP-positiv, während GFP und T β H im AL2-Cluster in fast allen Neuronen colokalisieren. Das zusätzliche T β H-positive Neuron ist mit einem weißen Stern markiert. C-E'') In den drei VM-Clustern ist eine vollständige Colokalisation der T β H und GFP Expression ersichtlich. F-G'') In den Clustern PB1, PB2 und PSM ist die Expression von T β H und GFP nicht überlappend. PB2 ist nur GFP-positiv, während PSM nur T β H-positiv ist. In PB1 gibt es T β H-positive, sowie GFP-positive Neurone, die nicht colokalisieren. Die weißen Balken entsprechen 25 μ m.



3.3.2 Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen der *dTdc2-GAL4*; *ChaGAL80*-Linie und Vergleich mit der T β H-Expression im adulten Nervensystem

Die Expression von GAL80 unter der Kontrolle eines cholinergen Promoters reduziert die GAL4-Expression der *dTdc2-GAL4*-Linie um die Expressionsdomänen in cholinergen Neuronen. Dadurch sollte der VM-Cluster auf drei bis fünf Neurone reduziert werden (Zhou *et al.*, 2008).

In den Clustern AL1, VL, ASM, VM und PB1 lässt sich GFP in Gehirnen von *w¹¹¹⁸; UAS-mCD8::GFP/dTdc2-GAL4; ChaGAL80*-Fliegen nachweisen (Tabelle 3.1). Der AL1-Cluster, welcher am weitesten anterior liegt, enthält je ein GFP-positives Neuron. Jeweils zwei GFP-positive Neurone liegen im VL-Cluster, der zwischen den Antennalloben und dem ventrolateral gelegenen Protocerebrum lokalisiert ist (Abbildung 3.14 A'). Das anterior-superior-medial des Protocerebrums gelegene ASM-Cluster besitzt jeweils fünf GFP-positive Somata (Abbildung 3.14 A'). Der AL2-Cluster beinhaltet zwei GFP-positive Neurone (Abbildung 3.15 A'). Im VMmd- und VMmx-Cluster befinden sich durchschnittlich fünf GFP-positive Neurone (Abbildung 3.15 B', C') und im dritten Cluster, dem VMlb-Cluster, zwei GFP-positive Neurone (D'). Der posterior gelegene Cluster-PB1 enthält durchschnittlich zwei GFP-positive Neurone. Diese Zellen waren jedoch meist schwach angefärbt.

In den Clustern AL2 und VM wird sowohl GFP als auch T β H exprimiert (Tabelle 3.2). Im Cluster AL2 exprimieren durchschnittlich zwei Neurone GFP und T β H (Abbildung 3.15 A''). Im VMmd- und VMmx-Cluster colokalisieren alle fünf GFP-positive Neurone mit den T β H-positiven Neuronen (Abbildung 3.16 B'' und C''). Der letzte VM-Cluster, VMlb, enthält nur zwei Neurone, die GFP und T β H exprimieren (D'').

Da die Expression von T β H in diesen Neuronen nicht zur Rettung der Ethanolpräferenz von *T β H^{nM18}*-Mutanten führt, haben diese T β H Neurone wahrscheinlich keine Funktion bei der Vermittlung von Präferenz.

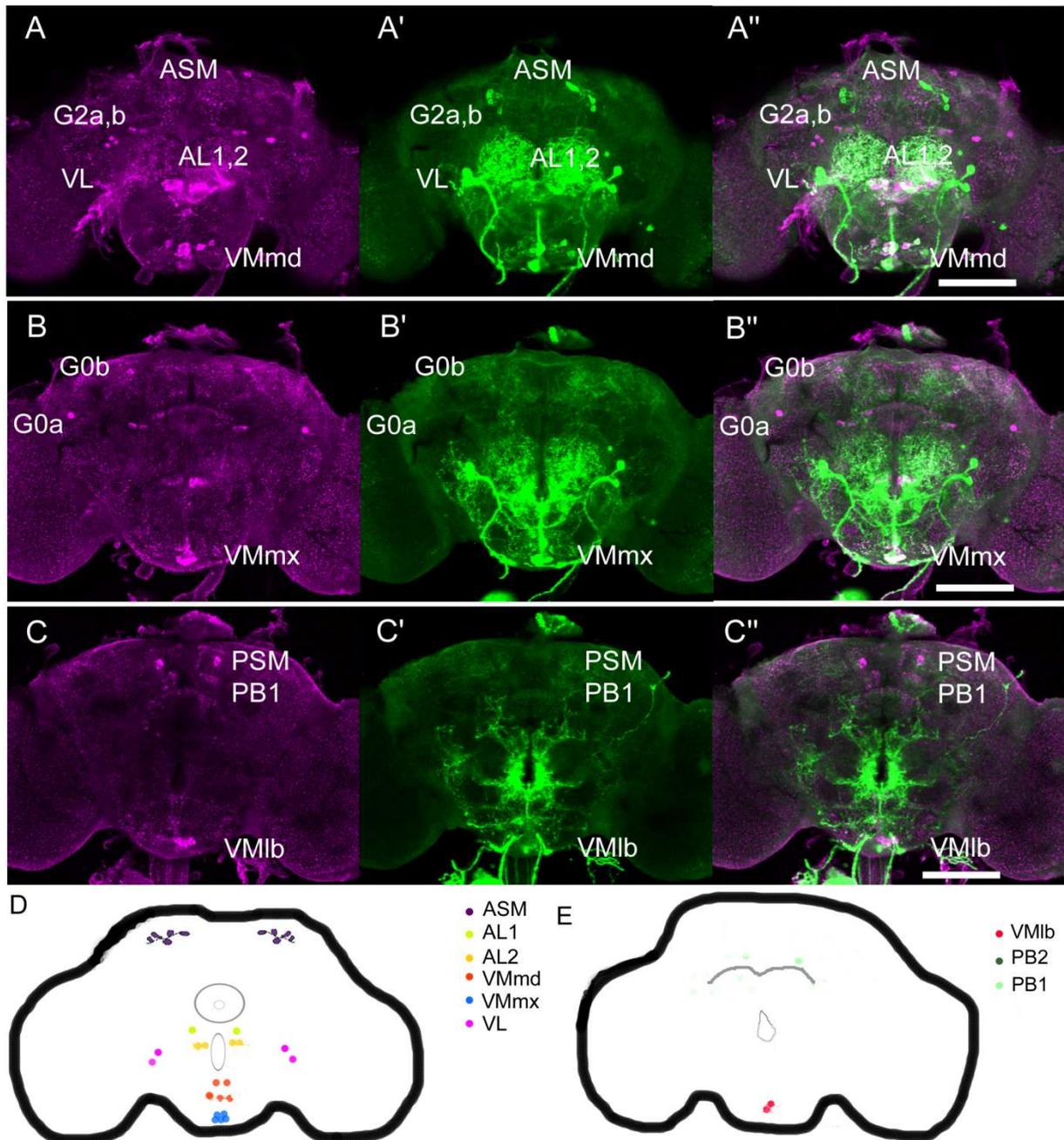


Abbildung 3.14: Übersicht über die T β H- und GFP-Expression in transgenen $w^{1118}; UAS-mCD8::GFP/dTdc2-GAL4; ChaGAL80$ -Fliegengehirnen. Das adulte Gehirn ist von anterior nach posterior dreigeteilt. Die Cluster G2a,b, AL2, VMmd (A), G0a, G0b, VMmx (B), PSM, PB1 und VMlb (C) sind T β H-positiv (magenta). GFP-positiv (grün) sind hingegen die Cluster ASM, AL1, AL2, VL, VMmd (A'), VMmx (B'), PB1 und VMlb (C'). In den Clustern AL2, VMmd (A''), VMmx (B'') und VMlb (C'') überlappen GFP- und T β H-positive Neurone. D) Schematische Übersicht über die anterior gelegenen GAL4-Expressionsdomänen von $dTdc2-GAL4; ChaGAL80$. E) Übersicht über die posterior gelegenen Cluster der GAL4-Expressionsdomänen. Die weißen Balken entsprechen 100 μ m.

In den Clustern AL1, AL2, G2a,b, VM, PB2, PI, PSL, lat SOG und G5c der $w^{1118}; UAS-mCD8::GFP$; 6.2_2 $T\beta H$ -GAL4-Fliegen lässt sich GFP nachweisen (Tabelle 3.1). Im AL1-Cluster befindet sich ein GFP-positives Neuron (Abbildung 3.16 A' Sterne). Der AL2-Cluster beinhaltet ebenfalls ein GFP-positives Neuron (Abbildung 3.16 A' und 3.18 A'). Die VM-Cluster sind nicht alle GFP-positiv, sondern nur VMmd mit drei GFP-positiven Neuronen und VMmx mit einem GFP-positiven Neuron (Abbildungen 3.18 B', C' und D' und 3.19 A', B' und C'). Im VM-Cluster wurde ein ungepaartes GFP-positives VUM-Neuron gefunden mit symmetrischen Verästelungen. Da außerdem die Projektionen zum subösophagealen Ganglion (SOG) hin aufsteigen, gehört dieses VM zum Typ VUMa (Hampel, 2007; Busch *et al.*, 2009). Lateral des SOG befinden sich durchschnittlich vier GFP-positive Somata. Diese Neurone werden in dem Cluster lateral SOG (lat SOG) zusammengefasst (Abbildung 3.16 A'). Im ventro-lateralen Protocerebrum befinden sich pro Hemisphäre zehn GFP-positive Zellen, die den Ellipsoidkörper (eb) innervieren (Abbildung 3.16 A'). Diese Neurone des Clusters G2a,b sind Weitfeld Neurone des Ellipsoidkörpers und werden Ringneurone (R-Neurone) genannt. Die hier dargestellten R-Neurone projizieren zum Ellipsoidkörper durch den Ellipsoidkörper-Kanal und verbleiben mit ihrer Verzweigung im inneren und mittleren Ring. Außerdem ist die Innervierung auf den rostralen Bereich des Ellipsoidkörpers beschränkt (Abbildung 3.17 A bis C''). Auf Grund dessen sollten dies R1, R2 und R3 Neurone darstellen (Hanesch *et al.*, 1989; Renn *et al.*, 1999). Der G5c Cluster beinhaltet ein GFP-positives Neuron und befindet sich lateral des ventrolateralen Protocerebrums (Abbildung 3.16 A'). Auffällig sind die neun großen GFP-positiven Neurone am Rand des posterior-superior-medialen Protocerebrums, die als Pars intercerebralis beschrieben wurden und deswegen dem Cluster PI (Pars intercerebralis) zugeordnet werden (Abbildung 3.16 B' und 3.17 D') (Hampel, 2007; Sigmund und Korge, 2001).

Im PB2-Cluster (Abbildung 3.17 E') befinden sich durchschnittlich drei große GFP-positive Neurone ventral der protocerebralen Brücke. Lateral der protocerebralen Brücke befinden sich ungefähr sechs paarige GFP-positive Zellen. Anhand ihrer Lage posterior-superior-lateral zum Protocerebrum werden diese Zellen zu dem PSL (posterior superior lateral) Cluster zusammengefasst (Abbildung 3.16 C'). Im PB1-Cluster befinden sich ungefähr vier GFP-positive Neurone, die jedoch sehr schwach gefärbt wurden und daher die Anzahl nicht korrekt bestimmt werden konnten (Abbildung 3.17 E').

Eine Colokalisation von GFP- und $T\beta H$ -positiven Neuronen konnte nur in den VMmx- und VMmd-Cluster, sowie im AL2-Cluster detektiert werden (Tabelle 3.2). Im AL2-Cluster überlappt ein GFP- und $T\beta H$ -positives Neuron (Abbildung 3.18 A'', Pfeile). Der VMmd-Cluster weist im Durchschnitt ein GFP- und $T\beta H$ -positives Neuron auf (Abbildung 3.18 B'', Pfeil, 3.19 A'' und B'', Pfeile). Im Cluster VMmx überlappt ein GFP- und $T\beta H$ -positives

Neuron (Abbildung 3.18 C“, Pfeil). Die Abbildungen 3.19 B‘ und C‘ verdeutlichen die Lage der drei VM-Cluster mit den insgesamt 24 - 27 TβH-positiven Neuronen. In Abbildung 3.20 B - B“ ist die Lage der VM-Cluster in anteriorer Ansicht dargestellt und in C-C“ in dorsaler Ansicht. In der Abbildung 3.19 A - A“ ist ein Beispiel für den VMmd-Cluster gezeigt, in dem vier GFP-positive Zellen zu finden sind (Sterne), von denen ein Neuron mit den TβH-positiven Neuronen colokalisiert (Pfeil). Die Übersicht aller VM-Cluster in 3.19 B-B“ (Pfeil) zeigt ein Beispiel in dem ein GFP-positives Neuron im VMmx-Cluster mit TβH überlappt. Im VMLb-Cluster konnte kein GFP-positives Neuron detektiert werden (Abbildung 3.18 D“ und 3.19 B“ und C“). Das Expressionsmuster der GAL4-Expressionsdomänen zeigte starke Schwankungen in den VM-Clustern. In neun von 13 untersuchten Färbungen konnten nur ein GFP- und TβH-positives Neuron im VMmd-Cluster gefunden werden und in sechs von 13 Färbungen nur im VMmx-Cluster. In zwei der 13 Färbungen konnten in beiden VM-Clustern jeweils ein GFP- und TβH-positives Neuron detektiert werden. In Tabelle 3.2 wird das häufigere Auftreten eines TβH- und GFP-positiven Neurons in VMmd durch eine „1“ gekennzeichnet und der seltenere Fall des VMmx-Clusters durch „0,5“ markiert.

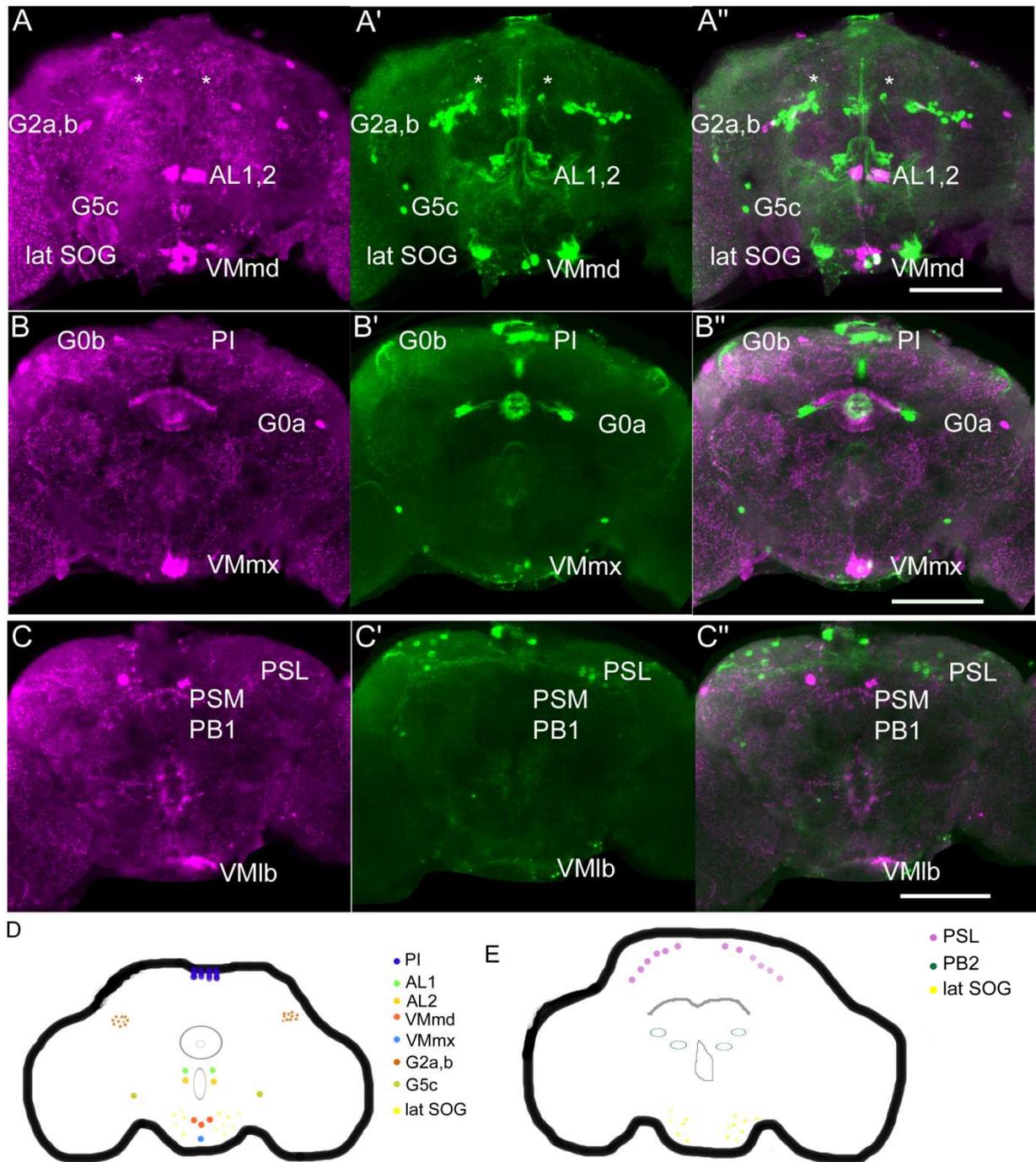


Abbildung 3.16: Übersicht von anterior nach posterior der GAL4-Expressionsdomänen in Gehirnen von *6.2_2 TβH-GAL4*-Fliegen. Die Cluster G2a,b, AL2, G0a, G0b, PB1, PSM und VM weisen TβH-positive Neurone auf (magenta). Die Cluster AL1 (Stern), AL2, G2a,b, G5c, VM, lat SOG (lateral des subösophagealen Ganglions), PI (Pars intercerebralis) und PSL (posterior superior lateral) weisen GFP-positive Neurone (grün) auf. In den Clustern AL2, VMmd und VMmx gibt es Neurone, die GFP und TβH exprimieren. Für eine genauere Beschreibung siehe Text und nachfolgende Abbildungen. D-E) Lage der GAL4-Expressionsdomänen von *6.2_2 TβH-GAL4* im anterioren Teil (D) und im posterioren (E) Teil des Fliegengehirns. Die weißen Balken entsprechen 100 µm.

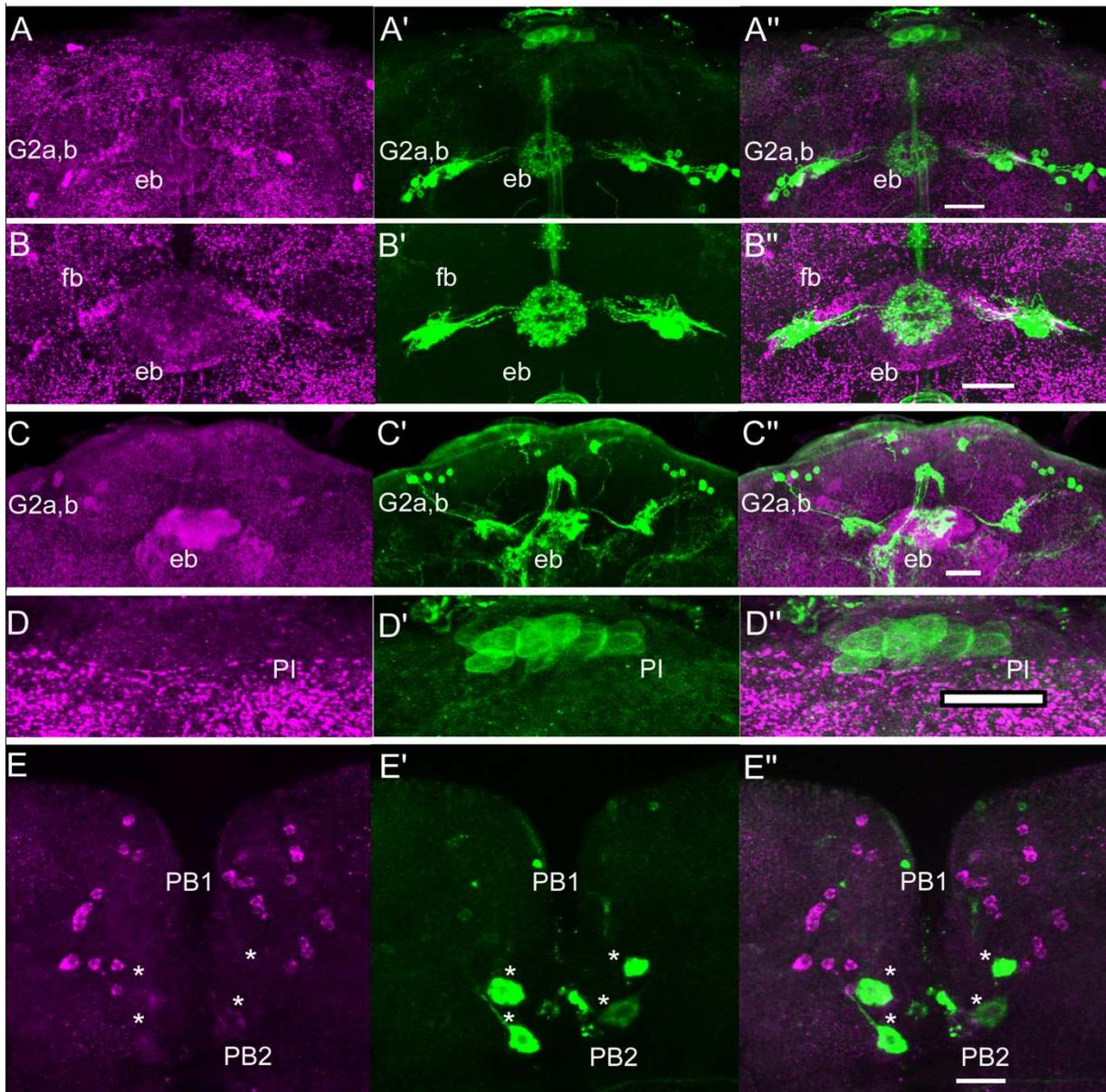


Abbildung 3.17: Detailansichten der GAL4-Expressionsdomänen von adulten Gehirnen der 6.2_2 $T\beta H$ -GAL4-Linie. A-B'') GFP-positive Neurone des Clusters G2a,b innervieren die Ringneurone des Ellipsoidkörpers (eb). Gezeigt ist die anteriore Ansicht des Ellipsoidkörpers und des fächerförmigen Körpers (fb). C-C'') Gezeigt ist die dorsale Ansicht des Ellipsoidkörpers mit den Weitfeld Ringneuronen 1, 2 und 3. D-D'') Die neun Neurone des PI-Clusters sind GFP-positiv und liegen am Rand des posterior-superior-medialen Protocerebrums. E-E'') Der ventral der protocerebralen Brücke gelegene Cluster PB2 hat hier vier große GFP-positiven Neurone (Sterne). Hier liegen ebenfalls die wenigen kleinen Neurone des Clusters PB1, welche nicht mit $T\beta H$ -positiven Neuronen überlappen. Die weißen Balken entsprechen 25 μm .

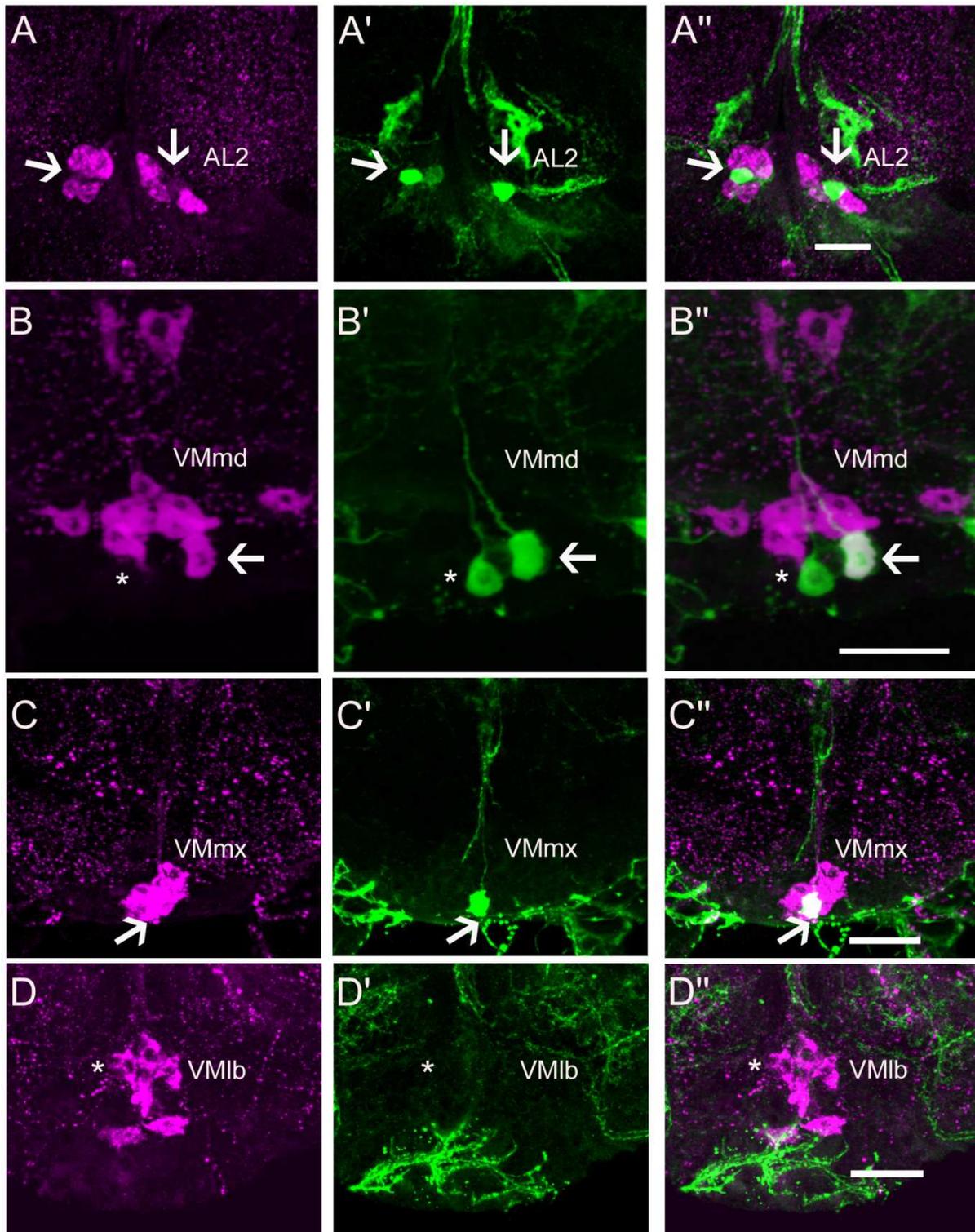


Abbildung 3.18: Eine Überlappung von GFP- und T β H-positiven Neurone ist nur im AL2 Cluster, VMmd- und VMmx-Cluster zu finden. A-A'') Vergrößerung des AL2-Clusters mit jeweils einer GFP- und T β H-positiven Zelle (Pfeile) und einem nur GFP-positiven Neuron. Die Colokalisation ist wegen der schwachen T β H-Expression in diesen Zellen schlecht zu erkennen. B-B'') Im VMmd-Cluster colokalisiert ein GFP- und T β H-positives Neuron (Pfeil). Der Cluster zeigt ein weiteres GFP-positives Neuron (Stern). C-C'') Im VMmx-Cluster befindet sich ein GFP- und T β H-positives Neuron (Pfeil). D-D'') Im VMlb-Cluster konnten keine GFP-positiven Neurone (Stern) gefunden werden. Die weißen Balken entsprechen 25 μ m.

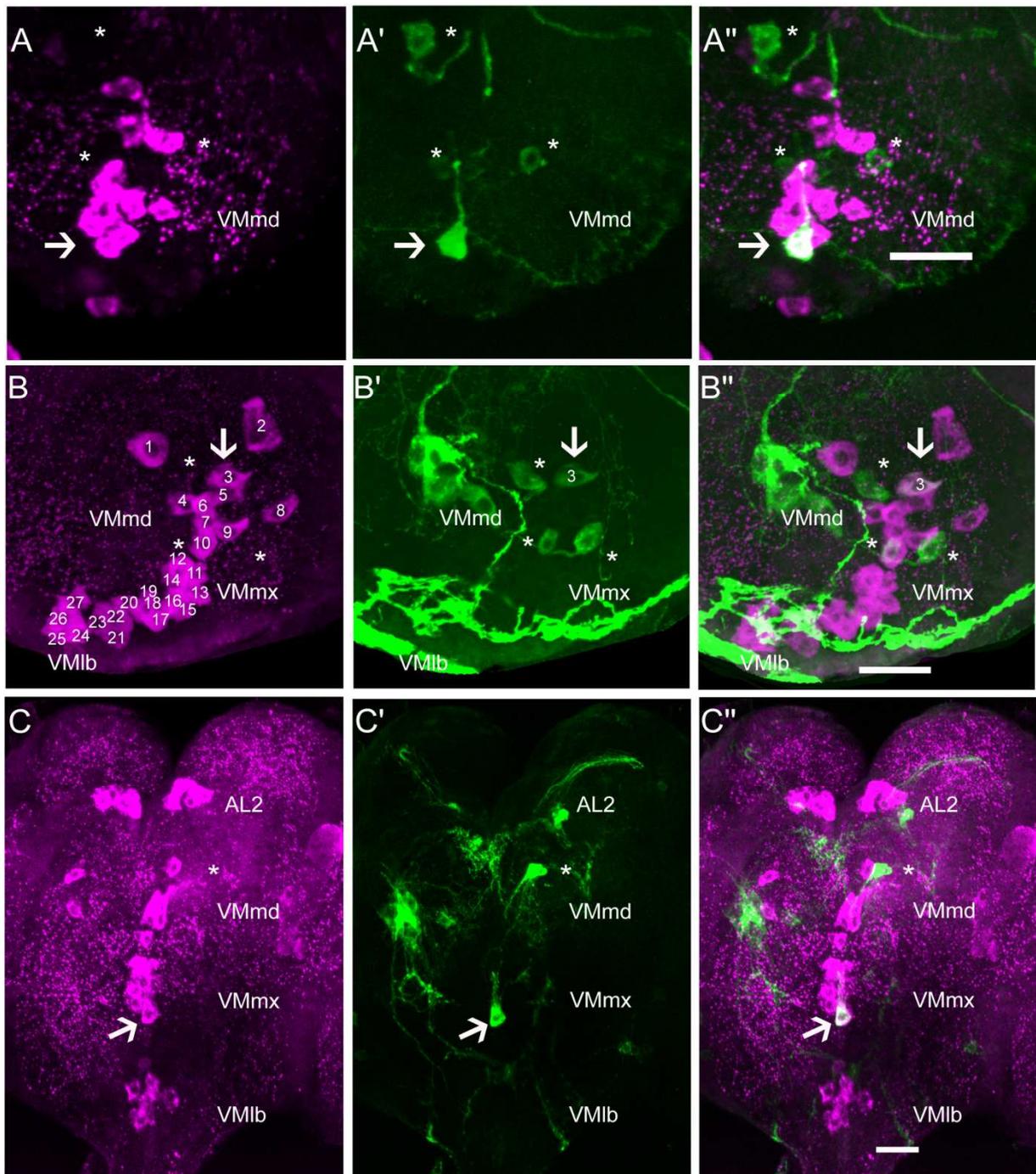


Abbildung 3.19: Der VM-Cluster weist GFP- und T β H-positive Neurone auf. Ansicht in A und B ist von anterior nach posterior und in C ist eine dorsale Ansicht dargestellt. A-A'') Eines (Pfeil) der vier (Pfeil, Sterne) GFP-positiven Neurone exprimiert ebenfalls T β H. B-B'') Übersicht über alle 27 T β H-positiven Neurone in den Clustern VMmd, VMmx und VMlb. Hier überlappt ein GFP- und T β H-positives Neuron im VMmd-Cluster. C-C'') Die dorsale Ansicht zeigt die drei verschiedenen VM-Cluster. Im VMmx-Cluster befindet sich ein GFP- und T β H-positives Neuron (Pfeil). Im VMmd-Cluster ist ein GFP-positives Neuron zu erkennen, welches nicht mit T β H überlappt (Stern). Im AL2-Cluster ist ein zusätzliches GFP-positives Neuron zu erkennen. Die weißen Balken entsprechen 25 μ m.

3.3.4 Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen der *Feb15*-GAL4-Linie und Vergleich mit der T β H-Expression im adulten Nervensystem

Die Linie *Feb15* wurde in einer Suche nach GAL4-Linien, die in den Zellen des Pars intercerebralis exprimieren, isoliert. Einige dieser Zellen des Pars intercerebralis sind T β H-positiv (Siegmund und Korge, 2001).

Feb15 exprimiert GAL4 in den Clustern AL2, G0a, G0b, VM, lat SOG, PI, PB2 und PSM im adulten Gehirn (Abbildung 3.20). Die GAL4-Expression ist mit Hilfe eines *UAS-mCD8::GFP* Konstrukts sichtbar gemacht worden. Hierbei wurden pro Gehirn durchschnittlich 333 Neurone identifiziert (Tabelle 3.1).

Im AL2-Cluster befinden sich elf GFP-positive Neurone (Abbildung 3.20 A' und 3.21 A'). Die Cluster G0a und G0b enthalten jeweils ein GFP-positives Neuron (Abbildung 3.20 A'). Die VM-Cluster sind alle GFP positiv und weisen durchschnittlich im VMmd-Cluster 20, im VMmx-Cluster 17 und im VMlb-Cluster 13 GFP-positive Neurone auf (Abbildungen 3.20 A', B' und C' und 3.21 B', C' und D'). Hier wurden die beiden großen, wahrscheinlich sekretorischen, Neurone im VMlb-Cluster wegen der Lage zum VM-Cluster hinzugezählt (Abbildung 3.21 D' grüne Sterne). Lateral des subösophagealen Ganglions, im Cluster lat SOG, befinden sich durchschnittlich 32 GFP-positive Somata, die jedoch wegen der unterschiedlich starken Färbung evtl. nicht immer vollständig erfasst worden sind (Abbildung 3.20 A' bis C'). In Fliegen dieser Linie werden 15 große GFP-positive Neurone am Rand des posterior-superior-medialen Protocerebrums, also im PI Cluster gefunden (Abbildung 3.20 B'). Ebenfalls posterior gelegen befindet sich ein Neuron des PSM-Clusters und die vier Neurone des PB2-Clusters (Abbildung 3.20 C'). Außerdem befinden sich durchschnittlich 100 GFP-positive Neurone pro Gehirnhälfte vor allem anterior und posterior im Gehirn verteilt (Abbildung 3.20), die sich nicht in den bislang hier beschriebenen Cluster einordnen lassen. Hier kommt es auch zu größeren Varianzen, da je nach Qualität der Färbung mehr oder weniger Neurone gefunden wurden. Diese Neurone wurden, da sie nicht T β H-positiv waren, nicht näher charakterisiert.

Eine Expression von GFP und T β H konnte nur in den Clustern AL2, G0a, G0b, VM und PSM nachgewiesen werden (Abbildung 3.20). Im AL2-Cluster exprimieren sieben Neurone GFP und T β H. Vier zusätzliche GFP-positive Neurone sind in Abbildung 3.21 mit einem Stern markiert, die anderen vier nur GFP-positiven Neurone konnten aufgrund der Lage durch die zweidimensionale Darstellung nicht abgebildet werden. Im Cluster G0a und G0b exprimiert jeweils das eine Neuron GFP und T β H (Abbildung 3.20 A''). Der VMmd-Cluster weist im Durchschnitt neun GFP- und T β H-positive Neurone auf (Pfeile), wobei oft ein T β H-positives Neuron nicht GFP-positiv war (Stern) (Abbildung 3.21 B''). Im VMmx-Cluster exprimieren

sieben Neurone GFP und T β H (Abbildung 3.21 C“, Stern). Im VMlb-Cluster konnten sieben GFP-positive Neurone detektiert werden (Abbildung 3.21 D‘). Das in den beiden Clustern zusätzliche T β H-positive Neuron ist mit einem Stern gekennzeichnet. Im Cluster PSM exprimiert das eine Neuron GFP und T β H (Abbildung 3.20 C“).

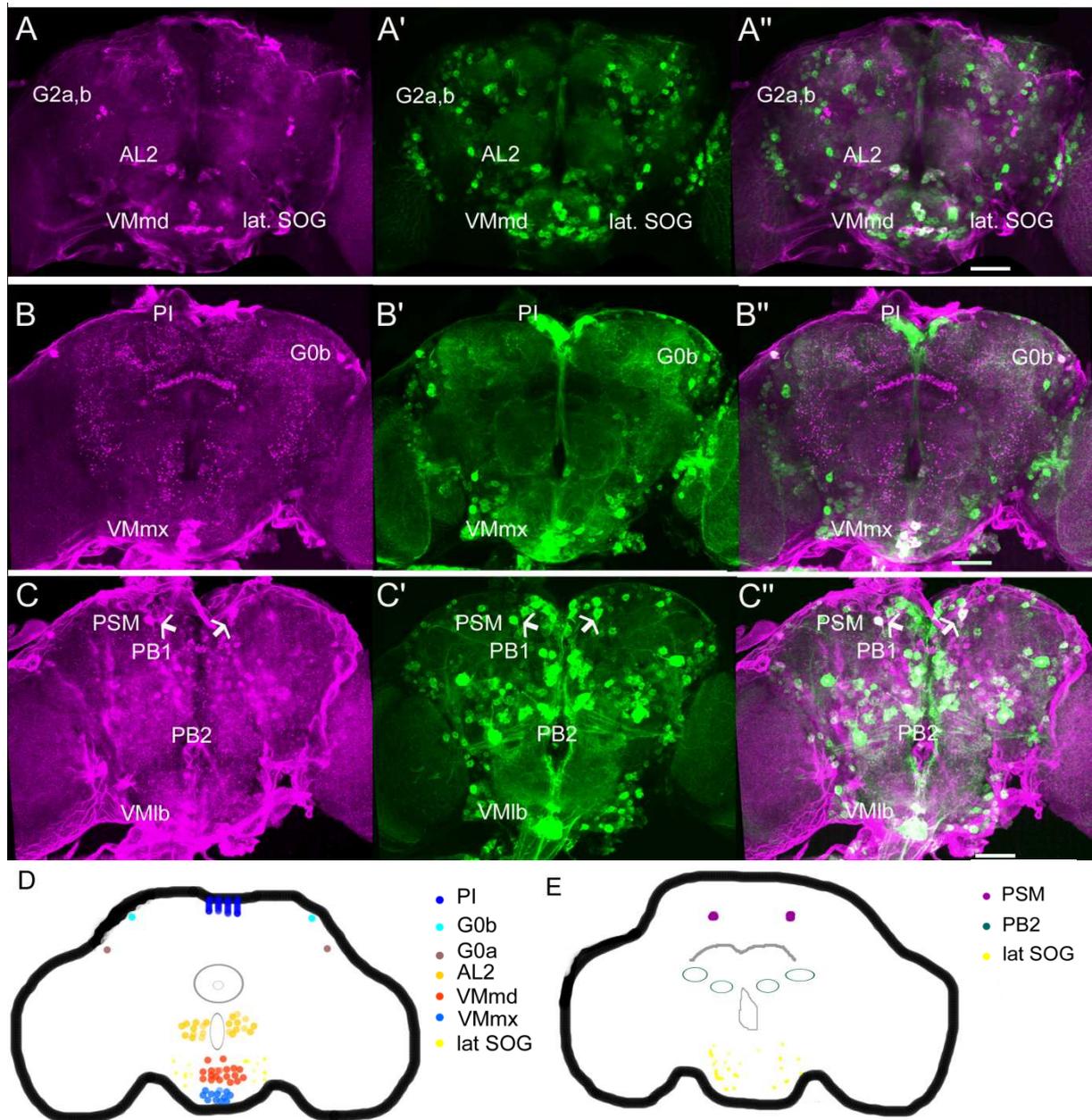


Abbildung 3.20: Übersicht über die T β H- (magenta) und GFP- (grün) Expression in transgenen *w¹¹¹⁸; UAS-mCD8::GFP/Febl5-GAL4*-Fliegegehirnen. Das adulte Gehirn ist von anterior nach posterior dreigeteilt. Die Cluster AL2, G2a,b, VMmd, lat SOG (A), G0b, VMmx, PI (B), PB2, PSM, VMlb (C) und viele zusätzliche Neurone anterior und posterior im Gehirn sind GFP-positiv. A“-C“ Eine Kolorisation von GFP- und T β H-positiven Neuronen konnte nur in den Clustern AL2, G0a, G0b, VM und PSM detektiert werden. D-E) Schematische Übersicht der beschriebenen GAL4-Expressionsdomänen im Gehirn von *Febl5-GAL4*-Fliegen von (D) anterior und (E) posterior. Die weißen Balken entsprechen 50 μ m.

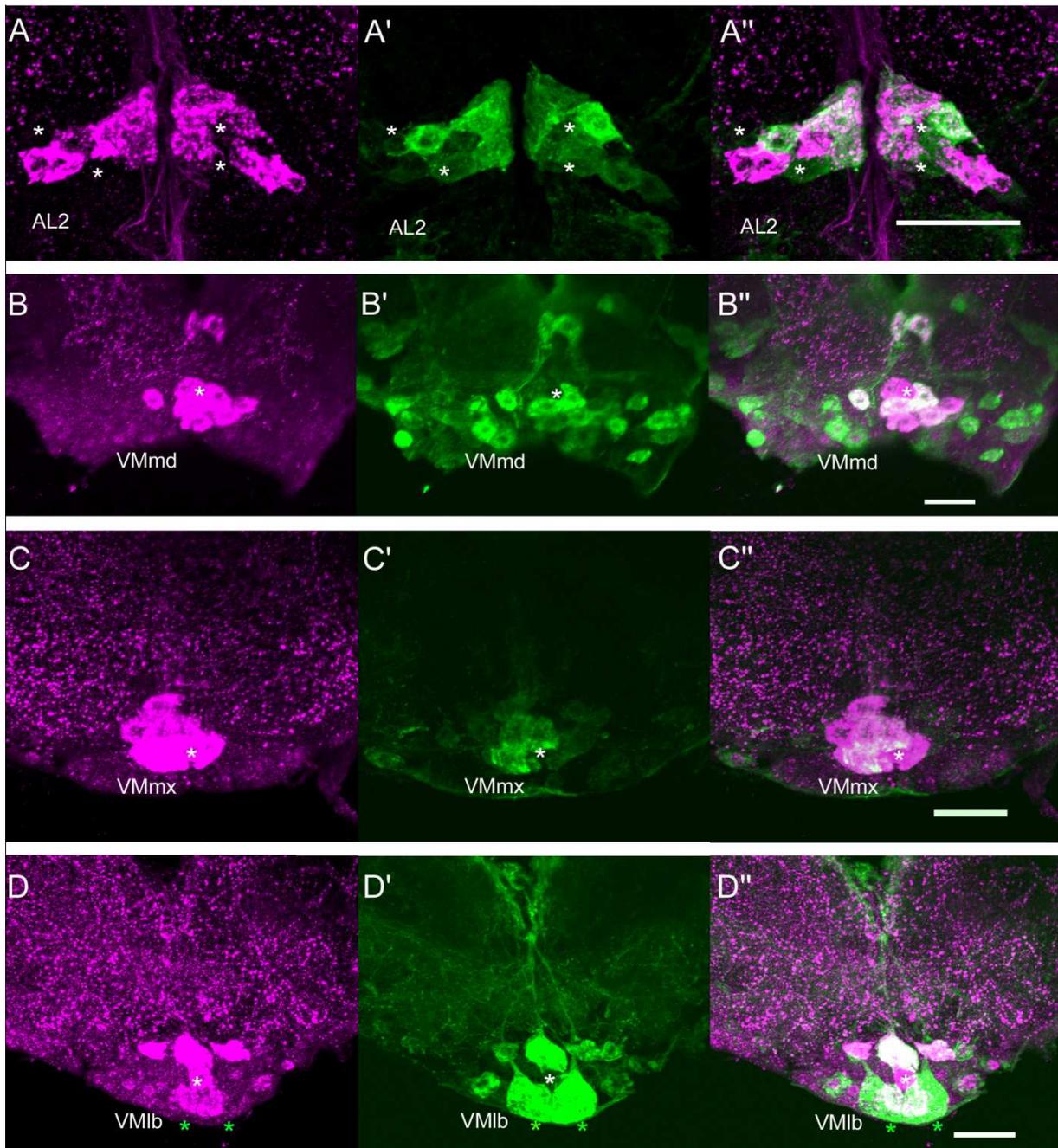


Abbildung 3.21: Eine Überlappung von GFP- und T β H-positiven Neurone ist nur im AL2-, G0a-, G0b-, PSM-Cluster und den VM-Clustern zu finden. A-A'') Vergrößerung des AL2-Clusters mit jeweils elf GFP- und sieben T β H-positiven Zellen. Zusätzliche GFP-positive Neurone sind mit einem Stern markiert. Anhand des Übereinanderlegens der optischen Schnitte sind nicht alle GFP-positiven Neurone zu erkennen. B-B'') Im VMmd-Cluster exprimieren meistens alle T β H-positiven Neuron auch GFP. Ein T β H-positives Neuron ist nicht GFP-positiv (Stern). C-C'') Im VMmx-Cluster befinden sich sieben GFP- und T β H-positiv Neurone und ein zusätzliches T β H-positives Neuron (Stern). D-D'') Im VMlb-Cluster befinden sich zwei große wahrscheinlich sekretorische Neurone (grüne Sterne). Sieben GFP- und T β H-positiv Neurone überlappen hier. Ein zusätzliches T β H-positives Neuron ist mit einem weißen Stern markiert. Die weißen Balken entsprechen 25 μ m.

3.3.5 Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen der NP7088-GAL4-Linie und Vergleich mit der T β H-Expression im adulten Nervensystem

Die GAL4-Expressionsdomänen der Fliegenlinie NP7088 wurde schon zuvor von Busch *et al.* (2009) charakterisiert. Hierbei wurden insgesamt 333 GFP-positive Neurone in Gehirnen von adulten Fliegen gefunden. Hier liegen Neurone ebenfalls im AL2- und VM-Cluster (Busch *et al.*, 2010).

NP7088 exprimiert GAL4 laut Busch *et al.* (2010) in den Clustern AL2, VM, SOG, MIL, PL und MSM im adulten Gehirn. Diese Cluster wurden hier auch gefunden, nur teilweise selten und wurden deswegen nicht in die Tabelle aufgenommen (Abbildung 3.22 und Tabelle 3.1). Für den Cluster SOG konnten bei sieben Gehirnen durchschnittlich $14 \pm 1,3$ Neurone gefunden werden und für den median-inferior-lateral des Protocerebrums gelegenen Cluster MIL $37 \pm 11,4$ Neurone bei fünf Gehirnen. Dieser Cluster war jedoch stets schwach angefärbt und besteht laut Busch *et al.* (2009) aus rund 97 GFP-positiven Neuronen. Der posterior-lateral des Protocerebrums gelegene Cluster PL wurde einmal gefunden mit zehn GFP-positiven Neurone und der median-superior-medial des Protocerebrums gelegenen Cluster MSM konnte zweimal mit jeweils 26 GFP-positiven Neuronen gefunden werden. Um diese Neurone näher zu charakterisieren, müssten neue Antikörperfärbungen durchgeführt werden.

Im AL2-Cluster befinden sich neun GFP-positive Neurone (Abbildung 3.22 A' und 3.23 A'). Die VM-Cluster sind alle GFP-positiv und weisen durchschnittlich im VMmd-Cluster 13, im VMmx-Cluster 10 und im VMlb-Cluster acht Neurone auf (Abbildungen 3.22 A', B' und C' und 3.23 B' und C').

Eine Expression von GFP und T β H konnte nur in den Clustern AL2 und VM nachgewiesen werden (Tabelle 3.2). Im AL2-Cluster exprimieren sieben Neurone GFP und T β H, jeweils ein zusätzliches GFP-positives Neuron ist mit einem weißen Stern markiert (Abbildung 3.23 A''). Der VMmd-Cluster weist im Durchschnitt neun GFP- und T β H-positive Neurone auf (Abbildung 3.23 B''). Im Cluster VMmx exprimieren neun Neurone GFP und T β H (Abbildung 3.23 C''). Im VMlb-Cluster konnten sieben GFP- und T β H-positive Neurone gefunden werden. Die beiden zusätzlichen T β H-positiven Neurone sind mit einem weißen Stern markiert und die beiden nur GFP-positiven Neurone mit jeweils einem grünen Stern (Abbildung 3.22 C''). Um jedoch genauere Aussagen treffen zu können, müssten weitere Antikörperfärbungen vorgenommen werden.

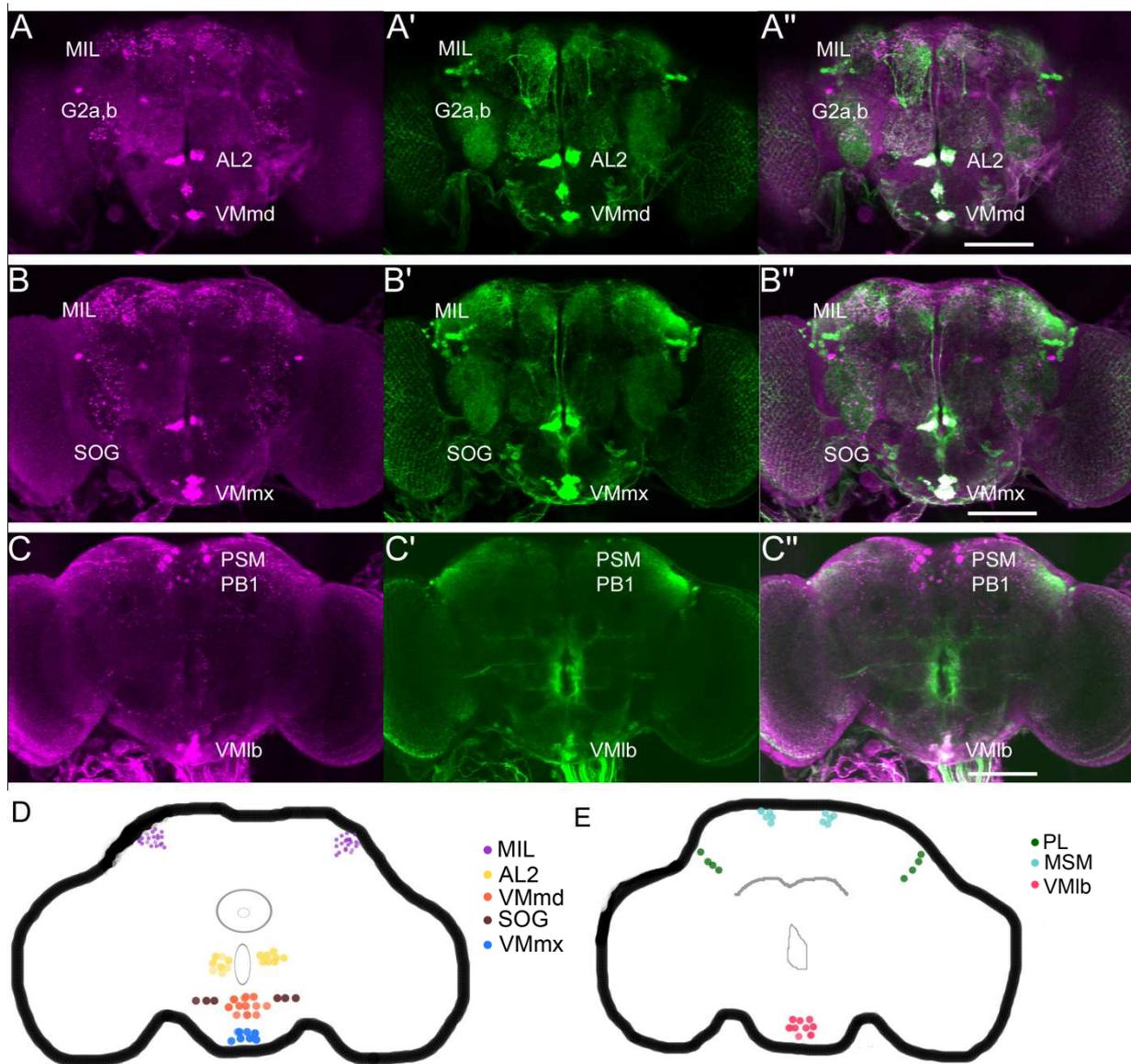


Abbildung 3.22: Übersicht von anterior nach posterior der GAL4-Expressionsdomänen der *NP7088-GAL4*-Fliegenlinie. Die Cluster G2a,b, AL2, PB1, PSM und VM weisen T β H-positive Neurone auf (magenta). Die Cluster AL2, VM, SOG, MIL, PL und MSM weisen hingegen GFP-positive Neurone auf (grün). Nur in den Clustern AL2 und VM ist eine Colokalisation von GFP- und T β H-positiven Neuronen zu erkennen. Die weißen Balken entsprechen 100 μ m.

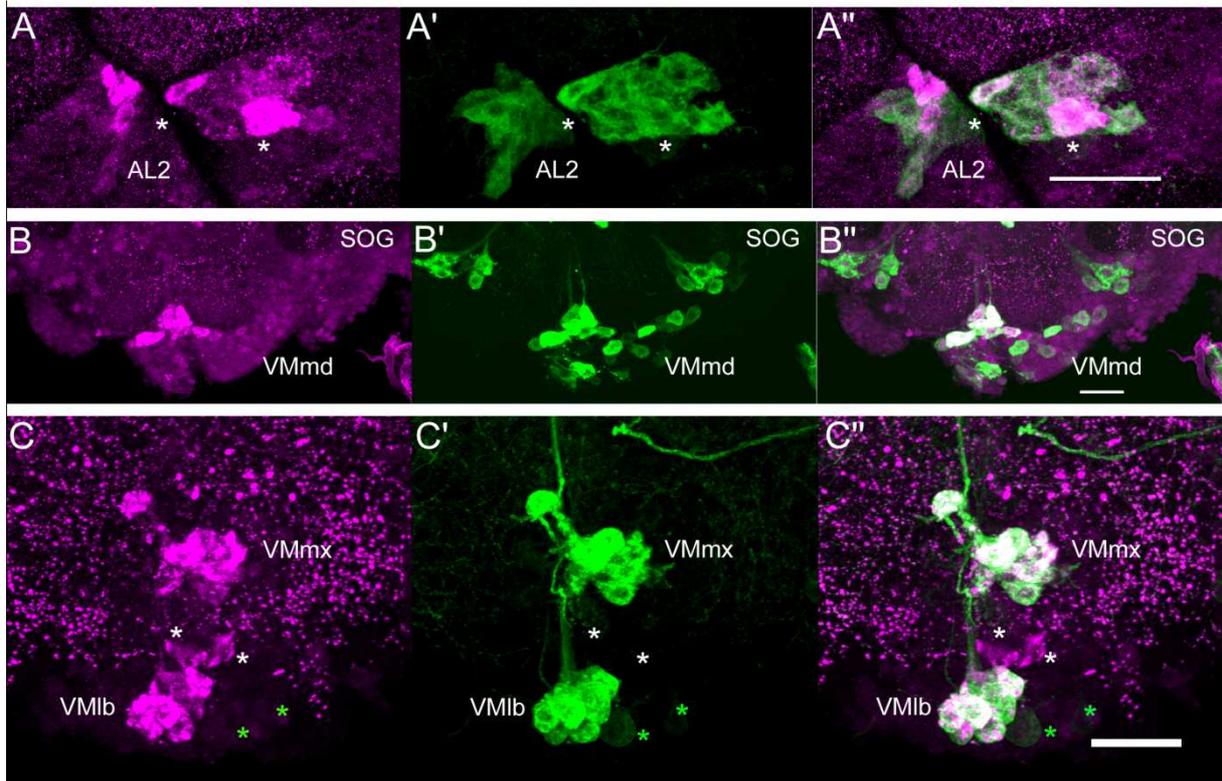


Abbildung 3. 23: GFP- (grün) und T β H- (magenta) positive Neurone sind nur im AL2- und den VM-Clustern zu finden. A-A'') Vergrößerung des AL2-Clusters. Hier ist jeweils ein zusätzliches GFP-positives Neuron mit einem Stern markiert. B-B'') Im VMmd-Cluster colokalisieren alle T β H-positiven Neurone mit GFP und es sind zusätzliche GFP-positive Neurone vorhanden (Stern). Links und rechts des VMmd-Clusters befindet sich das SOG-Cluster. C-C'') Im VMmx-Cluster überlappen alle T β H-positiven Neurone mit GFP. Der VMlb-Cluster weist zusätzliche nur T β H-positive Neurone auf (weiße Sterne) und zwei zusätzliche nur GFP-positive Neurone (grüne Sterne). Die weißen Balken entsprechen 25 μ m.

3.3.6 Die für die Ethanolpräferenz notwendigen Neurone können auf wenige Cluster reduziert werden

In den beiden nachfolgenden Tabellen 3.1 und 3.2 wurden die vorherigen Ergebnisse der Anzahl an Neuronen der einzelnen Cluster tabellarisch zusammengefasst. Hierbei wurden die Cluster einzeln pro Hemisphäre gezählt. Der Mittelwert der Neurone pro Cluster wurde gerundet und als Fehler der Standardfehler angegeben (MW \pm SEM). Außerdem wurde die minimale Anzahl an gefundenen Neuronen und die maximale Anzahl an Neurone angegeben (Min – Max). In Tabelle 3.1 sind die GAL4-Expressionsdomänen der einzelnen GAL4-Treiberlinien dargestellt. Die gesamten T β H-Färbungen wurden zusammengefasst und die gesamten T β H-positiven Neurone angegeben, deswegen unterscheidet sich die Anzahl der T β H-positiven Neurone im VMlb um ein Neuron von der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Anzahl.

In Tabelle 3.2 sind die Neurone zusammengefasst, die sowohl GFP als auch T β H exprimieren. Hierbei ist auffällig, dass in allen Fliegen der verschiedenen GAL4-Treiberlinien die Cluster AL2 und VM GFP- und T β H-positiv sind. Die GAL4-Expressionsdomänen in den Fliegen der GAL4-Treiberlinien *dTdc2-GAL4*, *Feb15* und *NP7088* weisen eine relativ identische Anzahl der Neurone im AL2, VMmd, VMmx und VMlb Cluster auf. Hingegen ist in *dTdc2-GAL4*; *ChaGAL80*-Fliegen das AL2- und VMlb-Cluster auf jeweils zwei Neurone reduziert. Ebenfalls ist eine Reduktion in den GAL4-Expressionsdomänen in Fliegen der Linie *6.2_2T β H-GAL4* zu sehen. In diesen Fliegen sind insgesamt nur noch durchschnittlich drei Neurone GFP- und T β H-positiv, welche im AL2- und VMmx- und/oder VMmd-Cluster vorkommen. Da außer in den Fliegen der Treiberlinie *Feb15* keine weiteren Cluster T β H und GFP exprimieren und sowohl die Expression von *UAS-T β H* unter der Kontrolle von *dTdc2-GAL4* als auch *Feb15* die Ethanolpräferenz wiederherstellen können, sind die Neurone in den Clustern G0a, G0b und PSM nicht für die Wiederherstellung der Ethanolpräferenz notwendig. Damit vermitteln nur die T β H-positiven Zellen in den Clustern AL2 und VM Ethanolpräferenz.

Tabelle 3.1: Übersicht der GAL4-Expressionsdomänen der verschiedenen GAL4-Treiberlinien im Vergleich zu den T β H-positiven Neuronen. Mit einem * markierte Cluster kommen in beiden Hemisphären einmal vor. Cluster ohne * kommen im gesamten Gehirn einmal vor. Die gesamte Neuronenanzahl bezieht sich auf beide Hemisphären. Mittelwert der Neurone \pm SEM.

	TβH		dTdc2-GAL4		dTdc2-GAL4; Cha-GAL80		Feb15-GAL4		6.2.2TβH-GAL4		NP7088-GAL4	
	MW ± SEM (n)	Min/Max	MW ± SEM (n)	Min/Max	MW ± SEM (n)	Min/Max	MW ± SEM (n)	Min/Max	MW ± SEM (n)	Min/Max	MW ± SEM (n)	Min/Max
AL1*			1 ± 0 (14)	1	1 ± 0 (8)	1			1 ± 0 (18)	1		
AL2*	7 ± 0,2 (41)	3 - 10	7 ± 0,2 (26)	4 - 9	2 ± 0,1 (13)	1 - 2	11 ± 0,7 (18)	5 - 15	1 ± 0,1 (15)	1 - 2	9 ± 0,8 (10)	5 - 14
G2a,b*	3 ± 0,1 (56)	1 - 5							10 ± 0,4 (12)	7 - 11		
G0a*	1 ± 0,0 (59)	1					1 ± 0,2 (13)	0 - 2				
G0b*	1 ± 0,0 (55)	1 - 2					1 ± 0,1 (13)	1 - 2				
Vmimd	9 ± 0,2 (41)	6 - 12	9 ± 0,2 (12)	8 - 10	5 ± 0,6 (7)	3 - 7	20 ± 1,3 (9)	14 - 28	3 ± 0,3 (11)	1 - 5	13 ± 0,8 (5)	11 - 15
VL*			2 ± 0 (29)	2	2 ± 0,1 (16)	1 - 2						
ASM*			5 ± 0,2 (23)	4 - 7	5 ± 0,2 (12)	4 - 6						
Vmimx	8 ± 0,2 (43)	5 - 10	8 ± 0,3 (12)	6 - 9	6 ± 0,6 (8)	3 - 8	17 ± 1,1 (9)	14 - 23	1 ± 0,3 (11)	1 - 3	10 ± 0,9 (4)	8 - 11
VMIb	8 ± 0,3 (37)	3 - 11	7 ± 0,5 (12)	3 - 9	2 ± 0,6 (6)	0 - 4	13 ± 1,2 (7)	9 - 17	0 ± 0 (8)	0	8 ± 0,9 (3)	7 - 10
PB2*			1 ± 0 (10)	1			4 ± 0,3 (16)	2 - 7	3 ± 0,5 (7)	1 - 6		
PB1	46 ± 2,0 (40)	20 - 68	22 ± 5,2 (9)	4 - 45	2 ± 0,4 (6)	1 - 3			4 ± 0,4 (5)	4 - 5		
PSM*	1 ± 0,0 (72)	1 - 2					1 ± 0,2 (20)	1 - 3				
PI												
PSL*							15 ± 0,8 (5)	13 - 17	9 ± 1,0 (8)	4 - 11		
lat SOG*									6 ± 0,3 (16)	4 - 7		
G5c*									4 ± 0,2 (24)	2 - 5		
zusätzliche Zellen*									1 ± 0,1 (18)	1 - 2		
Total	97		78		33		333		69		49	

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Neurone, die GFP und TβH exprimieren. Cluster mit einem * kommen in beiden Hemisphären einmal vor. Die gesamte Anzahl bezieht sich auf die gesamten Neurone in einem adulten Gehirn. Mittelwert der Neurone ± SEM.

	TβH		Überlappung <i>dTdc2-GAL4</i>		Überlappung <i>dTdc2-GAL4; Cha-GAL80</i>		Überlappung <i>Feb15-GAL4</i>		Überlappung <i>6.2.2Tβh-GAL4</i>		Überlappung <i>NP7088-GAL4</i>	
	Mean ± STD (n)	Range	Mean ± STD (n)	Range	Mean ± STD (n)	Range	Mean ± STD (n)	Range	Mean ± STD (n)	Range	Mean ± STD (n)	Range
AL1*												
AL2*	7 ± 0,2 (41)	3 - 10	7 ± 0,3 (24)	4 - 9	2 ± 0,2 (12)	1 - 3	7 ± 0,3 (18)	5 - 10	1 ± 0,2 (13)	0 - 1	7 ± 0,3 (10)	5 - 8
G2a;pb*	3 ± 0,1 (56)	1 - 5										
G0a*	1 ± 0,0 (59)	1					1 ± 0,2 (13)	0 - 2				
G0b*	1 ± 0,0 (55)	1 - 2					1 ± 0,1 (13)	1 - 2				
VMmd	9 ± 0,2 (41)	6 - 12	9 ± 0,2 (12)	8 - 10	5 ± 0,6 (8)	1 - 7	9 ± 1,1 (9)	9 - 11	1 ± 0,1 (13)	0 - 1	9 ± 0,6 (5)	8 - 11
VL*												
ASM*												
VMmx	8 ± 0,2 (43)	5 - 10	8 ± 0,3 (12)	6 - 9	5 ± 0,6 (10)	2 - 8	7 ± 0,9 (9)	7 - 10	0,5 ± 0,1 (13)	0 - 1	9 ± 0,8 (4)	8 - 11
VMib	8 ± 0,3 (37)	3 - 11	7 ± 0,5 (12)	3 - 9	2 ± 0,6 (6)	0 - 4	7 ± 1,1 (7)	6 - 10			7 ± 0,5 (2)	6 - 7
PB2*												
PB1	46 ± 2,0 (40)	20 - 68										
PSM*	1 ± 0,0 (72)	1 - 2					1 ± 0 (20)	1				
Gesamt	97		38		16		43		3,5		39	

3.3.6 Untersuchung verschiedener GAL4-Expressionsdomänen zur Einschränkung der möglichen Cluster

Da die Eingrenzung der Neuronen, die für die Präferenz notwendig sind, noch zwei Cluster umfasst, sollten die anderen von Siegmund und Korge (2001) beschriebenen Fliegenlinien, mit den speziellen Corpora cardiaca innervierenden neurosekretorischen Neuronen des Pars intercerebralis untersucht werden. Anhand von larvalen Antikörperfärbungen sollte überprüft werden, ob die Expressionsdomänen der jeweiligen GAL4-Linie im AL2- und/oder im VM-Cluster liegen, da diese Cluster bereits in der Larve erkennbar sind. Hierdurch sollte eine Fliegenlinie gefunden werden, die keine GAL4-Expressionsdomäne im AL2-Cluster besitzt, sondern nur im VM-Cluster. Dadurch sollte ein möglicher Einfluss des AL2-Clusters auf die Ethanolpräferenz untersucht werden. Hierfür wurden die Fliegenlinien *Jan191*, *Jan178*, *Mai301* und *Sep54* mit *UAS-mCD8::GFP* gekreuzt und das Expressionsmuster untersucht.

Die Linie *w¹¹⁸; UAS-mCD8::GFP/Jan191-GAL4* zeigt T β H- und GFP-positive Neurone in den beiden Hemisphären und im ventralen Ganglion. Die beiden paarigen T β H-positiven Neurone colokalisieren mit den GFP-positiven Neuronen (Abbildung 3.24 A-A“, Pfeile). Im SM-Cluster unter dem Ösophagus (oes) liegen medial die drei späteren VM-Cluster und der AL2-Cluster (Abbildung 3.24 B-B“, Sterne) liegt lateral des Ösophagus. Hier ist jedoch keine Colokalisation von T β H- und GFP-positiven Neuronen zu erkennen (Abbildung 3.24 B-B“). Damit sollte diese Linie das *UAS-T β H*-Konstrukt weder im VM-Cluster noch im AL2-Cluster exprimieren und damit keine Rettung der Ethanolpräferenz erzielen. Deswegen wird diese Linie nicht näher untersucht.

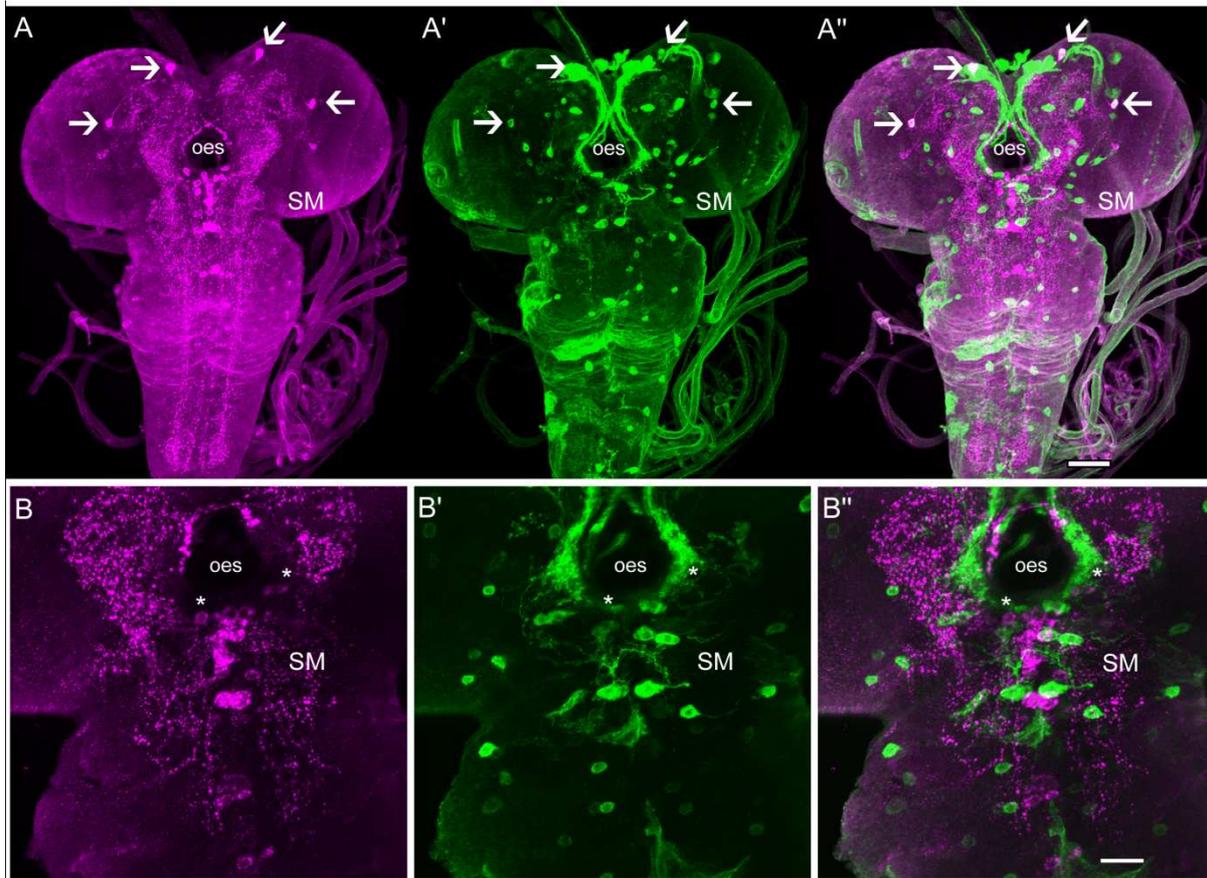


Abbildung 3.24: GAL4-Expressionsdomänen der Fliegenlinie *Jan191*. A-A'') Eine Colokalisation der T β H-positiven (magenta) und GFP-positiven (grün) Neurone ist nur in den vier Neuronen der Hemisphären zu erkennen (Pfeile). B-B'') Der SM-Cluster unter dem Ösophagus (oes) zeigt keine Colokalisation von T β H- und GFP-positiven Neuronen im VM-Cluster oder im AL2-Cluster (Sterne). Der weiße Balken in der Übersicht entspricht 100 μ m und in der Vergrößerung 25 μ m.

In Abbildung 3.25 sind die T β H- und GFP-positiven Neurone der larvalen Gehirne von *Jan178/UAS-mCD8::GFP*-Larven gezeigt. Das larvale Gehirn weist viele GFP-positive Neurone medial in den beiden Hemisphären, sowie medial und lateral unterhalb des Ösophagus und vor allem lateral im ventralen Ganglion auf. Die zwei paarigen T β H-positiven Neurone in den Hemisphären colokalisieren nicht mit den GFP-positiven Neuronen. Nur der SM-Cluster zeigt eine Überlappung von drei GFP- und T β H-positiven Neuronen (Abbildung 3.25 A-B'', Pfeile). In Abbildung 3.25 B bis B'' ist eine Vergrößerung der Region unterhalb des Ösophagus mit den VM-Clustern und dem späteren AL2-Cluster (Sterne) dargestellt. Die Fliegenlinie *Jan178* ist ein möglicher Kandidat, um den Einfluss des AL2-Clusters auf die Ethanolpräferenz zu untersuchen, da nur drei GFP-positive Neurone auch T β H-positiv sind. Da diese Linie jedoch viele GAL4-Expressionsdomänen besitzt, wird sie nicht auf eine mögliche Rettung der Ethanolpräferenz getestet.

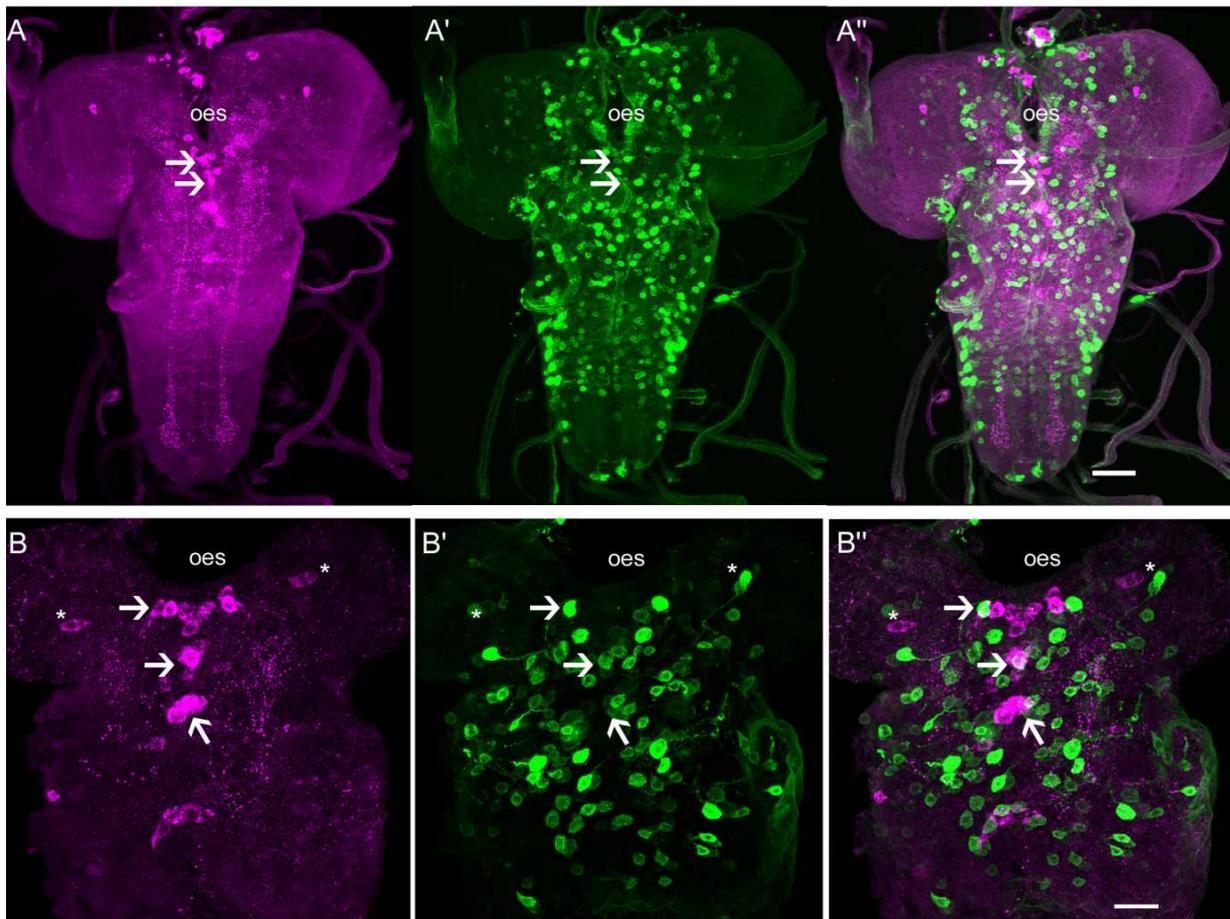


Abbildung 3.25: Drei Neurone des SM-Clusters von *Jan178* sind GFP- und T β H-positiv. Die α -T β H-Färbung ist in magenta und α -GFP in grün dargestellt. Eine Überlappung der GFP- und T β H-positiven Neurone ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. In A ist eine Übersicht über die GAL4-Expressionsdomänen der *Jan178*-Linie gezeigt. B) Drei Neurone (Pfeile) im SM-Cluster unter dem Ösophagus (oes) sind GFP- und T β H-positiv. Der weiße Balken in der Übersicht entspricht 100 μ m und in der Vergrößerung 25 μ m.

Als weiterer Kandidat wurde die Treiberlinie *Mai301* untersucht. In Gehirnen dieser Larven colokalisiert das in den Hemisphären superior medial gelegene T β H-positive Neuron mit GFP (Abbildung 3.26 A-A'', Pfeile). Außerdem wurden in drei Larven durchschnittlich sechs T β H- und GFP-positiven Neurone im SM-Cluster gefunden (Abbildung 3.26 B-B'', Pfeile). Die GFP-positiven Neurone waren jedoch teilweise sehr schwach gefärbt, so dass in der Übersicht die Neurone nicht weiß erscheinen und deshalb zeigen die Pfeile die Lage der GFP- und T β H-positiven Neurone an. Die in Abbildung 3.26 B-B'' mit einem Stern markierten Pfeile deuten auf die beiden Neurone, aus denen wahrscheinlich das AL2-Cluster gebildet wird. Damit sollte in dieser Linie Neurone des AL2-Clusters GFP-positiv sein. Zusätzlich sollte eine Reduktion der GAL4-positiven Neurone in den verschiedenen VM-Clustern vorliegen. Aus diesem Grund eignet sich diese Linie, um den Einfluss des AL2 Clusters auf die Präferenz zu untersuchen.

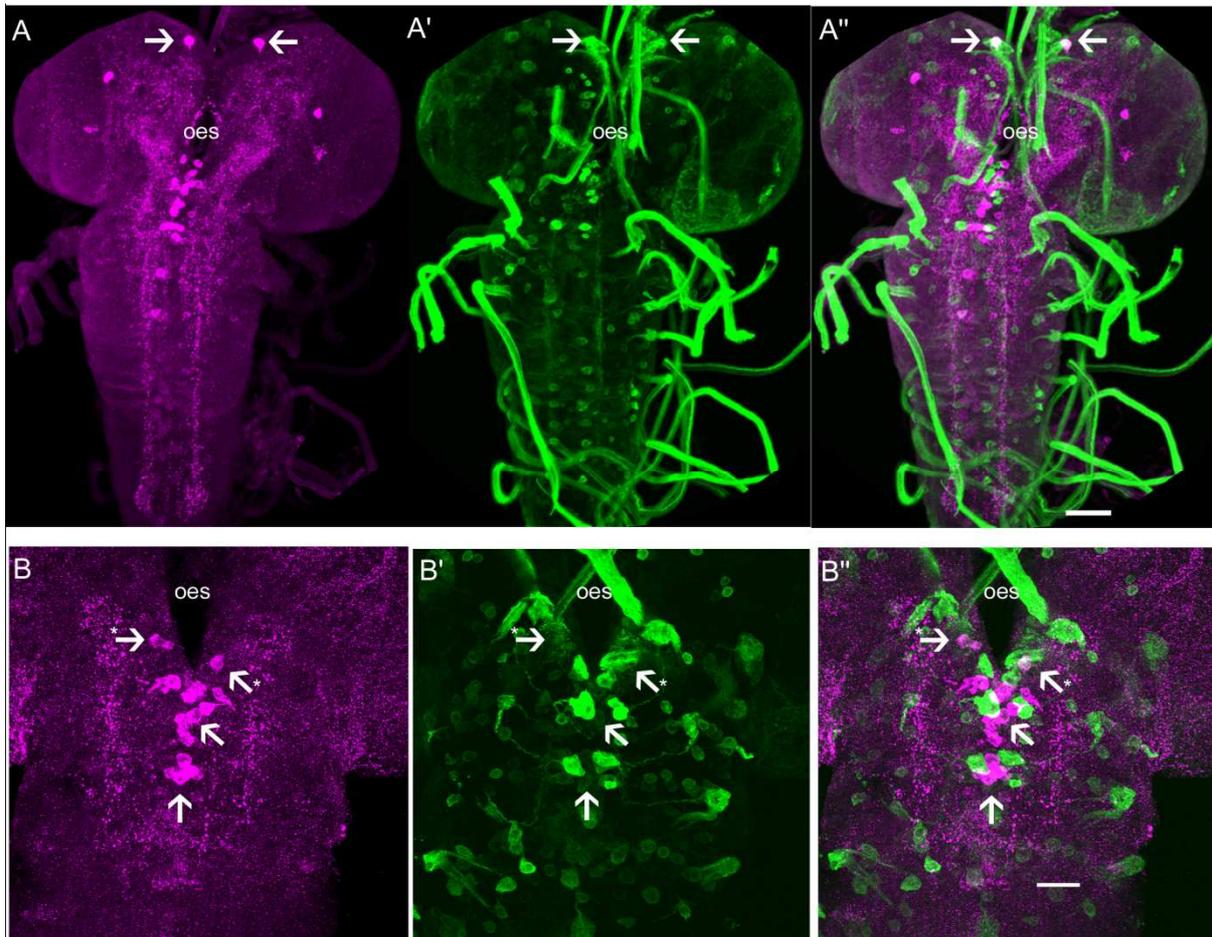


Abbildung 3.26: In Gehirnen von $w^{1118}; UAS-mCD8::GFP; Mai301$ -Larven sind durchschnittlich acht Neurone T β H- und GFP-positiv. A) Die paarigen superior-medial gelegenen T β H-positiven Neurone sind ebenfalls GFP-positiv (Pfeil). B) Die Vergrößerung zeigt eine Colokalisation von T β H- und GFP-positiven Neuronen im SM-Cluster. Hier markieren die beiden Pfeile mit Stern die Neurone, die später das AL2-Cluster ausbilden werden. Die beiden Pfeile ohne Stern zeigen auf die Region, in der eine Colokalisation von T β H- und GFP-positiven Neuronen gefunden wurde. Der weiße Balken in der Übersicht entspricht 100 μ m und in der Vergrößerung 25 μ m.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich weniger Neurone im VM-Cluster T β H- und GFP-positiv sind und ob alle Neurone des AL2-Clusters GFP und T β H exprimieren, wurde das adulte zentrale Nervensystem betrachtet. In Abbildung 3.27 ist eine Übersicht über die gesamten T β H- und GFP-positiven Neurone dargestellt. GFP-positive Neurone sind in den Clustern AL2, G2a,b, G0a, VM, PSM, PB1, PB2 und in weiteren superior dorsal gelegenen Neuronen zu erkennen. Eine Colokalisation von T β H- und GFP-positiven Neuronen ist im VMmx-Cluster zu erkennen (A'' Pfeil) und im VMIb-Cluster (C'' Pfeile). Eine detaillierte Darstellung des AL2-Clusters ist in Abbildung 3.28 zu sehen. In drei von vier ausgezählten Clustern war jeweils ein Neuron nur T β H-positiv und nicht GFP-positiv. In Abbildung 3.28 B bis B'' ist der linke AL2-Cluster von A bis A'' nochmals vergrößert dargestellt und der Pfeil deutet auf das nur T β H-positive Neuron hin. Die beiden Neurone des PSM-Clusters sind T β H- und GFP-

positiv (Abbildung 3.24 C''). Die beiden anderen posterior gelegenen Cluster PB1 und PB2 exprimieren entweder GFP oder T β H (Abbildung 3.24 C'').

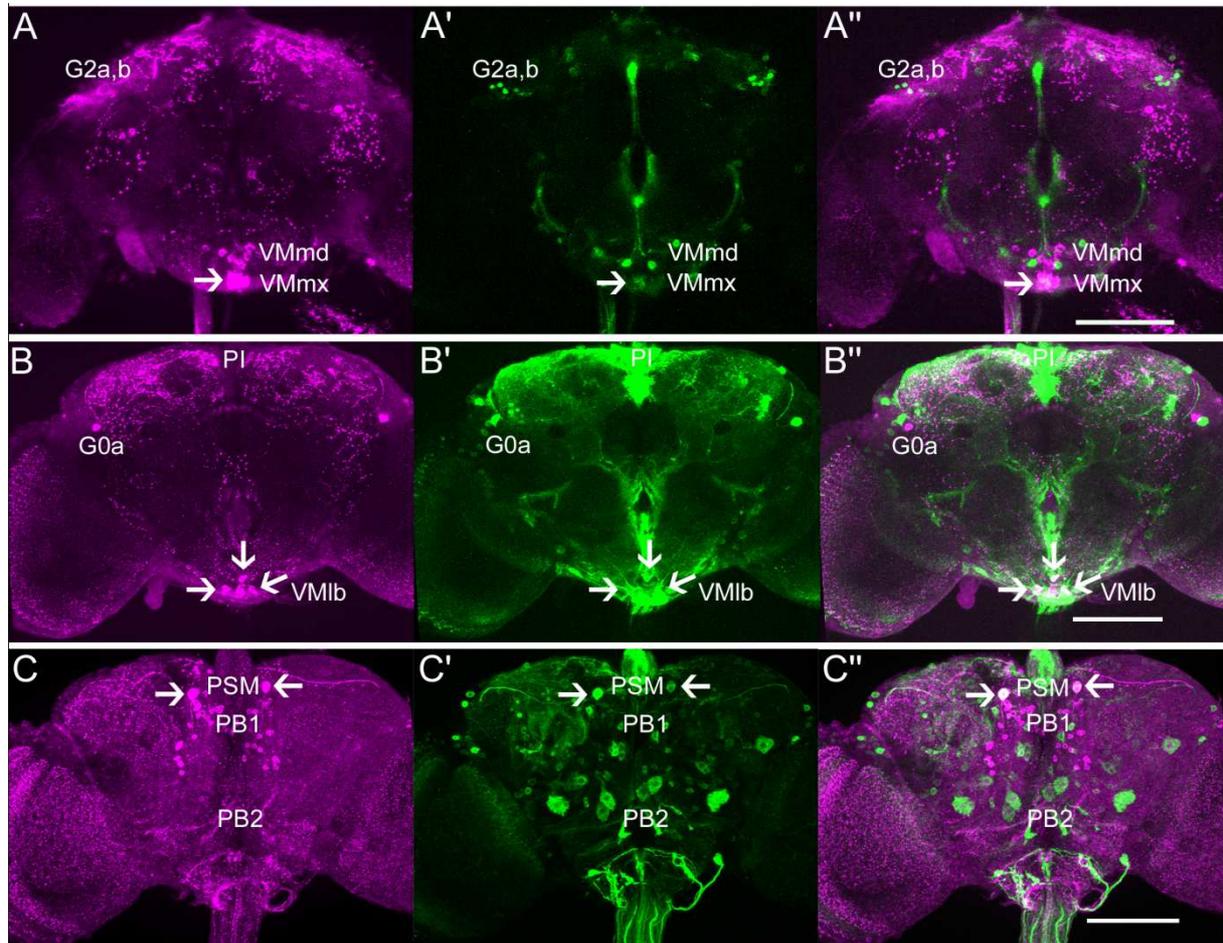


Abbildung 3.27: In adulten Gehirnen von $w^{1118}; UAS-mCD8::GFP; Mai301$ -Fliegen sind die Cluster AL2, G2a,b, G0a, VMmd, VMmx, VMlb, PSM, PI, BP1 und BP2 und weitere Zellen, die superior posterior gelegen sind GFP-positiv. Eine Überlappung von GFP- und T β H-positiven Neuronen ist in den Clustern VMmx, VMlb und PSM zu erkennen (Pfeile). Der weiße Balken in der Übersicht entspricht 100 μ m.

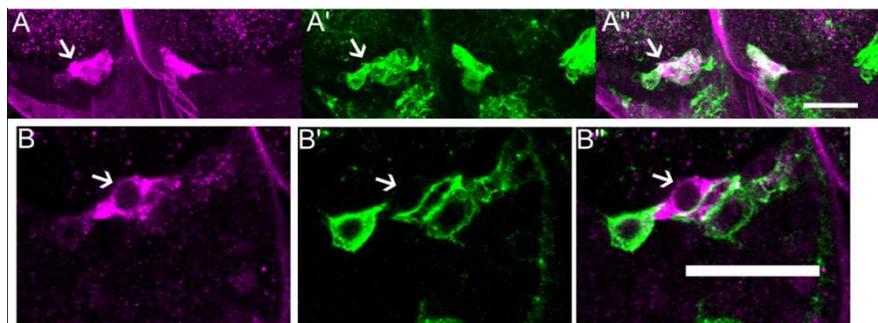


Abbildung 3.28: Vergrößerung des AL2-Clusters von einem adulten Gehirn einer Fliege der Linie $w^{1118}; UAS-mCD8::GFP; Mai301$. A) Die GFP-positiven Neurone überlappen vollständig mit den T β H-positiven Neuronen. Ein Pfeil deutet auf das nur T β H-positiv Neuron im AL2-Cluster hin (A und B). B) Vergrößerung des linken AL2-Clusters aus A-A''. Die weißen Balken entsprechen 25 μ m.

Abschließend wurden larvale Gehirne der GAL4-Treiberlinie *Sep54* untersucht. Hier liegen die GAL4-Expressionsdomänen in den Hemisphären und im ventralen Ganglion verteilt. In den Hemisphären colokalisiert das superior-medial gelegene T β H-positive Neuron mit GFP (Abbildung 3.29 A“ Pfeil). Zwei weitere Neurone im thorakalen Abschnitt des ventralen Ganglions sind GFP- und T β H-positiv (Abbildung 3.29 A“ Pfeil bei t und B‘, Pfeil). Im SM-Cluster konnten keine T β H- und GFP-positiven Neurone gefunden werden. Die beiden Neurone, die den späteren AL2-Cluster bilden sollten, sind nur T β H-positiv (Abbildung 3.29 A bis A“ Stern). Dies deutet darauf hin, dass diese Linie weder im AL2-Cluster noch in den drei verschiedenen VM-Clustern später eine Expression zeigen sollten. *Sep54*-GAL4 könnte dazu verwendet werden, um einen möglichen Einfluss des thorakal-abdominalen Ganglions auf die Ethanolpräferenz hin zu untersuchen.

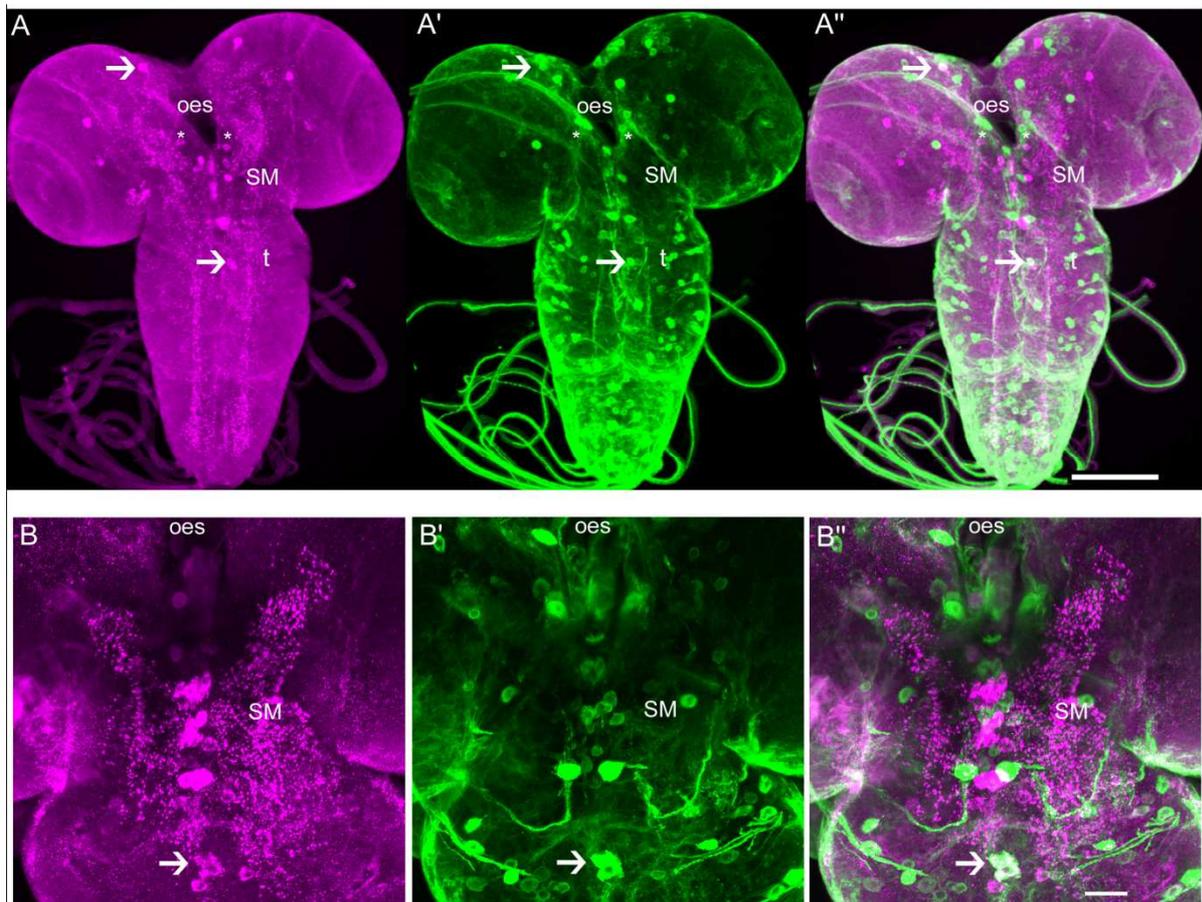


Abbildung 3.29: Die GAL4-Expressionsdomänen der *Sep54*-Fliegenlinie überlappen im larvalen Gehirn nicht mit T β H-positiven Neuronen im SM-Cluster. A) Gezeigt ist eine Übersicht über das gesamte larvale Nervensystem. In den Hemisphären ist das superior-medial gelegene T β H-positive (magenta) Neuron ebenfalls GFP-positiv (grün) (Pfeil). In dem thorakalen Abschnitt befinden sich zwei Neurone, die sowohl T β H-positiv als auch GFP-positiv sind (A“ Pfeil bei t und B“, Pfeil). B) Vergrößerung des SM-Clusters, der keine Überlappung von GFP- und T β H-positiven Neuronen aufweist. Der weiße Balken in der Übersicht entspricht 100 μ m und in der Vergrößerung 25 μ m.

Ausgehend von der Vermutung, dass eine Kolo­kalisierung von T β H- und GFP-positiven Neuronen in *Sep54* nur im PSM-Cluster vorliegt und nicht im VM- oder AL2-Cluster, sollte dies anhand von *whole-mount* Präparationen von adulten Gehirnen verifiziert werden. Wie in Abbildung 3.30 zu sehen ist, ist dies nicht der Fall. In den VM-Clustern VMmd und VMmx und im AL2-Cluster ist eine Kolo­kalisierung von GFP- und T β H-positiven Neuronen zu erkennen, jedoch sind nicht alle T β H-positive Neurone GFP-positiv (Abbildung 3.30 A'' Pfeile). Ebenfalls exprimieren Neurone in den Clustern G0a und PSM GFP und T β H (Abbildung 3.30 B'' und C'' Pfeile). Im Cluster PB1 kommen sowohl T β H- oder GFP- positive Neurone vor.

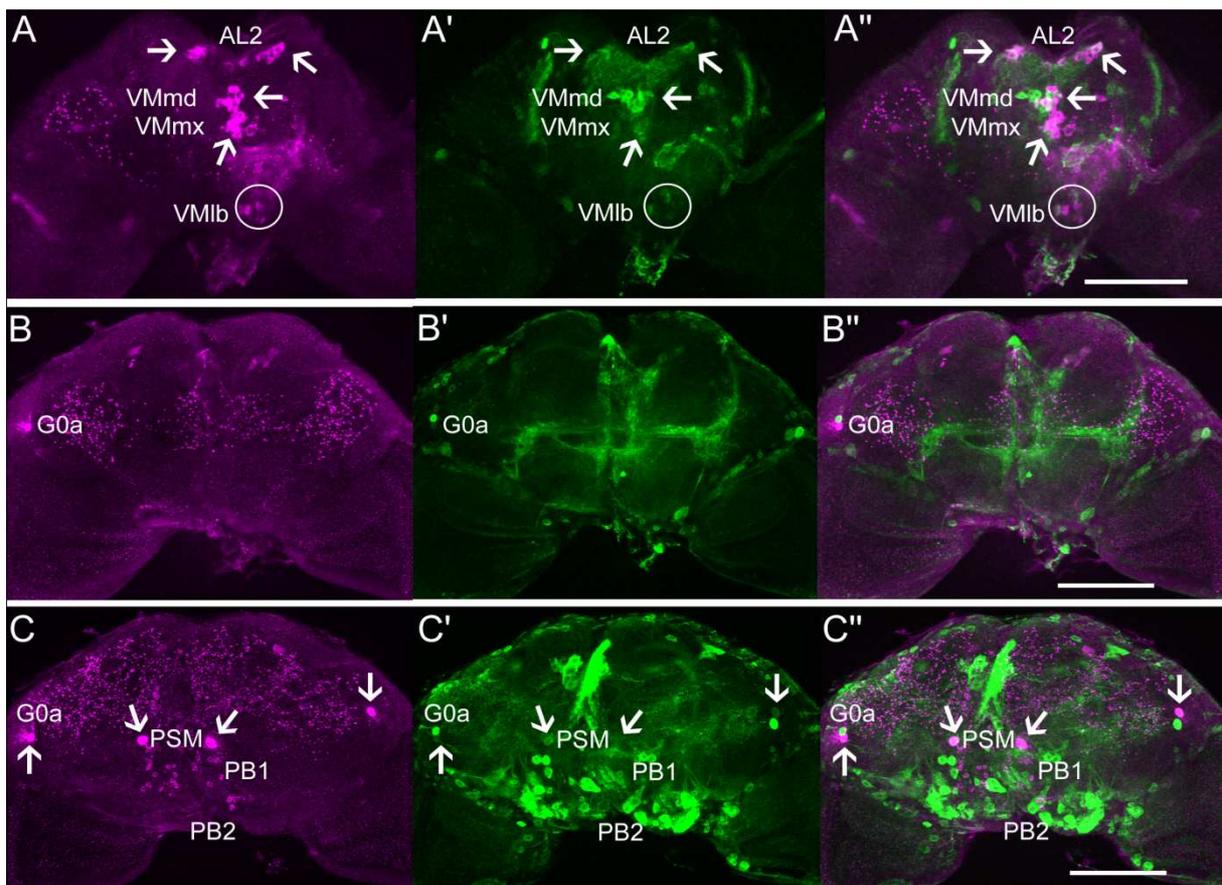


Abbildung 3.30: Eine Kolo­kalisierung von GFP- (grün) und T β H-positiven (magenta) Neuronen ist im AL2-, VM- und PSM-Cluster in adulten Gehirnen von *Sep54*-Fliegen zu erkennen. A) Pfeile deuten auf GFP- und T β H- positive Neurone im AL2-, VMmd- und VMmx-Cluster hin. Neurone im VMlb-Cluster (weißer Kreis) exprimieren GFP oder T β H. B) Das T β H-positive Neuron im Cluster G0a ist ebenfalls GFP-positiv (auch C-C'' Pfeil). C) Die beiden Neurone im Cluster PSM sind sowohl GFP- als auch T β H-positiv. Der weiße Balken entspricht 100 μ m.

3.4 Ist die Aktivierung von Neuronen mit Hilfe von optogenetischen Methoden für die Ausbildung der Ethanolpräferenz ausreichend?

3.4.1 Test der Funktionsfähigkeit der neuen Apparatur

Mit Hilfe der in 2.10.2 beschriebenen Apparatur sollte der Einfluss der Aktivierung von spezifischen Neuronen durch optogenetische Methoden auf die Präferenz von Fliegen untersucht werden. Hierfür wird der Kationenkanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) unter der Kontrolle des GAL4/UAS-Systems in Neuronen aktiviert (Nagel *et al.*, 2003). Mit Hilfe der *dTdc2*-GAL4-Treiberlinie (Cole *et al.*, 2005) wird dieser Kanal selektiv in Tyramin-Decarboxylase- (TDC) positiven Neuronen exprimiert. In Anwesenheit von *all-trans* Retinal und blauem Licht (470 nm) ist ChR2 funktionsfähig (Nagel *et al.*, 2003; Schroll *et al.*, 2006). Als Kontrolle werden Fliegen des gleichen Genotyps verwandt, die nur mit dem Vehikel (Ethanol) gefüttert wurden.

Um die Funktionalität der Aktivierung von *UAS*-ChR2 in TDC-positiven Neuronen durch die *dTdc2*-GAL4-Treiberlinie zu testen, wurde ein Ansatz mit zwei verschiedenen Weißlichtdioden gewählt. Eine Diode (Q5, Cree, Deutschland) strahlt kaltes weißes Licht mit einem hohen Blauanteil (5.000 - 10.000 K) ab. Während die andere Diode (P3, Cree Deutschland) ein wärmeres weißes Licht abgibt (2.600 - 3.700 K). Hierbei ist die Intensität von Blau reduziert (siehe Kapitel 2.10.2 und Abbildung 2.3).

Ein spezielles Interneuron bei der Biene, das *VUMmx1*, ist notwendig, um einen unkonditionierten Stimulus, wie z. B. Futter und einen konditionierten Stimulus, wie z. B. Duft, miteinander zu assoziieren. Interessanterweise innerviert das Neuron die Glomeruli der Antennalloben, das laterale Protocerebrum und die Calyces der Pilzkörper, die für die Verarbeitung von Düften und für assoziatives Lernen zuständig sind. Während der intrazellulären Ableitungen zeigt dieses Interneuron ein spezifisches Erregungsmuster (Hammer, 1993). Nach Gabe der Zuckerlösung war ein Anstieg der Aktivität anhand der Aktionspotenziale festzustellen (siehe Abbildung 3.31 A). Anschließend sind tonische Aktionspotenziale mit verminderter Frequenz zu erkennen. Hieraus wurde ein Muster mit drei Phasen abgeleitet. Die erste Phase spiegelt die starke Aktivierung wieder und daher wurden zwei Sekunden mit einer Frequenz von 50 Hz gewählt. Die zweite Phase bildet die tonische Phase von 16 Sekunden mit 5 Hz. Damit sich die Neurone nicht durch den Stimulus adaptieren, wurde eine Pause (0 Hz) von zwei Sekunden als dritte Phase eingefügt. Dieses Muster bildet das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster (siehe Abbildung 3.31 B, A. Büschges, persönliche Kommunikation).

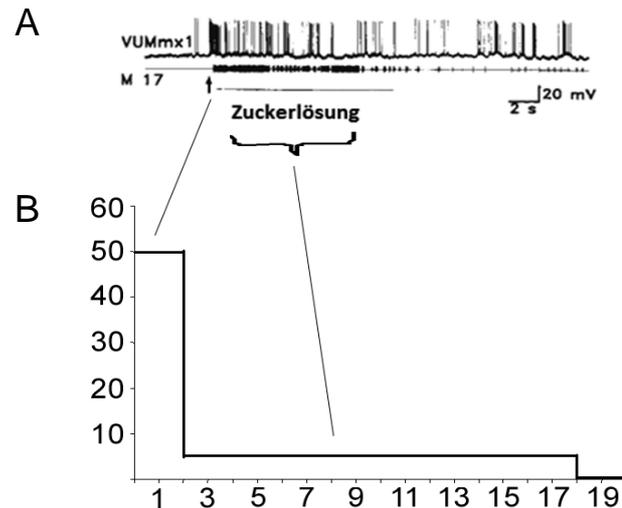


Abbildung 3.31: A) Erregungsmuster des Interneurons VUMmx1 der Honigbiene nach der Stimulation der Antennen mit Saccharose (modifiziert von Hammer, 1993). B) Umsetzung des Erregungsmusters auf ein spezifisches Aktivierungsmuster mit drei Phasen. Die erste Phase weist zwei Sekunden mit einer Pulsfrequenz von 50 Hz auf. Die zweite Phase ist 16 Sekunden lang mit einer Frequenz von 5 Hz und die dritte Phase beinhaltet zwei Sekunden mit einer Frequenz von 0 Hz (A. Büschges, persönliche Kommunikation).

Um das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster auf seine Funktionalität hin zu untersuchen, wurden *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4*; *UAS-ChR2*-Fliegen entweder mit *all-trans* Retinal oder nur dem Vehikel gefüttert. Diesen gefütterten Fliegen wurde die Wahl zwischen warmweißem und kaltweißem Licht gegeben. In Abbildung 3.32 ist deutlich zu erkennen, dass die Fütterung mit *all-trans* Retinal, also die Aktivierung des Kationenkanals ChR2, einen Einfluss auf das Verhalten der Fliegen ausübt. Diese Fliegen zeigen keine Präferenz für eine der beiden Lichtquellen. Hingegen zeigen *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4*; *UAS-ChR2* Fliegen, die nur das Vehikel bekamen, eine signifikant erhöhte Präferenz für die kaltweiße Lichtquelle gegenüber der Kontrollgruppe.

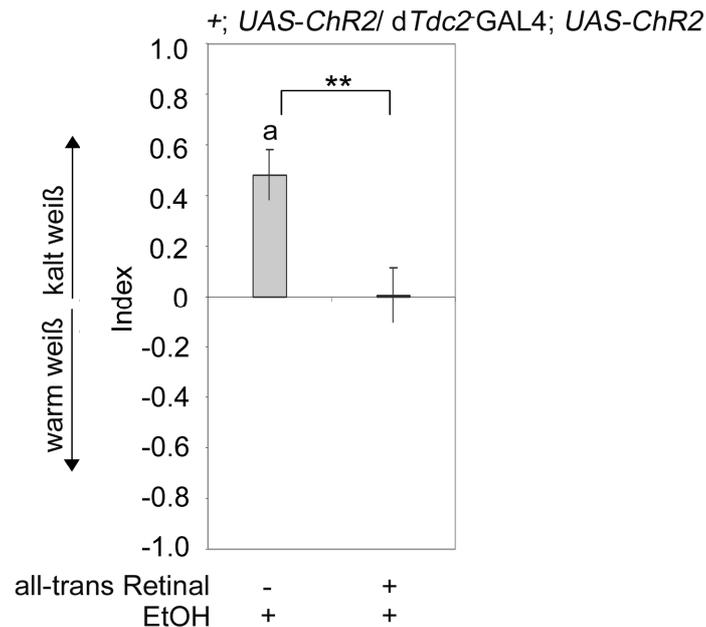


Abbildung 3.32: Einfluss der verschiedenen Lichtquellen auf die Aktivierung der Neurone. *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen gefüttert mit *all-trans* Retinal zeigen keine Präferenz für eine der beiden Lichtquellen, während Fliegen ohne aktiviertes Channelrhodopsin-2 die kaltweiße Lichtquelle bevorzugen, wenn beide Lichtquellen mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster blinken (- *all-trans* Retinal: $0,48 \pm 0,10$; + *all-trans* Retinal $0,01 \pm 0,11$, $n = 12$). a, $p < 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Dies zeigt, dass es mittels der hier verwendeten Dioden möglich ist, die TDC-positiven Neurone im Gehirn zu stimulieren. Außerdem wird die vorliegende Präferenz für eine Lichtfarbe durch die Aktivierung der Neurone aufgehoben oder zumindest modifiziert. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine verringerte Aversion gegenüber warmweißem Licht hervorgerufen wird, bzw. eine Präferenz für warmweißes Licht hervorgerufen wird, die der Präferenz für kaltweißes Licht entgegenwirkt.

3.4.2 Optogenetische Aktivierung von Neuronen, die ausreichend für Präferenz sind

Da eine Veränderung im Verhalten der Fliegen gezeigt werden konnte, sollte überprüft werden, welcher spektrale Anteil wichtig ist, um die Neurone zu aktivieren. Die Aktivierung kann zum einen durch den Blauanteil des weißen Lichts erfolgen, dem kompletten Zusammenspiel aller Farben oder nur die Wellenlängen oberhalb von 420 nm. Dies kann getestet werden, indem das blaue Licht gegen gelbes Licht ausgetauscht wird. Für blaues Licht wurde eine blaue Diode (465 – 485 nm, Cree Deutschland) verwendet, die gegen eine warmweiße Diode mit einem Gelbfilter von 500 nm (Y500, HEBO Spezialglas, Deutschland)

getestet wurde. Die warmweiße Diode wurde gewählt, da diese einen niedrigeren Blauanteil und einen höheren Anteil der anderen Spektralfarben aufweist. Durch den Gelbfilter (vgl. Abbildung 2.3) werden alle Wellenlängen unterhalb von 500 nm herausgefiltert. Da durch den Gelbfilter eine Reduktion der Lichtintensität der weißen Diode hervorgerufen wurde, wurde diese neu auf die Lichtintensität der blauen Diode geeicht. Beide Farben wurden mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster (Abbildung 3.31) getaktet.

Wie in Abbildung 3.33 zu sehen ist, zeigen *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen, die mit *all-trans* Retinal gefüttert wurden, ein signifikant unterschiedliches Verhalten zu den mit dem Vehikel gefütterten Fliegen. Die Aktivierung der TDC-positiven Neurone führt zu einer Präferenz von blauem gegenüber gelbem Licht. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung von *dTdc2-GAL4*-abhängigen Neurone durch den blauen Anteil im Spektrum hervorgerufen wird.

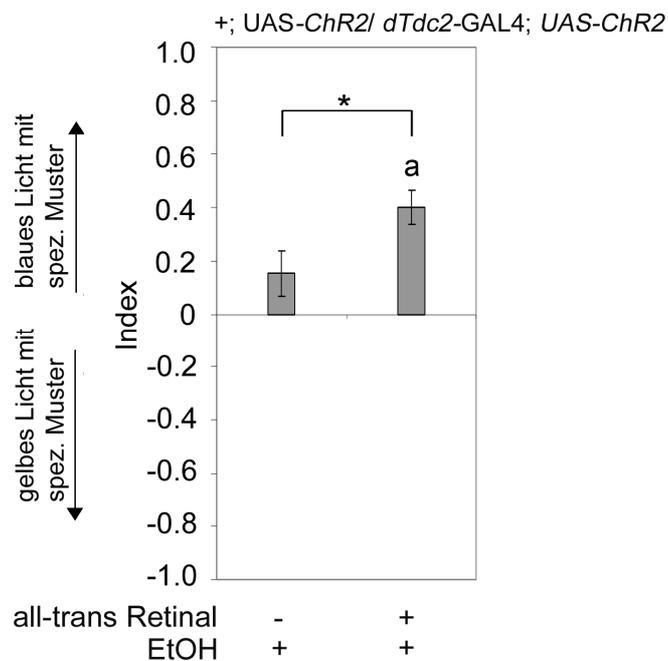


Abbildung 3.33: Aktivierung von *dTdc2-GAL4*-positiven Neuronen führt zu einer Präferenz von blauem Licht. Test von gelbem und blauem Licht, das mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster blinkte. *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Kontrollfliegen zeigen keine Präferenz für eine der angebotenen Lichtquellen. Mit *all-trans* Retinal gefütterte *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen zeigen eine deutliche Präferenz für blaues Licht (- *all-trans* Retinal $0,15 \pm 0,09$, + *all-trans* Retinal $0,40 \pm 0,06$, $n = 30$). a, $p < 0,05$, * $p < 0,05$.

Um nun eine Unterscheidung treffen zu können, ob das blaue Licht mit konstanter Frequenz alleine ausreicht, eine positive Assoziation hervorzurufen, oder ob das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster für die Aktivierung der Neurone notwendig ist, wurden zwei Ansätze getestet. Der erste Ansatz sollte klären, ob die Aktivierung per se durch das blaue Licht

hervorgerufen wird oder durch die spezifische zeitliche Strukturierung ausgelöst wird. Hierfür wurde blaues Licht mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster gegen konstant leuchtendes blaues Licht getestet. Der zweite Ansatz sollte überprüfen, ob das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster für eine Stimulation notwendig ist, oder ob eine erhöhte Stimulation auch durch einfach pulsierende Impulse ausgelöst werden könnte. Um dies zu untersuchen, wurde *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen die Wahl zwischen blauem Licht bei gleicher Frequenz (9 Hz) und blauem Licht mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster gegeben. Die 9-Hz-Frequenz wurde gewählt, da sie die Durchschnittsfrequenz des spezifischen Hammer-Aktivierungsmusters widerspiegelt.

Werden Fliegen auf ihre Präferenz für blaues Licht mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster gegen konstant leuchtendes blaues Licht getestet, so zeigen sowohl die Kontrollgruppe als auch die Testgruppe eine deutliche Präferenz für die Seite, die von der Diode mit dem Hammer-Aktivierungsmuster beleuchtet wurde (Abbildung 3.34 A). Die Aktivierung der *dTdc2-GAL4*-abhängigen Neurone durch Blaulicht mit dem Hammer-Aktivierungsmuster verändert die schon vorhandene Präferenz für diese Lichtquelle nicht. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die Präferenz hier ihr Plateau erreicht hat und damit kein Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden kann oder dass die Aktivierung keinen Einfluss auf die schon vorhandene Präferenz hat. Da konstantes blaues Licht eventuell zu warm oder zu hell für die Fliegen ist, könnte der Unterschied zwischen Belohnung und visuellem Einfluss nicht ersichtlich sein.

Der zweite Ansatz (Abbildung 3.34 B) zeigt, dass mit Vehikel gefütterte *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen und die mit *all-trans* Retinal gefütterten Fliegen keinen signifikanten Unterschied zueinander aufweisen. Da die Werte nicht signifikant unterschiedlich von null sind, liegt demnach eine zufällige Verteilung der Fliegen auf beide Gefäße vor. Dies weist darauf hin, dass die Fliegen zwischen blauem mit 9 Hz gepulstem Licht und solchem Licht, dessen Aktivierungsmuster das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster ist, nicht unterscheiden können. Diese Experimente legen nahe, dass für die Wahl zwischen 9 Hz und dem Hammer-Aktivierungsmuster zum einen und konstant blauem Licht und dem Hammer-Aktivierungsmuster zum anderen die Aktivierung von TDC-positiven Neurone nicht notwendig ist.

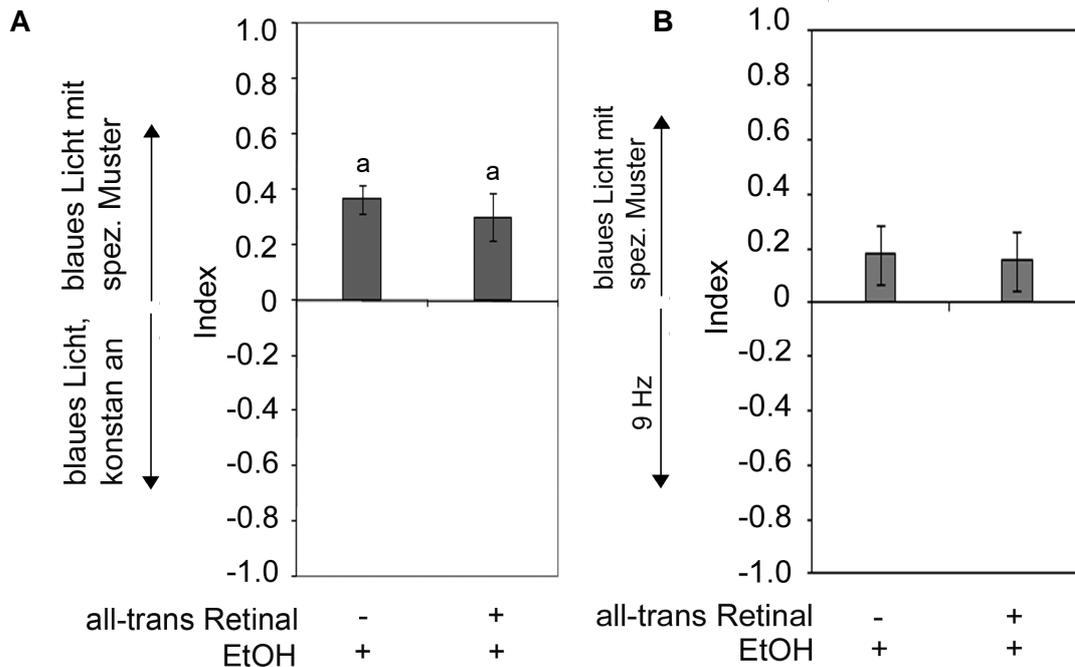


Abbildung 3.34: Test der *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen mit zwei blauen Dioden, denen jeweils eine andere Aktivierungsfrequenz zugrunde gelegt wurde. A) Eine Diode leuchtet konstant blau, während die andere Diode das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster aufweist. Hier ist eine deutliche Präferenz für das spezifische Aktivierungsmuster in beiden Gruppen zu erkennen, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (- *all-trans* Retinal $0,37 \pm 0,05$, + *all-trans* Retinal $0,30 \pm 0,05$, $n=21$). B) Aktivierung der einen Diode durch das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster und der anderen Diode durch eine Frequenz von 9 Hz. Hier ist kein Unterschied zwischen den beiden getesteten Gruppen zu erkennen (- *all-trans* Retinal $0,18 \pm 0,11$, + *all-trans* Retinal $0,15 \pm 0,11$, $n=17$). a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$.

Um einen Effekt aufgrund der Wärme oder Helligkeit auszuschließen und zur Bestimmung, ob die Frequenz von Lichtpulsen für eine Fliege erkennbar ist, bzw. eine Bedeutung hat, wurde gelbes Licht mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster mit konstant leuchtendem blauem Licht verglichen. Hierfür wurde eine der blauen Dioden durch eine warmweiße Diode mit Gelbfilter ausgewechselt. Da durch den Gelbfilter die Beleuchtungsstärke der warmweißen Diode verringert wurde, wurde sie auch hier der Beleuchtungsstärke der blauen Diode angepasst.

Wie in Abbildung 3.35 zu sehen ist, zeigen *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen mit und ohne *all-trans* Retinal eine Präferenz für konstant leuchtendes, blaues Licht. Dieses Ergebnis zeigt, dass ein Einfluss von Wärme oder Helligkeit der konstant leuchtenden blauen Diode ausgeschlossen werden kann, da sowohl die Kontrollgruppe, also auch die Testgruppe konstant leuchtendes blaues Licht dem gelben Licht signifikant vorziehen. Dies kann auch bedeuten, dass konstant leuchtendes blaues Licht nicht zur Aktivierung von *dTdc2-GAL4*-abhängigen Neuronen ausreicht, bzw. dass blaues Licht einer bestimmten

Frequenz gegenüber blauem Licht einer anderen Frequenz keine Bedeutung für die Fliegen hat.

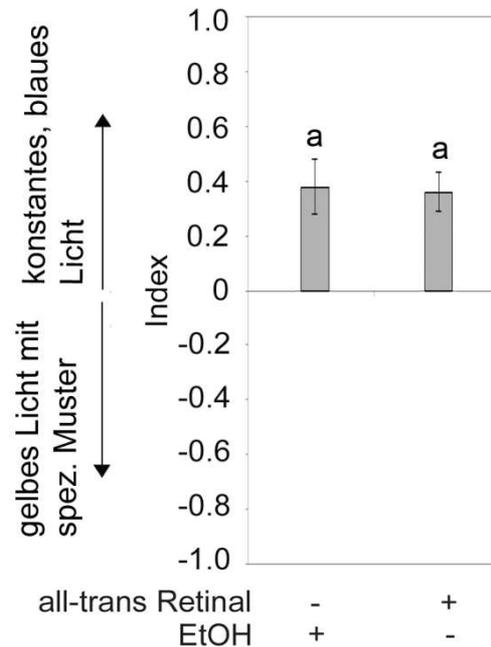


Abbildung 3.35: *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4*; *UAS-ChR2*-Fliegen konnten zwischen gelbem Licht mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster und konstant leuchtendem blauem Licht wählen. Beide Gruppen zeigten eine von null unterschiedliche Präferenz für das konstant leuchtende blaue Licht, jedoch zeigten sie untereinander keine signifikante Differenz (- *all-trans* Retinal $0,38 \pm 0,10$, + *all-trans* Retinal $0,37 \pm 0,07$, $n = 16$) a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$

Da die Fliegen keine Präferenz ohne das spezifische Hammer-Aktivierungsmuster zeigen und gelbes Licht mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster aversiv wirkt, wurde konstant leuchtendes blaues Licht gegen konstant leuchtendes gelbes Licht getestet (Abbildung 3.36). Hier ist auffällig, dass weder die Kontrollgruppe noch die Testgruppe eine Präferenz für das eine noch das andere Licht aufweisen. Auch zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass das konstant leuchtende gelbe Licht weder attraktiv noch aversiv im Vergleich zu konstant leuchtendem blauem Licht ist (Abbildung 3.34). Dies konnte ebenso in den Versuchen von gelbem Licht gegen blaues Licht mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster und gegen konstantes blaues Licht gezeigt werden (Abbildung 3.33 und 3.35). Dies weist darauf hin, dass das spezifische Hammer Aktivierungsmuster keine Präferenz hervorruft und damit die Anregung der TDC-positiven Neurone, wenn diese vorhanden ist, keinen Einfluss auf die Präferenz ausübt. Die Varianz in den Daten könnte durch eine Erhöhung der Versuchsdurchführungen minimiert werden.

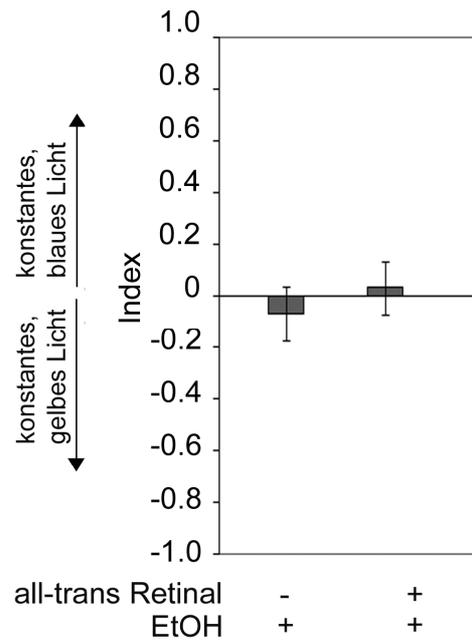


Abbildung 3.36: Einfluss von konstant leuchtenden gelben und konstant leuchtenden blauen Licht auf *UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen. Beide Gruppen zeigen eine zufällige Verteilung (- *all-trans* Retinal $-0,06 \pm 0,10$, + *all-trans* Retinal $0,03 \pm 0,11$, $n = 13$) a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$.

3.4.3 Aktivierung einer Gruppe von Neuronen in blinden Fliegen führt zu Präferenz für blaues Licht

Da die Farbe der verwendeten Leuchtdiode einen Einfluss auf die Präferenz von den zu testenden Fliegen haben könnte, sollten blinde Fliegen getestet werden. Das *no receptor potential A (norpA)* Gen, codiert für eine Phospholipase C, die in der Phototransduktion beteiligt ist (Pak, 1979). In den *norpA* Mutanten ist die Antwort der Photorezeptoren vollständig ausgeschaltet, wodurch diese Fliegen blind sind (Pak, 1995).

Die *norpA⁻; UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen wurden entweder mit dem Vehikel oder mit *all-trans* Retinal gefüttert und ihnen wurde die Wahl zwischen gelbem Licht oder blauem Licht gegeben. Dabei wurden die Dioden mit dem Hammer-Aktivierungsmuster angesteuert. Wie in Abbildung 3.37 zu erkennen ist, zeigen die mit *all-trans* Retinal gefütterten *norpA⁻; UAS-ChR2/ dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen Präferenz für blaues Licht. Die Kontrollgruppe hingegen zeigt keine Präferenz für blaues Licht. Dies verdeutlicht, dass die Aktivierung von *dTdc2-GAL4*-abhängigen Neuronen bei blinden Fliegen genauso zur Präferenz führt, wie die Aktivierung der gleichen Neurone bei sehenden Fliegen.

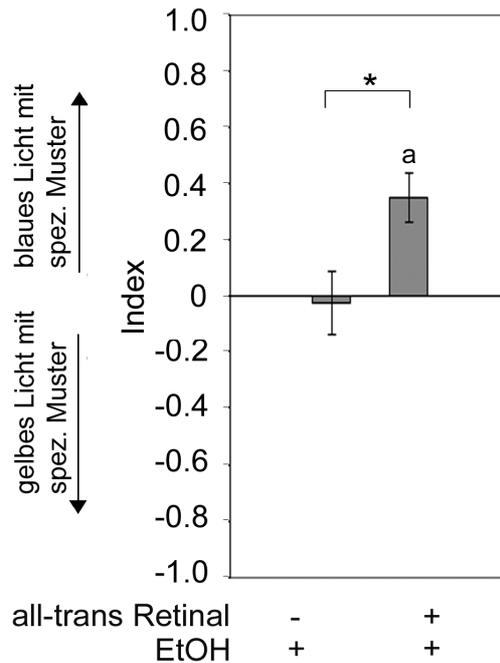


Abbildung 3.37: In mit *all-trans* Retinal gefütterten *norpA⁻; UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2*-Fliegen kann die Präferenz durch blaues Licht mit dem spezifischen Hammer-Aktivierungsmuster induziert werden (- *all-trans* Retinal $-0,02 \pm 0,11$, + *all-trans* Retinal $0,35 \pm 0,9$; $n=12$). a, $p<0,05$, * $p<0,05$.

3.5 Welche externen Stimuli lösen Ethanolpräferenz aus?

3.5.1 Das Duftbindungsprotein LUSH hat keinen Einfluss auf die Ethanolpräferenz

lush-Mutanten weisen eine geringere Vermeidung hoher Alkoholkonzentrationen auf als die verwendeten Kontrollfliegen (Kim *et al.*, 1998). Fliegen der Genotypen $w^+; lush^-$, die für die Mutagenese verwendete P-Elementinsertionslinie $w^+; ET249$ und w^{1118} wurden auf ihre Ethanolpräferenz und Aversion gegenüber 23 % Ethanol getestet (Abbildung 3.38). Die w^{1118} -Fliegen und Fliegen mit der P-Elementinsertion sollten sich wildtypisch verhalten und eine Ethanolpräferenz ausbilden (Kim *et al.*, 1998).

Keine der getesteten Fliegenlinien entwickelte für fünf Prozent Ethanol eine Präferenz. Da die Kontrollen kein wildtypisches Verhalten zeigen, können aus diesem Experiment keine Schlüsse gezogen werden. Die Aversion gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen der drei getesteten Fliegenlinien ist signifikant unterschiedlich zueinander. w^{1118} und $w^+; ET249$ -Fliegen sind signifikant voneinander verschieden und die $w^+; lush^-$ -Mutante unterscheidet sich von den beiden Kontrollen signifikant. Die *lush⁻*-Mutante zeigt eine reduzierte Aversion, aber keine Präferenz für hohe Ethanolkonzentrationen, wie von Kim *et al.* (1998) beschreiben wurde. Da $w^+; lush^-$ -Fliegen Ethanol aversiv finden und auf diesen reagieren,

scheint auch ein von LUSH unabhängigen Mechanismus, der zur Aversion führt, zu existieren.

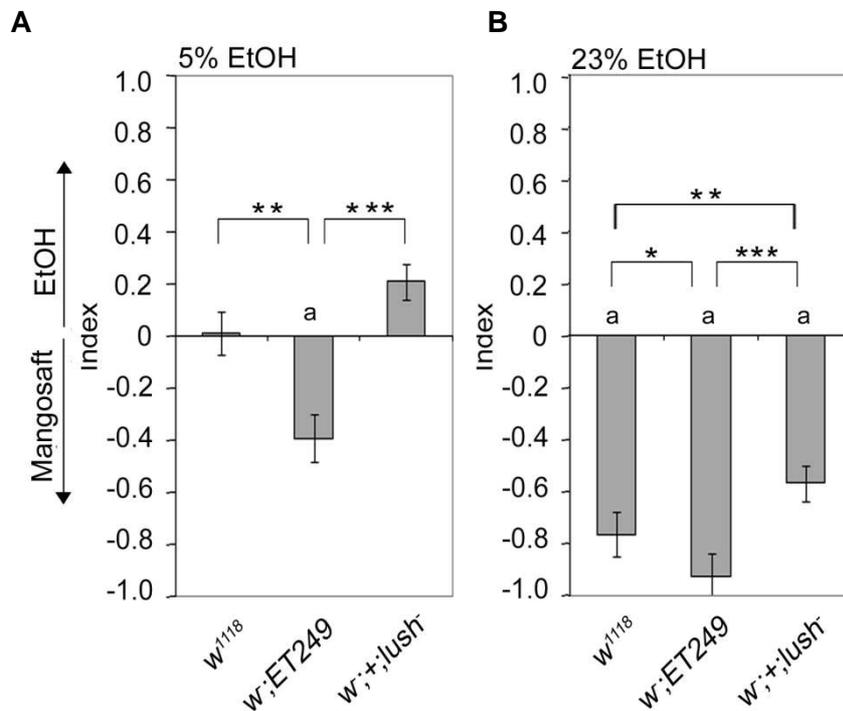


Abbildung 3.38: Die Aversion gegenüber Ethanol ist nicht nur von LUSH alleine abhängig. A) Fliegen der P-Elementinsertionslinie zeigen eine Aversion für fünf Prozent Ethanol, wohingegen sich *w;+;lush⁻*-Mutanten eher für Ethanol entscheiden und *w¹¹¹⁸*-Fliegen sich nicht entscheiden (*w¹¹¹⁸* 0,01 ± 0,09, *w;ET249* -0,39 ± 0,09, *w;+;lush⁻* 0,21 ± 0,07, n= 23, 25, 24). B) *w;+;lush⁻*-Fliegen zeigen eine zu den Kontrollfliegen reduzierte Aversion gegenüber 23 % Ethanol (*w¹¹¹⁸* -0,77 ± 0,04, *w;ET249* -0,93 ± 0,02, *w;+;lush⁻* -0,57 ± 0,05, n= 15, 15, 14). a, p<0,05; *p < 0,05.

Um zu überprüfen, ob die *lush⁻*-Mutante eine Nullmutante für das LUSH-Protein ist, wurde mit Hilfe von einer semiquantitative RT-PCR die Transkriptmenge von *lush* bestimmt. Hierfür wurden *w¹¹¹⁸*-Fliegen (Würzburg), *w¹¹¹⁸*-Fliegen (D. Smith, genetischer Hintergrund von *w;+;lush⁻*), die *w;+;lush⁻*-Fliegen und die *w;ET249*-Kontrollfliegen verwendet (Abbildung 3. 39). Je nach Zyklusanzahl nimmt die Menge des gebildeten Transkripts für *lush* zu, wobei in der *w;+;lush⁻*-Mutante kein *lush* nachzuweisen ist. Dies verifiziert die Echtheit der *lush⁻*-Mutanten. Auch konnte kein Unterschied zwischen den *w¹¹¹⁸*-Fliegen aus der Stocksammlung von Würzburg und von D. Smith in Bezug auf LUSH festgestellt werden.

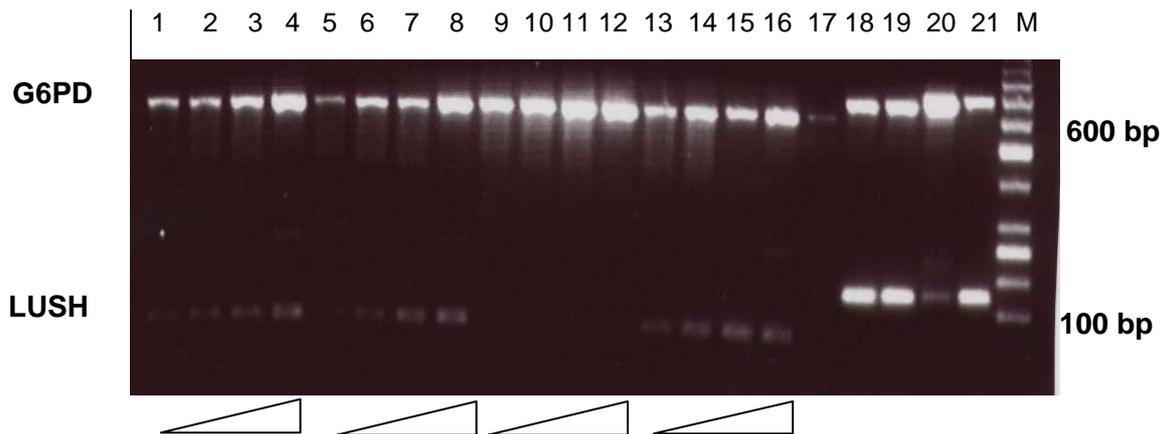


Abbildung 3.39: In $w^{\bar{}};+; lush^{\bar{}}$ -Mutanten wird das *lush*-Transkript nicht gebildet. Die Abbildung zeigt ein analytisches Gel nach einer semiquantitativen RT-PCR. Für die Amplifikation von *lush* wurden die Primer von Kim *et al.* (1998) verwendet und zur Kontrolle dienten die Primer für das Gen *zwischenferment*. Die vier Proben pro Genotyp entsprechen 25, 28, 31 und 34 RT-PCR Zyklen. Auftragsschema: 1-4: w^{1118} Würzburg, 5-8 w^{1118} D. Smith, 9-12 $w^{\bar{}};+; lush^{\bar{}}$, 13-16 $w^{\bar{}}; ET249$, 17 H₂O-Kontrolle, 18-21 genomische Kontrollen von w^{1118} Würzburg, w^{1118} D. Smith, $w^{\bar{}};+; lush^{\bar{}}$ und $w^{\bar{}}; ET249$, M bezeichnet den Marker.

Um zu testen, ob der beobachtete Phänotyp von $w^{\bar{}};+; lush^{\bar{}}$ -Mutanten auf den Verlust von *lush* zurückzuführen ist, wurden Fliegen mit dem *Lush Rescue obp76a*-Konstrukt getestet. Das Einbringen des Rettungskonstrukts $w^{\bar{}}; Lush Rescue obp76a$ in die $w^{\bar{}};+; lush^{\bar{}}$ -Mutante ergab jedoch keine vitalen Fliegen, so dass diese nicht getestet werden konnten. Wie in Abbildung 3.40 gezeigt, zeigen sowohl $w^{\bar{}}; Lush Rescue obp76a$ -Fliegen als auch $w^{\bar{}};+; lush^{\bar{}}$ -Fliegen eine Ethanolpräferenz für fünf Prozent Ethanol. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Fliegenstämmen. Das zeigt, dass die Ausprägung von Ethanolpräferenz nicht von LUSH abhängt.

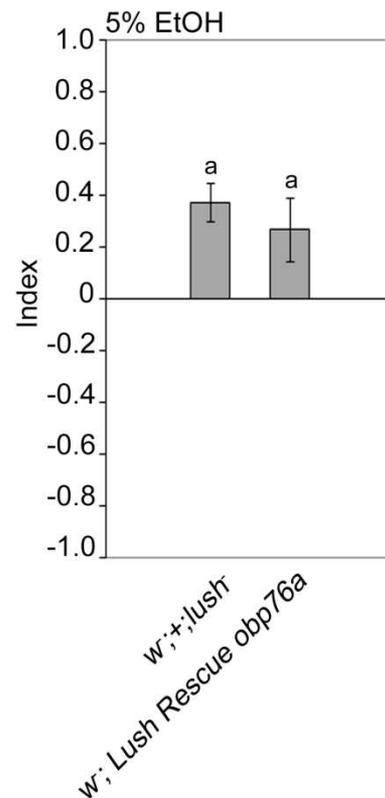


Abbildung 3.40: Fliegen ohne das Bindungsprotein LUSH, sowie Fliegen mit dem Rettungskonstrukt ohne die *lush*-Mutation bilden Ethanolpräferenz für fünf Prozent Ethanol aus ($w;+; lush$ $0,37 \pm 0,07$, $w; Lush Rescue obp76a$ $0,27 \pm 0,12$, $n= 16, 17$). a, $p < 0,05$; * $p < 0.05$.

In Kim *et al.* (1998) wird eine Präferenz von $w;+; lush$ -Fliegen für hohe Alkoholkonzentrationen gezeigt. Dies wird jedoch aufgrund des Fehlens einer Alkoholbindungsstelle von Zhou *et al.* (2004) angezweifelt und das vom Wildtypen unterschiedliche Verhalten auf Dibutylphthalate zurückgeführt, die als Weichmacher in Plastik vorkommen (Zhou *et al.*, 2004). Durch die beiden unterschiedlichen Arbeiten von Kim *et al.* (1998) und Zhou *et al.*, (2004) wurde auf die Bedeutung von Weichmachern in den für Verhaltensversuchen verwendeten Plastikgefäßen aufmerksam gemacht. Deswegen soll die $w;+; lush$ -Mutanten für 23 % Ethanol in Glasgefäßen (Schnappdeckelgefäße mit 40 ml Volumen) getestet werden. Die Abbildung 3.41 zeigt, dass w^{1118} -Fliegen (D. Smith) eine Aversion zeigen, ebenso *ET249*- und $w;+; lush$ -Fliegen. Die Aversion von w^{1118} - und $w;+; lush$ -Fliegen ist signifikant voneinander unterschiedlich. Außerdem unterscheiden sich *ET249*-Fliegen signifikant von w^{1118} - und $w;+; lush$ -Fliegen. Dies zeigt, dass $w;+; lush$ -Fliegen keine Präferenz für hohe Alkoholkonzentrationen aufweisen und dies unabhängig von den in diesem Assay verwendeten Plastikgefäßen ist.

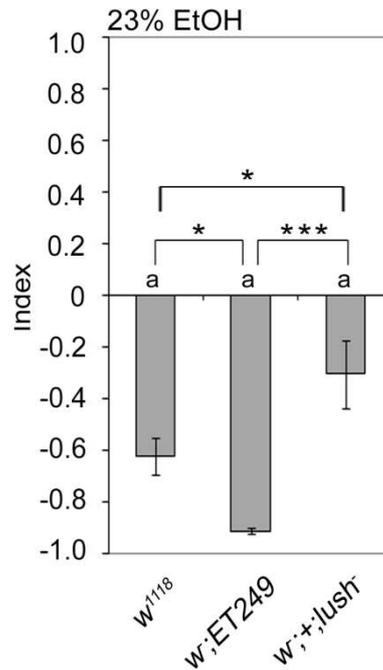


Abbildung 3.41: Die Weichmacher in den Plastikgefäßen beeinflussen die Aversion gegenüber Ethanol nicht wesentlich. Test von w^{1118} -, $w;+;$ $lush$ - und $w;ET249$ -Fliegen für 23 % Ethanol in Glasgefäßen (w^{1118} $-0,62 \pm 0,07$, $w;+;$ $lush$ $-0,31 \pm 0,13$, $w;ET249$ $-0,92 \pm 0,01$, $n= 19, 20, 24$). a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.5.2 Der Duftrezeptor Or83b hat einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz

Für den Test der Ethanolpräferenz wird hier ein duftabhängiger Fallen-Assay verwendet. Um zu testen, ob Präferenz tatsächlich durch einen olfaktorischen Stimulus ausgelöst wird, sollten Fliegen verwendet werden, bei denen der Geruchssinn verändert ist. Der chaperonische Corezeptor Or83b ist hierfür ein guter Ansatz, da er mit den anderen Duftrezeptoren einen heteromeren Komplex ausbildet und es dadurch zur Wahrnehmung des Duftes kommt (Larsson *et al.*, 2004; Neuhaus *et al.*, 2005; Benton *et al.*, 2006). Damit ist Or83b essenziell für die Duftwahrnehmung (Larsson *et al.*, 2004). Fliegen ohne Or83b sollten demnach nicht riechen können.

Die Fliegenlinien $w^{1118};Or83b^1$ und $w^{1118};Or83b^2$, die eine Deletion des putativen Transkriptionsstarts und der ersten fünf der sieben Transmembrandomänen des Rezeptorproteins aufweisen (Larsson *et al.*, 2004), wurden auf ihre Ethanolpräferenz für fünf Prozent beziehungsweise gegenüber 23 % Ethanol getestet (Abbildung 3.42 A). Homozygote w^{1118} -Fliegen und heterozygoten $w^{1118};Or83b^1/+$ -Fliegen zeigen eine Präferenz für fünf Prozent Ethanol. Auffällig hierbei ist die gesteigerte Präferenz der heterozygoten Fliegen. Hingegen zeigen die homozygoten $w^{1118};Or83b^1$ -Fliegen sowie die transheterozygoten $w^{1118};Or83b^1/Or83b^2$ -Fliegen keine Präferenz für fünf Prozent Ethanol. Dies legt nahe, dass die

Ethanolpräferenz von Or83b abhängt. Jedoch reicht die halbe Gendosis für die Ausbildung der Präferenz aus. In Abbildung 3.42 B ist die Aversion gegenüber 23 % Ethanol dargestellt. Hier ist durchgehend bei allen Genotypen eine wildtypische Aversion zu erkennen. Dies zeigt, dass die Aversion gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen nicht alleine von Or83b abhängt. Des Weiteren ist hierdurch gezeigt, dass sowohl die homozygoten $w^{1118}; Or83b^1$ - als auch die transheterozygoten $w^{1118}; Or83b^1/Or83b^2$ -Fliegen hohe Ethanolkonzentrationen wahrnehmen können. Damit sind sie nicht vollkommen anosmisch oder nehmen alternativ die hohe Ethanolkonzentration nicht nur als olfaktorisches Signal wahr. Ebenfalls kann es sein, dass Or83b bei der Duft vermittelten Antwort gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen keine Rolle spielt.

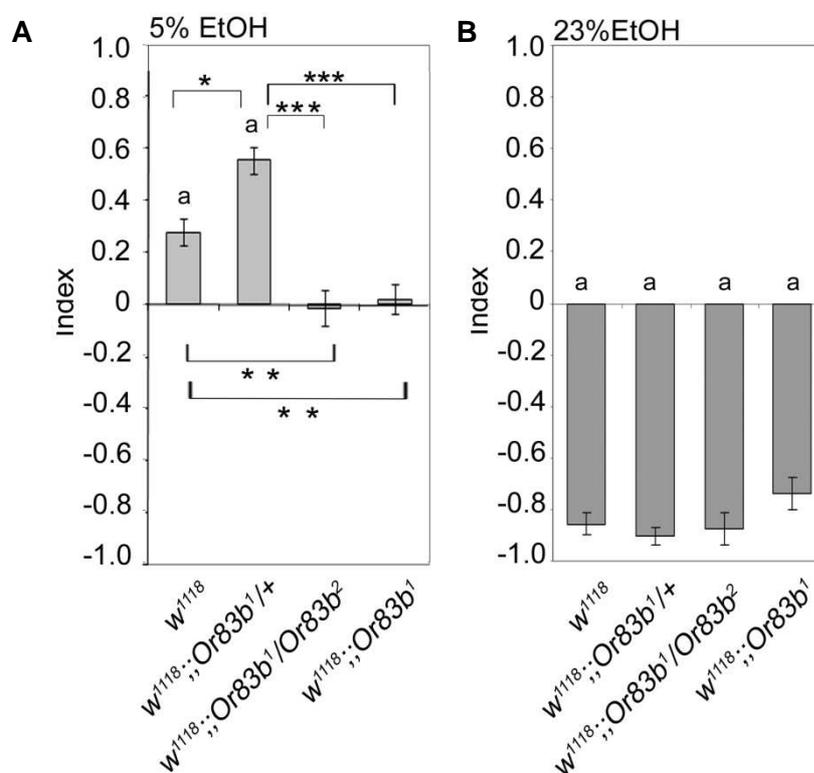


Abbildung 3.42: Ethanolpräferenz ist von Or83b abhängig, die Aversion hingegen nicht. A) Ethanolpräferenz für fünf Prozent Ethanol. w^{1118} - und $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen zeigen eine unterschiedliche Präferenz gegenüber den heterozygoten $w^{1118}; Or83b^1/+$ -Fliegen. Ebenso unterscheiden sich $w^{1118}; Or83b^1/+$ und die transheterozygoten $w^{1118}; Or83b^1/Or83b^2$ -Fliegen signifikant voneinander. $w^{1118}; Or83b^1$ - und $w^{1118}; Or83b^1/Or83b^2$ -Fliegen zeigen keine Präferenz (w^{1118} $0,19 \pm 0,07$, $w^{1118}; Or83b^1/+$ $0,55 \pm 0,05$, $w^{1118}; Or83b^1/Or83b^2$ $-0,01 \pm 0,07$ und $w^{1118}; Or83b^1$ $0,11 \pm 0,08$; n= 24, 26, 32, 31). B) w^{1118} , $w^{1118}; Or83b^1$, homozygote $w^{1118}; Or83b^1$ und heterozygote $w^{1118}; Or83b^1/Or83b^2$ -Fliegen zeigen eine Aversion gegenüber 23 % Ethanol (w^{1118} $-0,88 \pm 0,04$, $w^{1118}; Or83b^1/+$ $-0,89 \pm 0,03$, $w^{1118}; Or83b^1/Or83b^2$ $-0,88 \pm 0,05$ und $w^{1118}; Or83b^1$ $-0,74 \pm 0,06$; n= 12, 11, 12, 12) a, $p < 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ethanolpräferenz für fünf Prozent Ethanol ist bei w^{1118} - und den heterozygoten $w^{1118}; Or83b^2/+$ -Fliegen vorhanden (Abbildung 3.43 A). Die homozygoten $w^{1118}; Or83b^2$ -Fliegen,

sowie die transheterozygoten $w^{1118};Or83b^1/Or83b^2$ -Fliegen hingegen zeigen einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen und keine Ethanolpräferenz. Die Aversion gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen ist bei allen Genotypen vorhanden (Abbildung 3.43 B). Dies legt nahe, dass die Ethanolpräferenz für niedrige Ethanolkonzentrationen von Or83b abhängt, die Aversion gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen hingegen nicht.

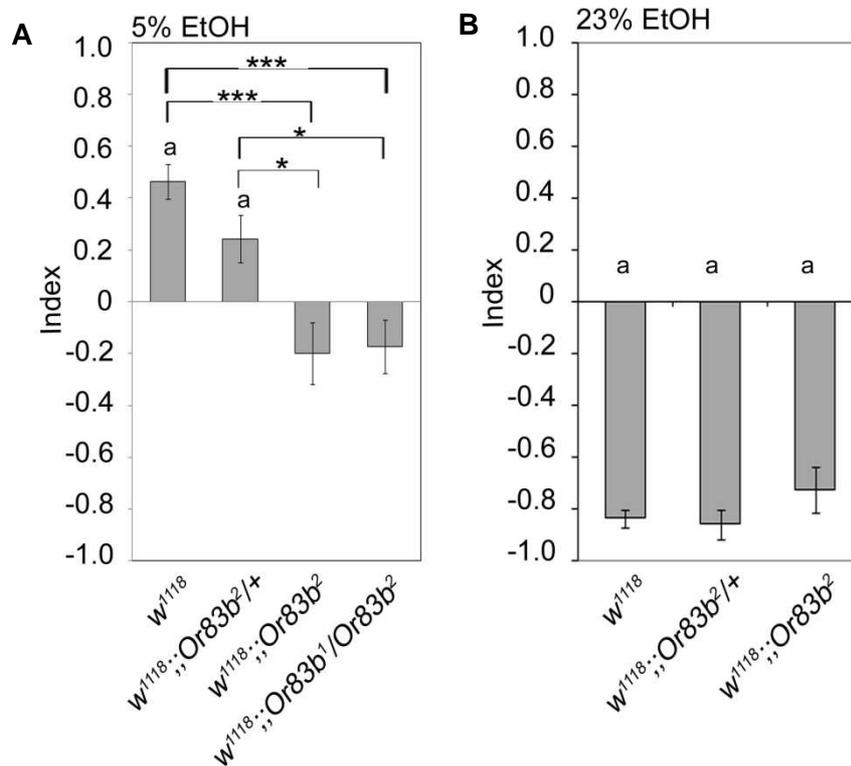


Abbildung 3.43: Ethanolpräferenz ist bei niedrigen Ethanolkonzentrationen von Or83b abhängig, jedoch nicht bei hohen Konzentrationen. A) Ethanolpräferenz für fünf Prozent Ethanol. w^{1118} - und $w^{1118};Or83b^1$ -Fliegen zeigen eine signifikant unterschiedliche Präferenz zu den homozygoten $w^{1118};Or83b^1$ - und heterozygoten $w^{1118};Or83b^1/Or83b^2$ -Fliegen, die keine Präferenz zeigen (w^{1118} $0,46 \pm 0,07$, $w^{1118};Or83b^2/+$ $0,24 \pm 0,09$, $w^{1118};Or83b^2$ $-0,20 \pm 0,12$ und $w^{1118};Or83b^1/Or83b^2$ $-0,17 \pm 0,10$; $n = 18,20,20,27$). B) Eine Aversion gegen 23 % Ethanol ist bei allen Fliegen der drei Genotypen vorhanden (w^{1118} $-0,84 \pm 0,03$, $w^{1118};Or83b^2/+$ $-0,86 \pm 0,06$ und $w^{1118};Or83b^2$ $-0,73 \pm 0,09$; $n = 20, 16, 20$). a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Im nächsten Ansatz sollte getestet werden, ob der Unterschied von w^{1118} - und den $w^{1118};Or83b^1$ -Mutanten hinsichtlich ihrer Ethanolpräferenz auf die Verdünnung des Saftes mit Ethanol zurückzuführen ist. Hierfür wurde der Apfel-Mangosaft in der Kontrollgruppe mit fünf Prozent Wasser verdünnt. Die andere Gruppe erhielt unverdünnten Saft. Die beiden Gruppen wurden jeweils gegen fünf Prozent Ethanol in Saft getestet. Wie in der Abbildung 3.44 zu sehen ist, unterscheiden sich weder w^{1118} - noch $w^{1118};Or83b^1$ -Fliegen hinsichtlich der Zugabe von Wasser bzw. dem Fehlen von Wasser im Saftgefäß. Die $w^{1118};Or83b^1$ -Fliegen unterscheiden sich von w^{1118} -Fliegen, da sie keine Präferenz für fünf Prozent Ethanol

zeigen. Diese Ethanolpräferenz hängt nicht von der Verdünnung des Saftes ab bzw. diese hat somit keinen Einfluss auf das Verhalten. Deswegen wird bei den weiteren Versuchen auf diese Verdünnung verzichtet. Da $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen weder eine Präferenz für fünf Prozent Ethanol noch für den Saft entwickeln, stellt sich die Frage, ob $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen überhaupt Ethanol oder Saft wahrnehmen können.

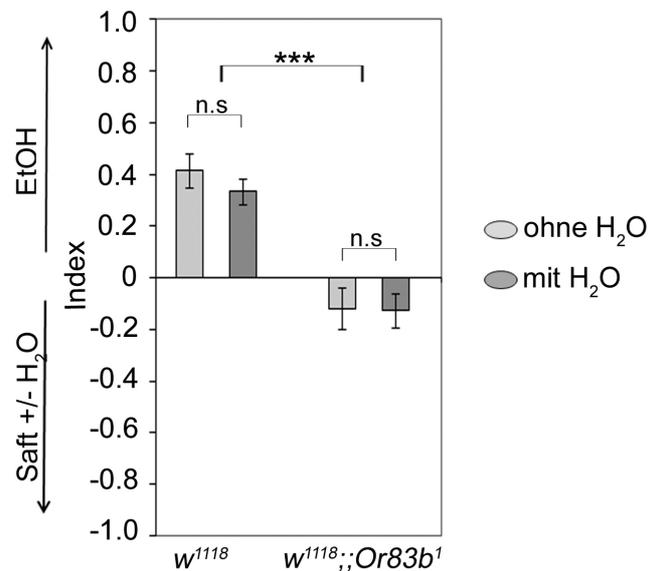


Abbildung 3.44: Die Verdünnung des Kontrollsaftes mit Wasser hat keinen Einfluss auf die Ethanolpräferenz. Der Kontrollsaft wurde in einer Testreihe mit fünf Prozent Wasser verdünnt, da fünf Prozent Ethanol den Saft in der Alkoholseite verdünnt und mit einer Testreihe ohne Verdünnung mit Wasser verglichen. w^{1118} - und $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen zeigen kein unterschiedliches Verhalten im Vergleich zu den beiden Testreihen. Jedoch bilden w^{1118} -Fliegen Ethanolpräferenz aus und $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen nicht (w^{1118} ohne H₂O $0,42 \pm 0,07$, w^{1118} mit H₂O $0,34 \pm 0,05$, $w^{1118};; Or83b^1$ ohne H₂O $-0,12 \pm 0,08$, $w^{1118};; Or83b^1$ mit H₂O $-0,13 \pm 0,06$, n = 19, 19, 19, 20). a, p < 0,05; *p < 0,05.

Um zu überprüfen, ob die $w^{1118};; Or83b^1$ -Mutanten an sich Saft bzw. Ethanol wahrnehmen können, wurde pures Wasser gegen Apfel-Mangosaft bzw. fünf Prozent Ethanol getestet. Für diese Versuche wurde das Testvolumen auf zwei ml vergrößert, da Wasser eine höhere Oberflächenspannung aufweist und ein ml den Boden des Wahlgefäßes nicht vollständig bedeckt. Abbildung 3.45 zeigt, dass die w^{1118} -Kontrollfliegen den Duft von Saft gegenüber Wasser unterscheiden können, wie auch Ethanol von Wasser. Ebenso können $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen Saft und Ethanol wahrnehmen. Jedoch ist der Duft von Saft bzw. Ethanol für $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen nicht so attraktiv, wie für w^{1118} -Fliegen.

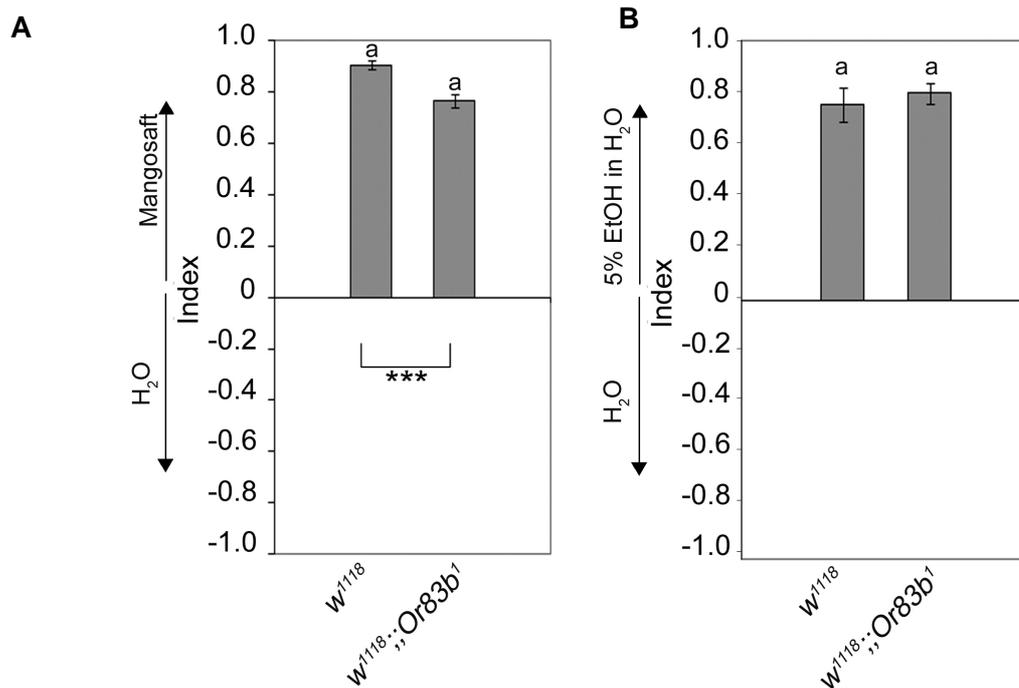


Abbildung 3.45: Or83b-Mutanten nehmen den Duft von Saft bzw. Ethanol wahr. A) $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen können Saft wahrnehmen, finden diesen jedoch nicht so attraktiv wie w^{1118} -Fliegen (w^{1118} $0,91 \pm 0,02$ und $w^{1118};; Or83b^1$ $0,77 \pm 0,03$, $n = 29$). B) w^{1118} - und $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen können fünf Prozent Ethanol wahrnehmen und präferieren diesen gegenüber purem Wasser (w^{1118} $0,76 \pm 0,06$ und $w^{1118};; Or83b^1$ $0,80 \pm 0,04$, $n = 11, 13$). a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$.

Für Fliegen sind komplexere Düfte attraktiver als einfache Düfte (Zhu *et al.*, 2003). Da Apfelsaft im Apfel-Mangosaft enthalten ist, wird Apfelsaft (Apfelsaftkonzentrat, vitafit) alleine gegen Apfel-Mangosaft (abgekürzt mit Mangosaft) getestet. Wegen der erhöhten Oberflächenspannung des Apfelsaftes wurden in beide Gefäße jeweils zwei ml Saft eingebracht. Die Abbildung 3.46 zeigt, dass die w^{1118} -Fliegen sich eher für den komplexeren Duft von Mangosaft entscheiden. Dieses Verhalten ist bei $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen reduziert. Möglicherweise liegt dies daran, dass diese Fliegen den Unterschied zwischen den beiden Düften nicht richtig zuordnen bzw. erkennen können. Dies legt nahe, dass $w^{1118};; Or83b^1$ -Fliegen sich schlechter zwischen zwei unterschiedlich komplexen Düften unterscheiden können.

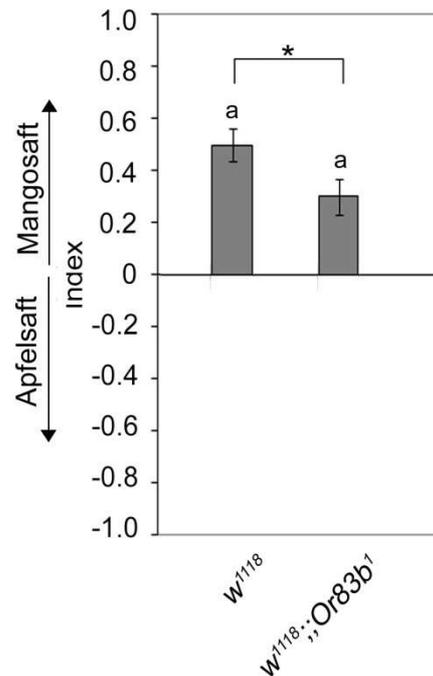


Abbildung 3.46: $Or83b^1$ -Fliegen können nicht zwischen zwei komplexen Düften unterscheiden. w^{1118} -Fliegen zeigen eine Präferenz für den komplexeren Duft von Mangosaft gegenüber Apfelsaft (w^{1118} $0,50 \pm 0,06$ und $w^{1118};;Or83b^1$ $0,30 \pm 0,07$, $n = 27, 31$). a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$.

Die oben beschriebenen Versuche legen nahe, dass die $w^{1118};;Or83b^1$ -Fliegen einen Defekt in der Erkennung von unterschiedlich komplexen Düften haben. Da Säfte in ihrer Zusammensetzung variieren können und nicht gewährleistet werden kann, dass die Mischung exakt den reinen Duft bzw. den komplexeren Duft widerspiegelt, wurde der Ansatz mit Ethanol als reinen Duft durchgeführt. In Abbildung 3.47 zeigen die dunkelgrauen Balken, dass sowohl w^{1118} - als auch $w^{1118};;Or83b^1$ -Fliegen den Mangosaft gegenüber fünf prozentigem Ethanol bevorzugen, wobei w^{1118} - sich signifikant von $w^{1118};;Or83b^1$ -Fliegen unterscheiden. Um erkennen zu können, ob $Or83b^1$ -Fliegen komplexe Düfte unterscheiden können, wird dem Mangosaft fünf Prozent Ethanol hinzugegeben, wodurch dieser Duft komplexer wird. Die Wahlmöglichkeit besteht daher zwischen in Wasser verdünntem fünf prozentigen Ethanol und fünf Prozent Ethanol in Mangosaft. Die dunkelgrauen Balken in Abbildung 3.47 zeigen, dass w^{1118} - signifikant stärker als $w^{1118};;Or83b^1$ -Fliegen den komplexen Duft präferieren. Ein Vergleich der hellgrauen und dunkelgrauen Balken zeigt deutlich, dass w^{1118} -Fliegen einen Unterschied zwischen Mangosaft mit fünf Prozent Ethanol und purem Mangosaft wahrnehmen können und eine Ethanolpräferenz zeigen. Hingegen weisen $w^{1118};;Or83b^1$ -Mutanten keinen Unterschied in ihrer Wahrnehmung zwischen Mangosaft und dem komplexeren Mangosaft mit fünf Prozent Ethanol auf. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass erstens $w^{1118};;Or83b^1$ -Mutanten riechen können, sie zweitens jedoch

nicht zwei ähnlich komplexe Düfte voneinander unterscheiden können und deshalb möglicherweise keine Ethanolpräferenz ausbilden.

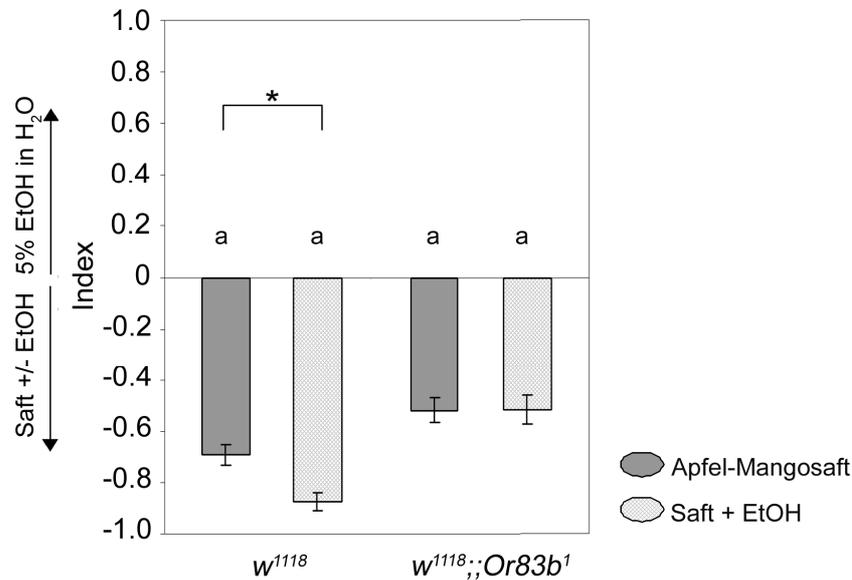


Abbildung 3.47: $Or83b^1$ -Mutanten können keine ähnlich komplexen Düfte unterscheiden. w^{1118} -Fliegen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen Mangosaft mit und ohne fünf Prozent Ethanol, während $w^{1118};;Or83b^1$ -Fliegen keinen Unterschied aufweisen (w^{1118} ohne Ethanol $-0,69 \pm 0,04$ und $w^{1118};;Or83b^1$ $-0,52 \pm 0,05$, w^{1118} mit Ethanol $-0,87 \pm 0,03$ und $w^{1118};;Or83b^1$ $-0,52 \pm 0,06$, $n = 33, 31, 29, 30$). a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$.

Der Verlust der Präferenz für fünf Prozent Ethanol und Saft in den $w^{1118};;Or83b^1$ -Mutanten könnte spezifisch für Ethanol sein. Um zu testen, ob dies auch für eine andere Klasse von chemischen Molekülen gilt, sollte untersucht werden, ob $w^{1118};;Or83b^1$ -Mutanten auch den Verlust von Präferenz zu anderen Substanzen aufweisen. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe von S. Demirkol erhoben. Essigsäure ist eine volatile Chemikalie, die bei Fermentation auftritt und von *Drosophila* als attraktiv eingestuft wird (Fuyama, 1976). Da in früheren Arbeiten eine Präferenz im Olfaktometer bei einer geringen Konzentration von 0,125 % Essigsäure und eine Präferenz für die Eiablage auf einem Substrat mit fünf Prozent Essigsäure (Fuyama, 1976; Joseph *et al.*, 2009) gezeigt werden konnte, wurde zunächst eine Konzentrationsreihe durchgeführt. Hierdurch sollte die für die in diesem Assay relevante Konzentration ermittelt werden und gleichzeitig getestet werden, ob ein Unterschied zwischen den w^{1118} -Kontrollfliegen und $w^{1118};;Or83b^1$ -Mutanten besteht (Abbildung 3.48). Es wurden verschiedene Konzentrationen von Essigsäure in Mangosaft im Verhältnis zum Mangosaft getestet (0 % bis 12,5 %). In hellgrau sind die w^{1118} -Kontrollfliegen dargestellt und in dunkelgrau $w^{1118};;Or83b^1$ -Fliegen. Bei null Prozent unterscheiden sich die Fliegen beider Genotypen nicht in ihrer Präferenz. Alle darauffolgenden Konzentrationen von 0,0125 %, 0,125 % und 1,25 % Essigsäure werden von w^{1118} -Fliegen präferiert, während höhere

Konzentrationen von 2 %, 5 % oder 12,5 % Essigsäure neutral bzw. aversiv von den Fliegen eingestuft werden. Diese U-förmige konzentrationsabhängige Kurve ist in $w^{1118}; Or83b^1$ -Mutanten nach rechts verschoben. Erst ab zwei Prozent zeigen $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen eine Präferenz für Essigsäure, während die Aversion für fünf Prozent und 12,5 % Essigsäure weniger stark ausgeprägt ist, als bei der Kontrolle. Dies bekräftigt das vorherige Ergebnis, dass $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen nicht völlig anosmisch sind. $w^{1118}; Or83b^1$ -Mutanten nehmen offenbar Essigsäure anders wahr, wodurch es zu einer veränderten Präferenz kommt, die jedoch erst bei höheren Konzentrationen als bei w^{1118} -Fliegen ausgebildet wird.

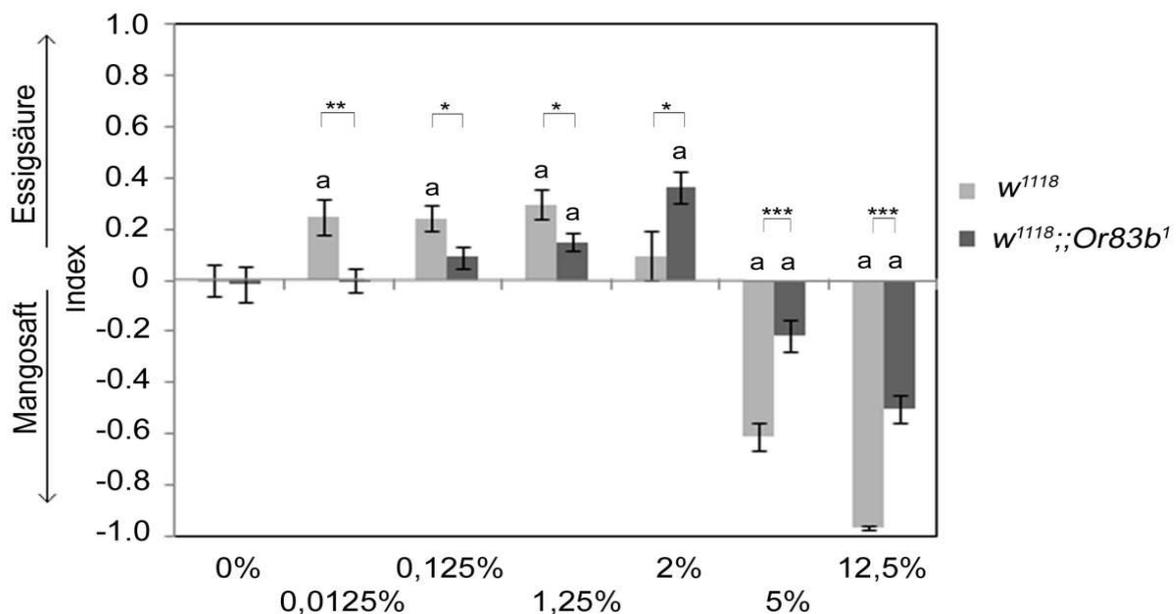


Abbildung 3.48: $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen zeigen eine konzentrationsabhängige Antwort auf Saft mit Essigsäure. Test von 0 % - 12,5 % Essigsäure gegen Apfel-Mangosaft. Bei 0 % Essigsäure unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht, jedoch sind sie signifikant unterschiedlich bei den anderen getesteten Konzentrationen. (0 %: w^{1118} 0,00 ± 0,06 und $w^{1118}; Or83b^1$ -0,02 ± 0,07, n= 17, 0,0125 %: w^{1118} 0,25 ± 0,07 und $w^{1118}; Or83b^1$ 0,00 ± 0,05, n= 32, 31, 0,125 %: w^{1118} 0,24 ± 0,05 und $w^{1118}; Or83b^1$ 0,09 ± 0,04, n= 38, 33, 1,25 %: w^{1118} 0,30 ± 0,06 und $w^{1118}; Or83b^1$ 0,15 ± 0,03, n= 30, 2 %: w^{1118} 0,10 ± 0,10 und $w^{1118}; Or83b^1$ 0,36 ± 0,06, n= 18, 21, 5 %: w^{1118} -0,22 ± 0,05 und $w^{1118}; Or83b^1$ -0,22 ± 0,06, n= 20, 19, 12,5 %: w^{1118} -0,97 ± 0,01 und $w^{1118}; Or83b^1$ -0,50 ± 0,06, n= 12, 11). a, p<0,05, *p<0,05, Datenerhebung mit Hilfe von S. Demirkol.

Für eine genauere Betrachtung der Präferenz bzw. dem Übergang von Präferenz hin zu Aversion wurden die Konzentrationen zwei und fünf Prozent Essigsäure in Mangosaft gegen Mangosaft wiederholt. Hierfür wurden w^{1118} -, $w^{1118}; Or83b^1$ - und $w^{1118}; Or83b^2$ -Fliegen getestet (Abbildung 3.49). w^{1118} -Fliegen zeigen bei zwei Prozent keine Präferenz für Essigsäure und bei fünf Prozent eine hohe Aversion gegenüber Essigsäure. Dies bestätigen die Ergebnisse von Abbildung 3.48. Die $w^{1118}; Or83b^1$ -Mutanten zeigen bei zwei Prozent eine signifikant erhöhte Präferenz und bei fünf Prozent eine signifikant reduzierte Aversion. Die $w^{1118}; Or83b^2$ -Fliegen verhalten sich bei zwei Prozent wie die wildtypische Kontrolle, bei

fünf Prozent hingegen zeigen $w^{1118}; Or83b^2$ -Fliegen ebenfalls eine hoch signifikante reduzierte Aversion. Anhand dieser Daten, kann die Hypothese bekräftigt werden, dass die Duftwahrnehmung von $Or83b$ -Mutanten abgeschwächt ist und die Fliegen erst bei einer höheren Konzentration auf den Duftstimulus antworten.

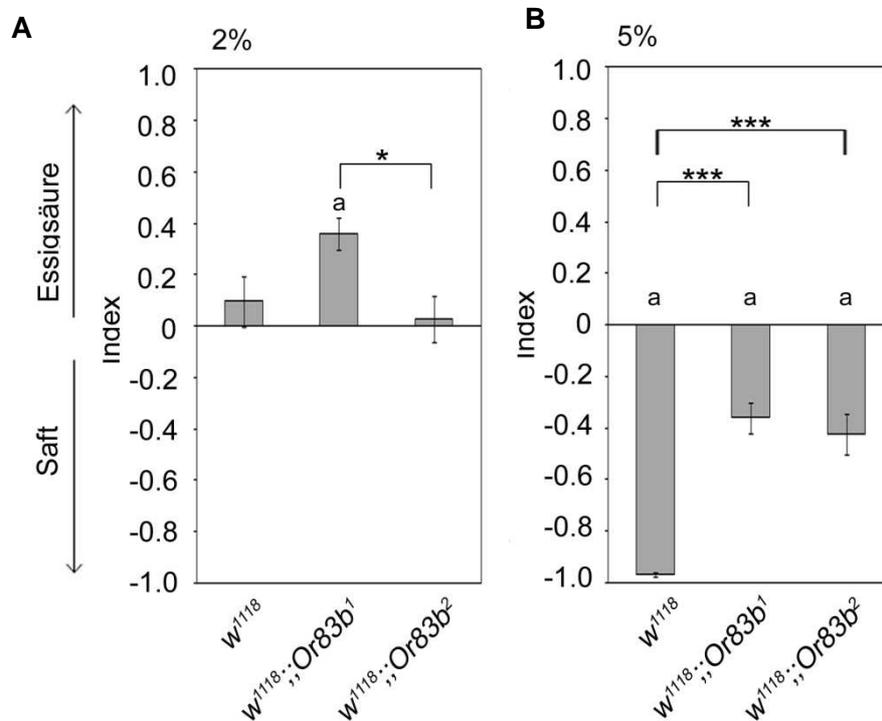


Abbildung 3.49: $w^{1118}; Or83b$ -Fliegen können zwischen zwei Prozent und fünf Prozent Essigsäure unterscheiden. A) $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen zeigen eine Präferenz für zwei Prozent Essigsäure hingegen w^{1118} - und $w^{1118}; Or83b^2$ -Fliegen nicht (w^{1118} 0,10 ± 0,10, $w^{1118}; Or83b^1$ 0,36 ± 0,06, $w^{1118}; Or83b^2$ 0,03 ± 0,09, n= 18, 21, 19). B) Alle drei Genotypen zeigen eine Aversion gegenüber fünf Prozent Essigsäure. Die Aversion von $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen und $w^{1118}; Or83b^2$ -Fliegen ist gegenüber w^{1118} -Fliegen signifikant reduziert (w^{1118} -0,97 ± 0,01, $w^{1118}; Or83b^1$ -0,36 ± 0,06, $w^{1118}; Or83b^2$ -0,42 ± 0,08, n= 25, 17, 22). a $p < 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Die fehlende Präferenz von $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen für fünf Prozent Ethanol kann möglicherweise auf eine Verschiebung der Verhaltensantwort auf eine höhere Konzentration des zu testenden Substrats zurückgeführt werden. Deswegen wird die Ethanolpräferenz der $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen für 10 % Ethanol in Mangosaft gegen Mangosaft getestet (Abbildung 3.50). Bei dieser Konzentration sind wildtypische Fliegen unentschieden und zeigen weder eine Präferenz noch eine Aversion (Ogueta *et al.*, 2010). Es lässt sich kein Unterschied zwischen w^{1118} - und $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen nachweisen. Die vorherigen Versuche zeigen jedoch, dass die Ethanolpräferenz von $Or83b$ vermittelt wird und ohne diese nicht ausgebildet werden kann. Das Fehlen der Präferenz hängt demnach nicht von einer zu niedrig gewählten Konzentration ab, da 23 % Ethanol auf wildtypischem Level aversiv wirkt. Vielmehr hängt das Fehlen der Ethanolpräferenz damit zusammen, dass die $Or83b$ -

Mutanten den komplexen Duft Apfel-Mangosaft nicht von dem noch komplexeren Duft Apfel-Mangosaft mit Ethanol unterscheiden können. Ab einer gewissen Konzentration scheint jedoch der Duft von Ethanol bzw. von Essigsäure als einzelne Komponente wahrgenommen werden zu können oder nicht von Or83b abzuhängen.

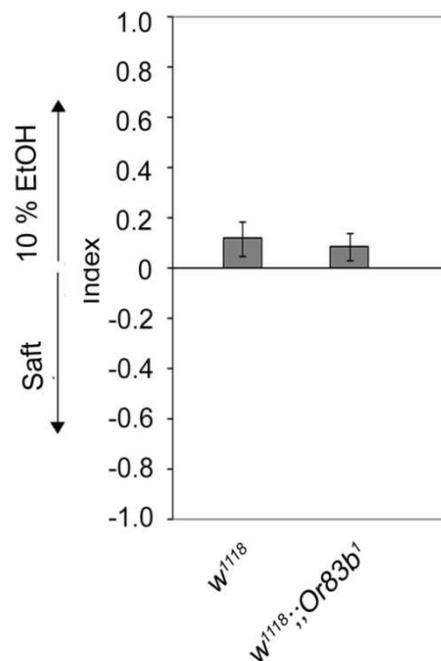


Abbildung 3.50: Eine Erhöhung des angebotenen Ethanolduftes ruft keine Ethanolpräferenz hervor. Test der $w^{1118}; Or83b^1$ -Mutanten für 10 % Ethanol in Mangosaft gegen Mangosaft. w^{1118} - und $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen zeigen keine Ethanolpräferenz (w^{1118} $0,11 \pm 0,07$ und $w^{1118}; Or83b^1$ $0,09 \pm 0,05$, n= 31, 32). a, $p < 0,05$; * $p < 0,05$.

3.5.3 Fehlende Geschmackswahrnehmung beeinflusst nicht die Ethanolpräferenz

Da *pox neuro (poxn)* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems spielt (Bopp *et al.*, 1989), wurden Mutanten für dieses Gen ausgewählt, um den Einfluss des Geschmackssinns auf die Ethanolpräferenz zu untersuchen. Da die Männchen der von Boll und Noll, 2002 veröffentlichte *Poxn* Nullmutante möglicherweise Defekte im Gehirn aufweisen und möglicherweise die Lokomotion beeinflusst ist (Boll und Noll, 2002), wurden in dieser Arbeit *Poxn* Nullmutanten mit einem partiellen *Poxn*-Rettungstransgen verwendet. Bei diesem partiellen Rettungskonstrukt werden bis auf die chemosensorischen Neurone die Funktionen von *poxn* bei der Bein- und Antennensegmentierung, der Gehirnfunktion, der Ventralganglienfunktion und der Genitalentwicklung gerettet (W. Boll, persönliche Kommunikation). Als Kontrolle wurde $w; Poxn^{AM22-B5} P\{W6 poxn_resc\} SuperA158$ (fortan *SuperA 158*) mit dem kompletten *poxn* Gen und den regulatorischen Sequenzen verwendet.

Die beiden Mutanten $w^+; Poxn^{AM22-B5} P\{W6\ poxn_resc\} \Delta SfoBs\ 105$ (fortan $\Delta SfoBs\ 105$) und $w^+; Poxn^{AM22-B5} P\{W6\ poxn_resc\} \Delta SfoBs\ 127$ (fortan $\Delta SfoBs\ 127$) entstammen aus der gleichen Rekombinationskreuzung.

Die wildtypischen Kontrollfliegen zeigen eine Ethanolpräferenz, ebenso heterozygote Fliegen (Abbildung 3.51 A). Die $\Delta SfoBs\ 105$ -Fliegen zeigen eine große Varianz in ihrem Verhalten und sind nicht unterschiedlich zu den Kontrollfliegen. Diese zeigen jedoch eine zu null unterschiedliche Präferenz. Da die Varianz innerhalb der Daten sehr hoch ist, muss die Datenerhebung fortgesetzt werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Die Aversion gegenüber 23 % Ethanol (Abbildung 3.51 B) ist bei allen getesteten Fliegen vorhanden und nicht signifikant unterschiedlich. Dies deutet darauf hin, dass die Aversion gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen von der Fähigkeit zu schmecken unabhängig ist.

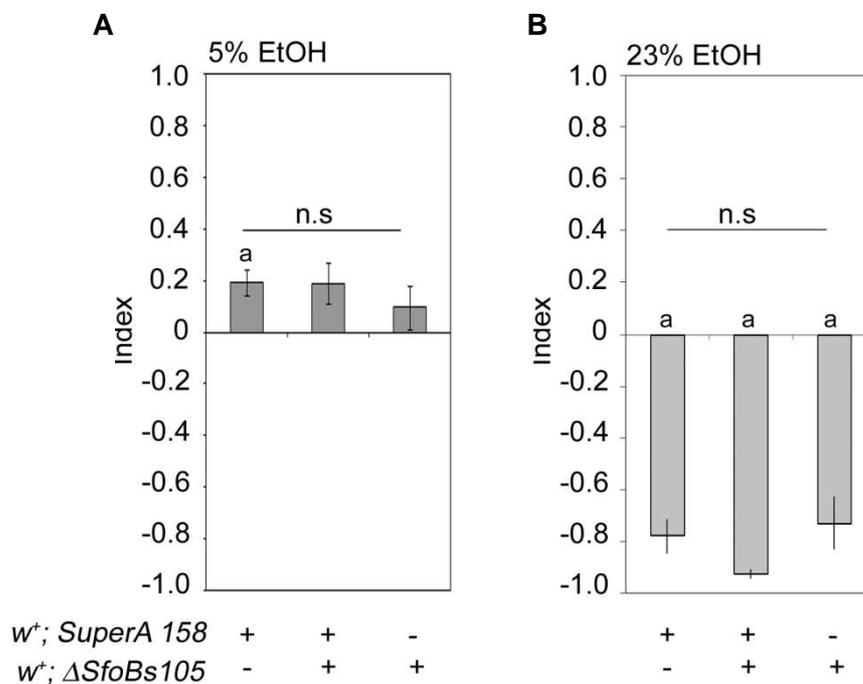


Abbildung 3.51: Ethanolaversion hängt nicht von *poxn* ab. A) Homozygote $w^+; \Delta SfoBs\ 105$ -Fliegen unterscheiden sich nicht von den Kontrollfliegen aufgrund der hohen Varianzen in den Daten ($w^+; SuperA\ 158\ 0,20 \pm 0,05$, $w^+; SuperA\ 158/\Delta SfoBs\ 105\ 0,19 \pm 0,08$, $w^+; \Delta SfoBs\ 105\ 0,10 \pm 0,08$ n= 32, 32, 31). B) Die $w^+; \Delta SfoBs\ 105$ -Mutanten unterscheiden sich nicht von $w^+; SuperA\ 158$ -Fliegen hinsichtlich der Aversion gegenüber 23 % Ethanol ($w^+; SuperA\ 158\ -0,78 \pm 0,07$, $w^+; SuperA\ 158/\Delta SfoBs\ 105\ -0,93 \pm 0,02$, $w^+; \Delta SfoBs\ 105\ -0,73 \pm 0,10$ n= 16, 18, 17). a, $p < 0,05$, $p^* < 0,05$.

Dieser Versuch wurde mit einem anderen Allel für das partielle Rettungskonstrukt wiederholt. Heterozygote $SuperA\ 158/\Delta SfoBs\ 127$ -Fliegen zeigen eine gesteigerte Präferenz für fünf Prozent Ethanol, welche signifikant unterschiedlich zur Präferenz der homozygoten $\Delta SfoBs\ 127$ -Fliegen ist (Abbildung 3. 52 A). Die homozygoten Fliegen des Genotyps $\Delta SfoBs\ 127$ zeigen ebenso wie die $\Delta SfoBs\ 105$ -Fliegen eine Tendenz für Ethanol, jedoch ist

der Wert nicht unterschiedlich von null und kann daher nicht als eindeutige Präferenz gewertet werden, d. h. die Anzahl der Versuche muss erhöht werden, bis eine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Die Überpräferenz der heterozygoten Fliegen deutet auf *Modifier* oder *second-site* Mutationen im genetischen Hintergrund der Fliegen hin, die bei $\Delta SfoBs$ 105-Fliegen anders oder nicht vorhanden sind. Diese Verstärkung des Verhaltens ist auch anhand der Aversion gegenüber 23 % Ethanol (Abbildung 3.52 B) zu erkennen. Die heterozygoten Fliegen unterscheiden sich in ihrem Verhalten signifikant von der Kontrolle und von den homozygoten $\Delta SfoBs$ 127-Fliegen. Jedoch zeigen Fliegen aller Genotypen eine Aversion gegenüber der hohen Ethanolkonzentration, wodurch bestätigt wird, dass die Aversion nicht von der *poxn*-abhängigen Geschmackswahrnehmung abhängt.

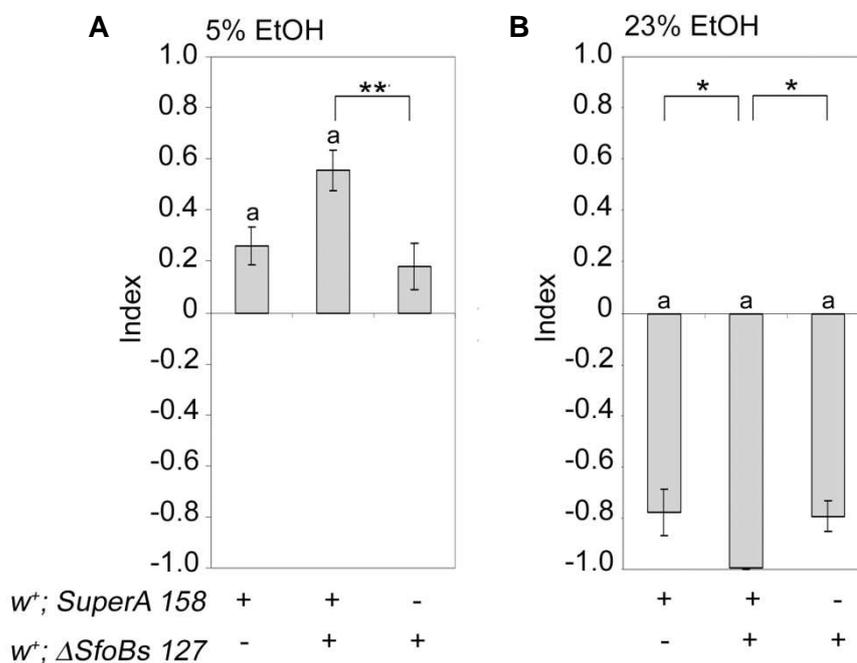


Abbildung 3.52: Heterozygote $w^+; SuperA158/\Delta SfoBs127$ -Fliegen zeigen gesteigerte Ethanolpräferenz (A) und eine stärkere Aversion (B). A) Der Test für fünf Prozent Ethanol in Saft gegen reinen Saft zeigt, dass die heterozygoten $w^+; SuperA\ 158/ \Delta SfoBs\ 127$ -Fliegen sich signifikant von den homozygoten Fliegen unterscheiden ($w^+; SuperA\ 158$ $0,26 \pm 0,07$, $w^+; SuperA\ 158/ \Delta SfoBs\ 127$ $0,56 \pm 0,08$, $w^+; \Delta SfoBs\ 127$ $0,19 \pm 0,09$ $n= 22, 27, 25$). B) Heterozygote $w^+; SuperA\ 158/ \Delta SfoBs\ 127$ -Fliegen zeigen bei 23 % Ethanol eine 100%ige Aversion ($w^+; SuperA158$ $-0,78 \pm 0,09$, $w^+; SuperA\ 158/ \Delta SfoBs\ 127$ $-1,00 \pm 0,00$, $w^+; \Delta SfoBs127$ $-0,79 \pm 0,06$ $n=13\ 12, 9$). a, $p<0,05$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Da die *poxn*-Mutanten eine hohe Varianz in ihrem Verhalten aufweisen, sollte überprüft werden, ob diese Fliegen wirklich nicht schmecken können. Dies wurde mit Hilfe des Fliegen Schmeck-Tests durchgeführt (Abbildung 3.53). Hierzu wurde entweder rote Farbe bzw. blaue Farbe mit Saccharoselösung versetzt. Die *poxn* $\Delta SfoBs$ 127- und $\Delta SfoBs$ 105-Fliegen zeigen eine Präferenz für die belohnte Farbe, wenn auch nicht im gleichen Maß wie die

Kontrolle. Das heißt, dass diese Fliegen entweder noch schmecken können oder der Prozess von *poxn* unabhängig ist.

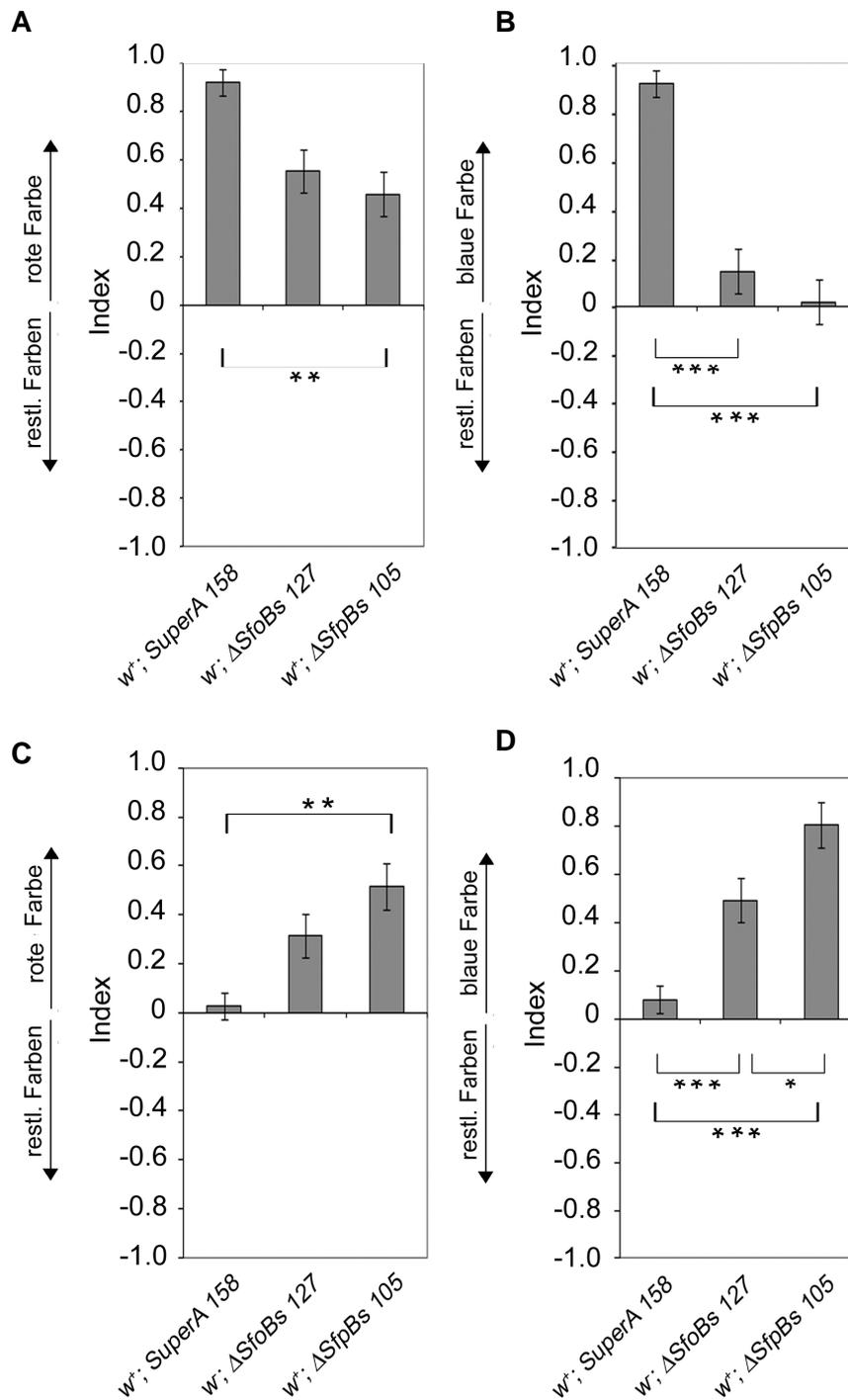


Abbildung 3.53: Schmeck-Test für $\Delta SfoBs$ 127- und $\Delta SfoBs$ 105-Fliegen bei dem jeweils die rote (A) oder die blaue (B) Farbe mit einer 1 M Zuckerlösung belohnt wurde und gegen die anderen Farbkombinationen aufgetragen wurde. Die $\Delta SfoBs$ 127- und $\Delta SfoBs$ 105-Fliegen zeigen eine reduzierte Fähigkeit die belohnte Farbe wahrzunehmen (rot *SuperA 158* $0,9 \pm 0,1$, $\Delta SfoBs$ 127 $0,6 \pm 0,1$, $\Delta SfoBs$ 105 $0,5 \pm 0,1$; blau *SuperA 158* $0,9 \pm 0,0$, $\Delta SfoBs$ 127 $0,1 \pm 0,1$, $\Delta SfoBs$ 105 $0 \pm 0,1$, n= 6). C und D) $\Delta SfoBs$ 127- und $\Delta SfoBs$ 105-Fliegen zeigten zu *SuperA 158*-Fliegen signifikant vermehrt keine Färbung des Abdomens auf. (C rot und D blau) (rot *SuperA 158* $0 \pm 0,0$, $\Delta SfoBs$ 127 $0,3 \pm 0,0$, $\Delta SfoBs$ 105 $0,3 \pm 0,0$; blau *SuperA 158* $0,1 \pm 0,0$, $\Delta SfoBs$ 127 $0,5 \pm 0,1$, $\Delta SfoBs$ 105 $0,8 \pm 0,0$, n= 6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Da sich ein Unterschied in der Fähigkeit zu Schmecken für die Farben rot und blau ergab, sollte getestet werden, ob die Fliegen trotz der Dunkelheit eine Vorliebe für eine der beiden Farbe ausbilden. Hierfür wurden beide Farben belohnt und das Verhältnis zwischen den Fliegen die entweder ein rotes oder violette, bzw. ein blaues oder violette Abdomen aufwies berechnet. Es zeigt sich kein Unterschied in den beiden Farben, wenn beide belohnt wurden (Abbildung 3.54 A). Ebenso ergibt sich kein Unterschied, wenn keine der beiden Farben belohnt wurde (Abbildung 3.54 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass $\Delta SfoBs$ 127- und $\Delta SfoBs$ 105-Fliegen in ihrer Fähigkeit zu Schmecken eingeschränkt sind, jedoch nicht vollständig geschmacksblind sind. Außerdem zeigen $\Delta SfoBs$ 105-Fliegen eine stärkere Reduktion der Fähigkeit zu Schmecken als $\Delta SfoBs$ 127-Fliegen.

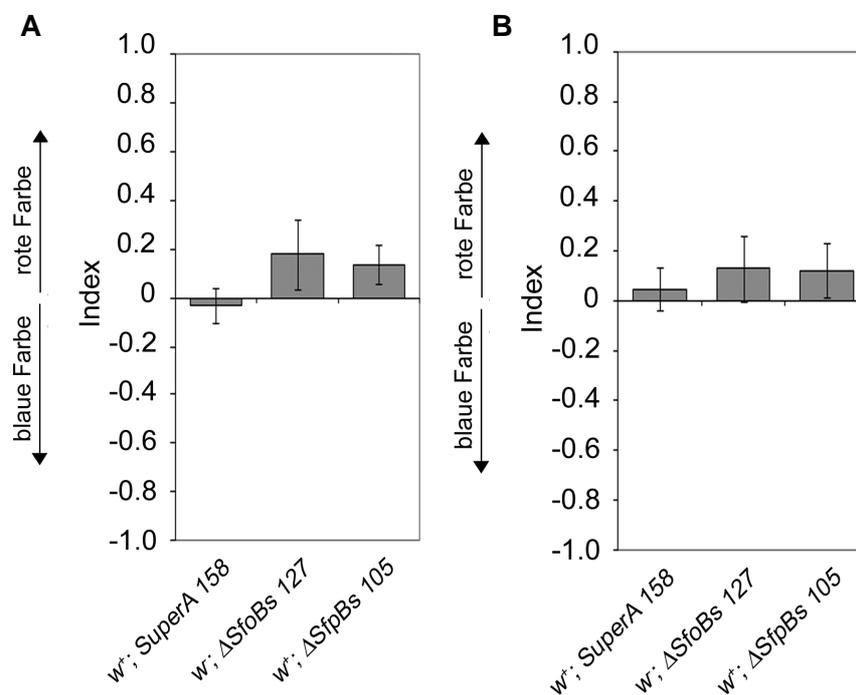


Abbildung 3.54: Keine der angebotenen Farben ist für die Fliegen im Dunklen attraktiver. A) Rot und blau wurden jeweils mit 1 M Saccharoselösung versetzt. $\Delta SfoBs$ 127- und $\Delta SfoBs$ 105-Fliegen bevorzugen genauso wie *SuperA* 158-Fliegen keine Farbe (*SuperA* 158 $0 \pm 0,1$, $\Delta SfoBs$ 127 $0,0 \pm 0,1$, $\Delta SfoBs$ 105 $0,1 \pm 0,1$, n= 5). B) Werden beide Farben nicht mit einer Saccharoselösung belohnt, so unterscheiden sich die Fliegen der drei Genotypen nicht signifikant voneinander (*SuperA* 158 $0 \pm 0,1$, $\Delta SfoBs$ 127 $0,1 \pm 0,1$, $\Delta SfoBs$ 105 $0,1 \pm 0,1$, n= 7).

3.5.4 Die Alkoholdehydrogenase beeinflusst die Ethanolpräferenz

Die Alkohol-Dehydrogenase- (ADH) Mutanten zeigen keine Präferenz für fünf Prozent Ethanol und eine reduzierte Aversion gegenüber 23 % Ethanol (Ogueta *et al.*, 2010). Um zu testen, ob die reduzierte Ethanolpräferenz auf die Anreicherung des toxischen Metaboliten Acetaldehyd zurückgeführt werden kann, wurden Fliegen getestet, in denen das zweite Enzym im Ethanolmetabolismus mutiert ist. Diese Aldehyddehydrogenase (ALDH)- Mutanten

können demnach Ethanol in Acetaldehyd abbauen, jedoch wird das Acetaldehyd nicht weiter abgebaut (Fry *et al.*, 2004; Fry und Saweikis, 2006). Für den Test wurden zwei verschiedene *ALDH*-Mutanten verwendet, zum einen die *24 J*-Mutante und zum anderen die *17 H*-Mutante (Abbildung 3.55). Die *ALDH*-Mutanten *17 H* stammen von einem anderen Rekombinationsereignis ab. Als Kontrolle für die *ALDH*-Mutante *24 J* diente die *14 B*-Fliegenlinie. Die Fliegenlinie mit der Defizienz (*Df(2L)N22-14/CyO*) umfasst den *ALDH*-Genlocus im Genom (Fry *et al.*, 2004). Homozygote *14 B*-Kontrollfliegen und heterozygote *Df(2L)N22-14/14B*-Fliegen zeigen Ethanolpräferenz. Dies legt nahe, dass die halbe Gendosis für die Ausbildung der Ethanolpräferenz ausreicht. Dies wird durch die heterozygoten *14 B/17 H*-Fliegen bestätigt. Homozygote *24 J*-Mutanten weisen keine Ethanolpräferenz auf, ebenso wie heterozygote *24 J/14 B*-Fliegen, die die halbe Gendosis besitzen und damit eigentlich eine Ethanolpräferenz zeigen sollten. Fliegen mit dem Genotyp *24 J/Df(2L)N22-14* haben kein *ALDH*-Enzym und zeigen keine Ethanolpräferenz. Dies legt nahe, dass die Ausprägung der Ethanolpräferenz von der *ALDH*-Funktion abhängt, bzw. dass die Anreicherung von Ethanol und Acetat aversiv ist. Aufgrund der hohen Varianzen in den Daten, konnte mit ANOVA kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

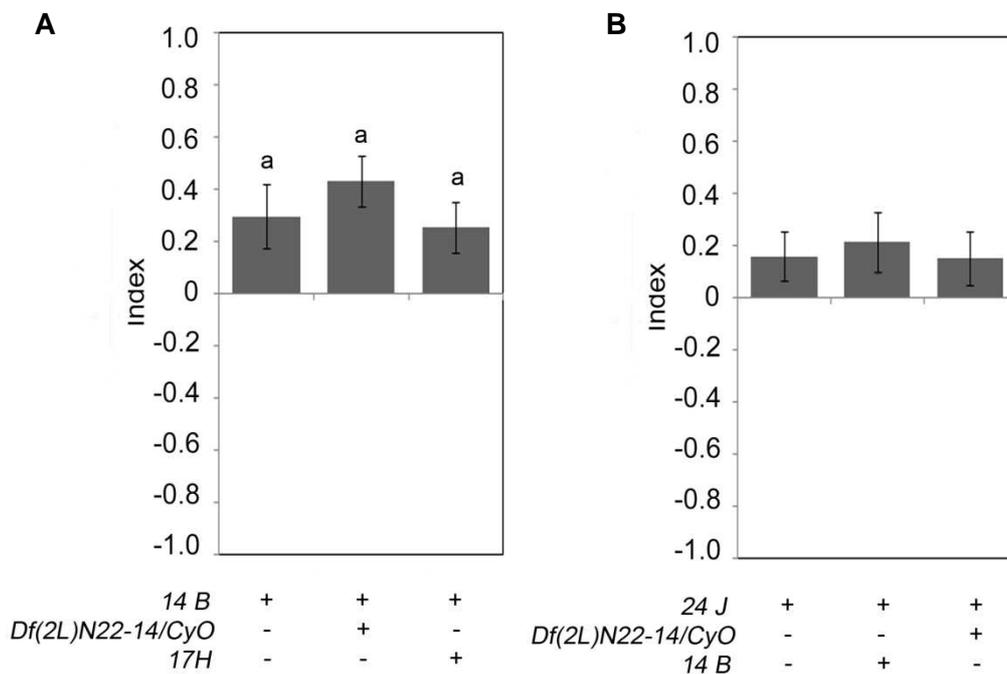


Abbildung 3.55: Ethanolpräferenz ist wahrscheinlich von *ALDH* abhängig. A) Homozygote *14 B*-Fliegen, heterozygote *Df(2L)N22-14/14B*- und *14 B/17 H*-Fliegen zeigen Ethanolpräferenz für fünf Prozent Ethanol in Mangosaft gegen Mangosaft (*14 B* $0,30 \pm 0,12$; *Df(2L)N22-14/14B* $0,43 \pm 0,10$, *14 B/17 H* $0,26 \pm 0,10$, $n = 23, 20, 22$). B) *24 J*-, *14 B/24 J*- und *24 J/Df(2L)N22-14*-Fliegen zeigen keine Ethanolpräferenz (*24 J* $0,16 \pm 0,10$, *24 J/14 B* $0,321 \pm 0,11$, *24 J/Df(2L)N22-14* $0,15 \pm 0,10$, $n = 24, 20, 23$). a, $p < 0,05$.

4. Diskussion

4.1 T β H/Oktopamin ist für die Ethanolpräferenz in zwei Zellgruppen von 22 Neuronen wichtig

Oktopamin kann als sowohl als Neurotransmitter, Neuromodulator als auch als Neurohormon in Insekten wirken und hat damit Einfluss auf verschiedene Verhaltensweisen (Roeder, 1999). Die Biosynthese von Oktopamin benötigt das Enzym Tyramin- β -Hydroxylase, um Tyramin in Oktopamin umzuwandeln (Monastirioti *et al.*, 1996; Roeder, 2005). Bislang konnte anhand von *inactiv*-Mutanten gezeigt werden, dass Tyramin und Oktopamin eine Rolle in Kokain-induzierten Verhalten spielen (McClung und Hirsh, 1999). Außerdem bilden *T β H^{nM18}*-Mutanten eine reduzierte Ethanoltoleranz bei wiederholter Ethanolgabe aus (Scholz *et al.*, 2000) und zeigen eine gesteigerte hyperaktive Antwort auf Ethanol (Scholz, 2005). Daher sollte der Einfluss von T β H auf die Ethanolpräferenz untersucht werden.

Anhand von Mutanten für das Enzym T β H konnte gezeigt werden, dass T β H für die Ausbildung von Ethanolpräferenz notwendig ist (Abbildung 3.1). In den *T β H^{nM18}*-Mutanten gibt es kein Oktopamin, dafür jedoch ein um ein sechsfach erhöhtes Level an Tyramin (Monastirioti *et al.*, 1996). Des Weiteren konnte anhand der Tyramin-Oktopamin-Rezeptormutante *honoka* gezeigt werden, dass Tyramin eine funktionelle Rolle in der Duftwahrnehmung im T-Maze-Assay als Neurotransmitter oder Neuromodulator hat (Kutsukake *et al.*, 2000). Die Veränderungen im Verhalten von *T β H^{nM18}*-Mutanten im Verhältnis zu Kontrolltieren, kann daher nicht nur auf das Fehlen von Oktopamin zurückgeführt werden, sondern auch durch erhöhten Tyramin-Level hervorgerufen werden (Scholz, 2005). Daher kann der Verlust der Ethanolpräferenz in der Fliege auch durch den Anstieg von Tyramin zustande kommen.

T β H^{nM18}-Mutanten weisen Defekte in der Lokomotion auf. Sie zeigen eine reduzierte Fluginitiation und Aufrechterhaltung des Fluges, auch laufen sie langsamer als Kontrolltiere (Brembs *et al.*, 2007). Ebenfalls zeigen *T β H^{nM18}*-Fliegen nach der Gabe von Ethanol keine Hyperaktivität, sondern eine Repression. Dennoch laufen sie insgesamt mehr als die Kontrollfliegen (Scholz, 2005). Daher spielt die Lokomotion für den gezeigten Defekt keine Rolle. Ebenfalls können *T β H^{nM18}*-Fliegen Ethanol von Wasser unterscheiden (Abbildung 3.2) und damit Ethanol als Duftstimulus wahrnehmen.

Wird der Lernindex für appetitives Lernen (Schwärzel *et al.*, 2003) mit dem Präferenzindex von wildtypischen Fliegen verglichen, zeigt sich, dass beide einen ähnlichen Wert aufweisen. Um generell appetitives Lernen hervorzurufen, braucht die Fliege die Motivation Zucker zu sich zu nehmen (Colomb *et al.*, 2009). Zusätzlich muss die Aufnahme des Zuckers durch das

oktopaminerge Neurotransmittersystem als positiv eingestuft werden (Schwärzel *et al.*, 2003). Weiterhin muss bei der Ethanolpräferenz der Duft von Saft mit Ethanol als positiv eingeschätzt und damit eine innere Motivation erzeugt werden, sich für diesen Duft zu entscheiden. Somit können die fehlende Ethanolpräferenz und der Defekt im appetitiven Lernen, auf fehlende Motivation zurückgeführt werden, einen gegebenen Stimulus als positiv einzuschätzen. Für diese Motivation muss T β H in der adulten Fliege vorhanden sein (Abbildung 3.8). Werden die TDC-positiven Neurone in der adulten Fliege mit Hilfe von Kir2.1 ausgeschaltet, so zeigen diese keine Ethanolpräferenz mehr.

Auch in anderen Insekten, wie beispielsweise in der Honigbiene, vermittelt Oktopamin die Zuckerbelohnung im appetitiven, duftabhängigen Lernen. Dies konnte anhand eines Interneurons, dem VUMmx1 Neuron gezeigt werden, welches nachdem ein Duft mit Zucker gepaart wurde, auf diesen Duft antwortete (Hammer, 1993; Hammer und Menzel, 1998). Der Antennallobus ist das erste Duftneuropil, welches die Duftinformation in den Pilzkörper weiterleitet (Stocker, 1994), daher ist es nicht verwunderlich, dass eine Applikation von Oktopamin in die Calyces des Pilzkörpers oder in den Antennallobus anstelle einer Zuckerapplikation ausreicht, um die Biene auf den Duft zu konditionieren (Hammer und Menzel, 1998). Auch konnte gezeigt werden, dass wenn im Gehirn der Honigbiene durch einen Oktopamin-Antagonisten die Oktopaminrezeptoren blockiert wurden, die olfaktorische Erfassung des Duftes und der Abruf gestört waren, jedoch nicht die Duftunterscheidung selbst (Farooqui *et al.*, 2003). Damit ist Oktopamin für die Mechanismen, die die Belohnung vermitteln notwendig (Hammer und Menzel, 1998; Farooqui *et al.*, 2003) und kann daher auch in der Ethanolpräferenz dazu dienen, den Duft von Saft mit Ethanol als positiv einzuschätzen. Ebenfalls könnten die Antennalloben, als Verarbeitungszentrum des Duftstimulus (Stocker, 1994) eine Rolle in der Ethanolpräferenz aufweisen.

Möglicherweise gibt die Identifikation von T β H-positiven Neurone, die für die Vermittlung von Ethanolpräferenz wichtig sind, Hinweise, welche Gehirnregionen miteinander interagieren müssen, damit eine Fliege Präferenz zeigen kann. Bisher konnten neuroanatomische Studien bestimmte T β H-positive Cluster im larvalen und adulten Gehirn von *Drosophila* identifizieren. Im wildtypischen adulten Gehirn sind durchschnittlich 97 T β H-positive Neurone vorhanden. Diese Anzahl an T β H-positiven Neuronen stimmt in etwa mit den von Vollbach (2010) gefundenen 80 T β H-positiven Neuronen überein. Die Varianz der Neurone ist vor allem auf die Varianz des Clusters PB1 zurückzuführen. Die Charakterisierung der GAL4-Expressionsdomänen von *dTdc2-GAL4* zeigte, dass bei Vollbach (2010) 69 Neurone GFP-positiv waren, hingegen konnten hier 78 GFP-positive Neurone identifiziert werden. Dies steht im Gegensatz zu den von Busch *et al.* (2009) veröffentlichten 137 GFP-positiven Neuronen. Jedoch ist auch hier die Varianz v.a. auf den PB1-Cluster zurückzuführen. Busch

et al. (2009) konnte in diesem Cluster 65 GFP-positive Neurone lokalisieren, während in dieser Arbeit nur durchschnittlich 22 Neurone GFP-positiv waren.

Anhand von immunhistochemischen Färbungen gegen Oktopamin konnten ca. 61 Oktopamin-immunreaktive Neurone in Fliegen der *dTdc2*-GAL4-Linie gefunden werden. Diese Neurone befinden sich in den Clustern VM, AL2, VL und ASM. Jedoch sind nur die Cluster AL2 und VM zu 100 % Oktopamin-immunreaktiv (Busch *et al.*, 2009). Die Cluster AL2 und VM konnten hier ebenfalls als GFP-positiv identifiziert werden. Mithilfe der α -T β H-Immunfärbung konnte eine Überlappung von GFP- und T β H-positiven Neuronen in den Clustern AL2 und VM gefunden werden. Anhand der GFP-Expression in den Neuronen ist ersichtlich, dass die Neurone in den Clustern AL2 und VM den von Busch *et al.* (2009) beschriebenen Oktopamin-immunreaktiven Neuronen entsprechen. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass das Enzym T β H für die Oktopaminsynthese notwendig ist (Monastirioti *et al.*, 1996; Roeder, 2005). Jedoch wurden bei Busch *et al.* (2009) Oktopamin-immunreaktive Neurone in dem ASM- und VL-Cluster gefunden, die nicht T β H-positiv waren.

Die Expression von T β H in den tyraminerger/oktopaminerger Neuronen der *dTdc2*-GAL4-Treiberlinie reicht aus, um die Präferenz in den *T β H^{MM18}*-Fliegen wieder herzustellen. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn alle TDC-positiven und cholinergen Neurone mithilfe von GAL80 ausgeschaltet werden. Hier werden durchschnittlich 33 GFP-positive Neurone gefunden, wobei gegenüber Fliegen der Linie *dTdc2*-GAL4 vor allem die Anzahl der Neurone innerhalb der Clustern AL2 und VMlb stark reduziert sind. Eine Colokalisation von T β H-positiven und GFP-positiven Neuronen ist wie von Zhou *et al.* (2008) beschrieben, nur noch im AL2- und VM-Cluster zu finden. Zhou *et al.* (2008) identifiziert eine Untergruppe von ca. fünf oktopaminerger Neuronen im subösophagialen Ganglion (SOG), die für die Ausbildung von Aggression in *Drosophila* wichtig sind. Jedoch wird nicht deutlich, welches der drei VM-Cluster identifiziert worden ist. In dieser Arbeit konnten in Fliegen der *dTdc2*-GAL4; *Cha*GAL80-Treiberlinie 16 T β H- und GFP-positive Neurone in den Clustern AL2 und VM identifiziert werden. Jeweils fünf T β H- und GFP-positive Neurone liegen in den Clustern VMmd und VMmx vor und zwei Neurone im VMlb-Cluster. Insgesamt, ist jedoch ersichtlich, dass diese 16 Neurone nicht notwendig sind, um die Ethanolpräferenz auszubilden und damit bleiben 22 Neurone übrig, die für die Ethanolpräferenz notwendig sind.

Werden die GAL4-Expressionsdomänen der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten GAL4-Treiberlinien verglichen, so fällt auf, dass nur zwei Cluster im Gehirn von *Drosophila* für die Vermittlung der Präferenz verantwortlich sind (Tabelle 3.2). Das sind zum einen der Cluster AL2 und zum anderen der VM-Cluster. Neuronen des AL2-Clusters projizieren ipsilateral und bilateral in die optischen Loben. Hingegen projizieren die Neurone des VM-Clusters zur posterior-ventralen Gegend der Ösophagusöffnung. Von dort aus verzweigen

sich die Neuriten und innervieren das subösophageale oder das supraösophageale Ganglion und das thorakal-abdominale Ganglion. Außerdem werden die Antennalloben und der Pilzkörper von einzelnen Neuronen innerviert (Busch *et al.*, 2009), welche wichtige Verschaltungszentralen bzw. Verarbeitungszentralen für olfaktorische Informationen darstellen (Stocker, 1994).

Die ventralen ungepaarten mediale (VUM) und gepaarte mediale Neurone (VPM) im SOG-Cluster stellen eine besondere Klasse an Neuronen dar. Diese Neurone kommen ebenfalls in *Locusta migratoria* und in *Apis mellifera* vor und sind Oktopamin-immunreaktiv. Sie projizieren in alle Gehirnneuropile, wie den Pilzkörper, die Antennalloben, den dorsalen Loben und den Zentralkomplex (Bräuning, 1991; Kreissl *et al.*, 1994; Stevenson und Spörhase-Eichmann, 1995; Bräuning und Burrows, 2004; Schröter *et al.*, 2007) und sind daher ein guter Ansatzpunkt, um Ethanolpräferenz auszubilden, da diese über einen Duftstimulus vermittelt wird. Hiermit ist es jedoch unwahrscheinlich, dass die Präferenz vom AL2-Cluster vermittelt wird, da dieser in die optischen Loben projiziert (Busch *et al.*, 2009). In anderen Insekten, wie der Grille und der Heuschrecke kommt ebenfalls ein Oktopamin-immunreaktives Zellcluster vor, die dem AL2-Cluster entspricht. Die Neurone projizieren ebenfalls ipsilateral und contra-lateral in die optischen Loben (Spörhase-Eichmann *et al.*, 1992; Konings *et al.*, 1988; Stevenson und Spörhase-Eichmann, 1995). Anhand von elektrophysiologischen Messungen konnte gezeigt werden, dass diese Neurone durch Licht angeregt werden können und daher scheinen sie eine Rolle in der Verarbeitung der optischen Information zu spielen (Stevenson und Spörhase-Eichmann, 1995) und keine Rolle in der Verarbeitung von Düften. Um jedoch den AL2-Cluster ausschließen zu können, wäre es sinnvoll die beiden GAL4-Treiberlinien *Mai301* und *Sep54* auf ihre Ethanolpräferenz hin zu untersuchen und evtl. nach weiteren GAL4-Treiberlinien zu suchen, die keine GAL4-Expressionsdomänen im AL2-Cluster besitzen.

Das maxillare VUMmx1 der Honigbiene *Apis mellifera* zeigt nach der Stimulation mit Zucker ein bestimmtes Erregungsmuster (Hammer, 1993) (Abbildung 3.31). Dieses Neuron innerviert Gehirnneuropile, die für die Duftverarbeitung wichtig sind, wie die Glomeruli der Antennalloben, das laterale Protocerebrum und die Calyces der Pilzkörper (Hammer, 1993). Eine elektrische Stimulation des VUMmx1 Neurons kann das Zucker-Belohnungssignal im assoziativen olfaktorischen Lernen ersetzen. Dieses spezifische Hammer-Aktivierungsmuster sollte daher für VUM Neurone spezifisch sein und wurde deshalb für die Aktivierung der *dTdc2*-GAL4-abhängigen Neurone in den optogenetischen Versuchen (Kapitel 3.4) verwendet.

Bislang konnte gezeigt werden, dass blaues Licht in Larven die den Kationenkanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) in *dTdc2*-GAL4-positiven Neuronen exprimieren, appetitives

Gedächtnis hervorrufen kann. Hierfür wurde der belohnende Zuckerstimulus für einen Duft durch blaues Licht ersetzt (Schroll *et al.*, 2006). Die Expression von ChR2 in olfaktorischen Neuronen führt in Larven bei blauem und bei weißem Licht zu einem induzierbaren Vermeidungsverhalten (Bellmann *et al.*, 2010). Dies ist im Einklang mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen, in denen blaues Licht und weißes Licht ebenfalls in adulten Fliegen, die ChR2 exprimieren, eine Verhaltensänderung hervorrufen kann (Abbildung 3.32 und 3.33). Diese Verhaltensänderung ist unabhängig davon, ob die Fliegen durch das blaue Licht einen visuellen Reiz bekommen (Abbildung 3.37).

Anhand von Messungen von exzitatorischen Übergangspotenzialen in Motorneuronen konnte gezeigt werden, dass die Aktionspotenziale der Neurone in den ersten 30 s stark abnehmen. Dies ist sowohl der Fall, wenn konstant leuchtendes Licht, als auch pulsierendes Licht als Anregung verwendet wird. Anschließend können durch das pulsierende Licht weitere Aktionspotenziale ausgelöst werden. Hingegen kann durch das konstant leuchtende Licht zwar eine Depolarisation des Neurons gemessen werden, diese reichte jedoch nicht mehr aus, um ein Aktionspotenzial zu generieren (Pulver *et al.*, 2009). Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, dass Fliegen blaues pulsierendes Licht mit dem Hammer-Aktivierungsmuster gegenüber dem konstant leuchtenden Licht bevorzugen und sie sich nicht zwischen den beiden pulsierenden Lichtern entscheiden konnten (Abbildung 3.34). Die Entscheidung der Fliegen für konstant leuchtendes blaues Licht statt des pulsierenden gelben Lichts (Abbildung 3.35) kann evtl. durch die natürliche Präferenz für blaues Licht der Fliegen erklärt werden (Suh *et al.*, 2004).

Die Präferenz der Fliegen könnte aufgrund der Aktivierung TDC-abhängiger Neurone mit Hilfe von Blaulicht hervorgerufen werden oder durch eine gesteigerte Hyperaktivität. Dies könnte getestet werden, indem ChR2 in *TH-GAL4*-abhängigen Neuronen mit blauem Licht aktiviert wird und damit eine Aktivierung in dopaminergen Neuronen hervorgerufen wird. Denn in Fliegen, in denen Dopamin unter einem hitzeinduzierbaren Ionenkanal eingebracht wurde, konnte durch Änderungen der Temperatur ein Anstieg der Lokomotion hervorgerufen werden (Kong *et al.*, 2010b).

4.2 Ethanolpräferenz wird durch einen olfaktorischen Stimulus hervorgerufen

Es konnte gezeigt werden, dass Or83b-Fliegen keine durch Duft hervorgerufenen Potenziale in Elektroantennogrammen oder Verhaltensantworten aufweisen (Larsson *et al.*, 2004). Fliegen, in denen der universelle Corezeptor Or83b fehlt, zeigen keine Präferenz für fünf

Prozent Ethanol (Abbildungen 3.42 und 3.43). Das bedeutet, dass die Ethanolpräferenz auf einen olfaktorischen Einfluss zurückgeführt werden kann. Devineni und Heberlein konnten bei Fliegen mit abgeschnittenen Antennen und Fliegen mit defekten Duftrezeptorneurone eine verringerte Präferenz für die Aufnahme von ethanolhaltigem Futter zeigen. Des Weiteren verwenden Devineni und Heberlein *white rabbit*-Mutanten, die von Ethanolduft abgestoßen werden. Diese Fliegen zeigen keine Präferenz für den Duft von Ethanol, jedoch eine Präferenz Ethanol zu konsumieren. Damit kommen Devineni und Heberlein zu dem Schluss, dass eine olfaktorische Anziehung für die Ausbildung von Ethanolpräferenz nicht notwendig ist (Devineni und Heberlein, 2009). Zusammengefasst sagen die Versuche jedoch aus, dass die Ethanolpräferenz nicht mit der Präferenz Ethanol zu sich zu nehmen gleichzusetzen ist.

Or83b-Fliegen können eine Präferenz für die Düfte von Ethanol und von Saft ausbilden (Abbildung 3.45). Dies deutet darauf hin, dass die Or83b-Mutanten insgesamt Präferenz ausbilden können und damit kein Defekt in der Fähigkeit eine Entscheidung zu treffen vorliegt. Von Kong *et al.* (2010a) konnte gezeigt werden, dass Or83b-Fliegen eine normale Ethanol-induzierte Startantwort zeigen können. Dies zeigt, dass Or83b-Fliegen Ethanol an sich wahrnehmen können. Dies steht im Gegensatz zu dem Ergebnis des CAFE (Capillary Feeder) Assays von Ja *et al.* In diesem Assay wird der Konsum von 1 %, 10 % und 50 % Ethanol verdünnt in Wasser getestet und die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Fliegen Ethanol nicht wahrnehmen können und damit purer Ethanol für Fliegen nicht attraktiv ist, sondern erst durch die Zugabe von Futter attraktiv wird (Ja *et al.*, 2007).

Eine weitere Möglichkeit, warum $w^{1118};Or83b^1$ -Fliegen keine Ethanolpräferenz zeigen ist, dass sie komplexe Düfte nicht unterscheiden können. Verschiedene *Drosophila*-Arten ziehen Duftgemische den Einzelduftkomponenten vor (Barrows, 1907; West, 1961; Zhu *et al.*, 2003). Deswegen wurde in dieser Arbeit Saft mit Ethanol und ohne Ethanol gegen fünf Prozent Ethanol verdünnt in Wasser getestet. Damit ist auf der einen Seite ein „einfacher“ Duft und auf der anderen Seite ein „komplexer“ Duft gegeben. Durch die Zugabe von Ethanol wird dem Saft eine weitere Komponente hinzugefügt und somit dessen Duft komplexer. Kontrollfliegen sind in der Lage diese beiden Wahlmöglichkeiten zu unterscheiden und entscheiden sich, wie bei Zhu *et al.* (2003), für das komplexere Duftgemisch, also Saft mit Ethanol. Die $w^{1118};Or83b^1$ -Mutanten hingegen können den an sich komplexen Duft des Saftes und den noch komplexeren Duft von Saft mit Ethanol nicht auseinanderhalten und damit die Komplexität der Wahlmöglichkeiten nicht erfassen (Abbildungen 3.47). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Versuche mit Essigsäure anstatt Ethanol durchgeführt.

Neben Ethanol werden bei der Fermentation auch Essigsäure, Ethylacetat und Acetaldehyd produziert. Diese sind entweder als Einzelkomponente oder als Duftgemische für einige

Drosophila-Arten attraktiv (Barrows, 1907; West, 1961; Zhu *et al.*, 2003). Auch konnte gezeigt werden, dass Essigsäure für Schmetterlinge attraktiv wirkt (Dierks und Fischer, 2008). Essigsäure ruft bei 0,125 % in einem Olfaktometer Präferenz hervor (Fuyama, 1976) und weibliche *Drosophila* legen ihre Eier vermehrt auf Substrate mit fünf Prozent Essigsäure ab (Joseph *et al.*, 2009). In einem Assay, der die Reaktionen der Fliegen auf einen gegebenen Duft misst, konnte zum einen bei fünf Prozent Essigsäure die stärkste Reaktion gemessen werden (Barrows, 1907). Jedoch wird in einem Fallenversuch fünf Prozent Essigsäureduft als aversiv eingestuft und 0,4 % als attraktiv (Reed, 1938).

Das Duftsysteem verwendet ein kombinatorisches Schema, um die Rezeptoren zu codieren und damit die Duftintensitäten zu verschlüsseln. Veränderungen in der Duftkonzentration können den „Code“ verändern und damit die Duftqualität (Malnic *et al.*, 1999). Hierdurch könnte also auch das Verhalten verändert werden. Normalerweise sind Düfte in geringen Konzentrationen attraktiv und werden mit höherer Konzentration weniger attraktiv bzw. aversiv. Diese Umschaltung von attraktiv zu aversiv muss nicht bedeuten, dass die Fliege den Duft anders wahrnimmt, sondern nur in einer anderen Intensität (Devaud, 2003). Bis zu einer Konzentration von 1,25 % zeigen Or83b-Mutanten keine Präferenz für Essigsäure. Dies stimmt mit der Theorie überein, dass Or83b-Mutanten keine komplexen Düfte unterscheiden und damit keine Präferenz für diese ausbilden können. Für 1,25 % und zwei Prozent jedoch zeigen $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen eine Essigsäure-Präferenz, während in den Kontrollfliegen die Präferenz bei zwei Prozent bereits rückläufig ist. Damit ist in den $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen die Kurve hin zu höheren Konzentrationen verschoben, jedoch zeigen $w^{1118}; Or83b^2$ -Fliegen ein hiervon abweichendes Verhalten und zeigen bei zwei Prozent ebenfalls keine Präferenz. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Or83b-Mutanten eine Entscheidung treffen und auch eine Präferenz ausbilden können. Ab fünf Prozent Essigsäure setzt sowohl in den Kontrollfliegen als auch bei den Or83b-Mutanten die Aversion ein, wobei diese in den Mutanten reduziert ist. Anscheinend wird die Aversion durch einen anderen Mechanismus, abweichend von der Präferenz vermittelt, da sowohl Ethanol als auch Essigsäure bei hohen Konzentrationen in Or83b-Mutanten eine Aversion auslösen können (siehe hierzu auch Kapitel 4.3). Um jedoch sicher zu stellen, dass Or83b-Fliegen Essigsäure wahrnehmen können, müsste 0,125 % Essigsäure gegen Wasser getestet werden.

An der Konzentration, bei der die Kurve in die Aversion übergeht, muss eine Umbewertung oder Neubewertung der sensorischen Eingänge stattfinden. Für Ethanol findet diese Neubewertung in wildtypischen Fliegen bei 10%igem Ethanol statt (Ogueta *et al.*, 2010). Dies kann bedeuten, dass die Umbewertung bei w^{1118} - und $w^{1118}; Or83b^1$ -Fliegen bei dieser Konzentration von Ethanol gleich ist und bei Essigsäure bei zwei Prozent liegt. Um dies zu testen, müsste eine Konzentrationsreihe mit Ethanol von fünf bis zehn Prozent in Einprozentschritten durchgeführt werden. Hierdurch könnte auch herausgefunden werden,

ob eine andere bislang noch nicht getestete Konzentration eine Präferenz hervorrufen kann. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zum ersten die Präferenz eine Erkennung und Bewertung eines komplexen Duftes voraussetzt. Zum zweiten wurde in dieser Arbeit bewiesen, dass die als anosmisch beschriebenen Or83b-Mutanten, in der Lage sind, Ethanol, Essigsäure und Saft zu erkennen und auf diese Düfte zu reagieren. Damit ist drittens bewiesen, dass der ubiquitär exprimierte Corezeptor Or83b nicht an der Erkennung von allen Futterdüften beteiligt ist (Review Kaupp, 2010). Dies würde mit der *in vitro* Studie von Sakurai *et al.*, Wetzel *et al.*, und Neuhaus *et al.*, übereinstimmen, dass ein Homomer von einem ligandenspezifischen Duftrezeptor für die Dufterkennung ausreicht (Wetzel *et al.*, 2001; Sakurai *et al.*, 2004; Neuhaus *et al.*, 2005). Or83b ist in ungefähr 70 % aller olfaktorischen Neuronen exprimiert. Damit bleiben noch 30 % olfaktorischer Neurone übrig, in denen Or83b nicht als Corezeptor benötigt wird (Benton *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2008). Da Or83b-Mutanten eine normale Ethanol-induzierte Startantwort zeigen, könnten diese nicht Or83b-abhängigen Rezeptoren an der Ethanolwahrnehmung beteiligt sein (Kong *et al.*, 2010a). Auch könnte zum vierten die erst kürzlich entdeckte dritte Klasse von Rezeptoren, die ionotropen Rezeptoren, die bei der Duftwahrnehmung eine Rolle spielen, involviert sein. Die ionotropen Rezeptoren werden bis auf eine Ausnahme nicht mit den Duftrezeptoren und Or83b coexprimiert (Benton *et al.*, 2009; Couto *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005). Damit sollten diese in den Or83b-Mutanten nicht betroffen und voll funktionstüchtig sein. Die ionotropen Rezeptoren erkennen Ammoniak, Amine, Feuchtigkeit und Alkohole (Benton *et al.*, 2009; Yao, *et al.*, 2005) und stellen damit mögliche Kandidaten dar. Hierdurch ergeben sich zwei Hypothesen. Zum einen könnten die ionotropen Rezeptoren nur für die Aversion zuständig sein, da diese in den Mutanten nicht oder nur leicht verändert ist und keinen Einfluss auf die Präferenz ausüben. Dies könnte durch Ausschalten der ionotropen Rezeptoren und das Testen auf die Aversion hin überprüft werden. Zum anderen könnten die ionotropen Rezeptoren die in dieser Arbeit angebotenen Düfte unabhängig von Or83b wahrnehmen, aber nur durch eine zusätzliche Information die von Or83b abhängigen Rezeptoren, verschaltet werden. Dies würde eine Erklärung liefern, weshalb die Konzentrationskurve für Essigsäure zu höheren Konzentrationen hin verschoben ist. Fehlt die von Or83b-abhängige Information über den angebotenen Duft, kommt es zunächst zu keiner Informationsverschaltung. Wird der Duft jedoch in höherer Konzentration angeboten, kann er evtl. durch ligandenspezifische Homomere unspezifisch gebunden werden oder das verstärkte Signal reicht nun aus, um eine Verhaltensantwort auszulösen bzw. andere Rezeptoren zu rekrutieren (Kreher *et al.*, 2008; Malnic *et al.*, 1999). Die Verarbeitung der Information könnte bereits in den Glomeruli der Antennalloben stattfinden, den primären Verschaltungseinheiten bei der Duftwahrnehmung oder in den höheren Gehirnregionen, wie dem Pilzkörper oder dem lateralen Horn (Stocker *et al.*, 1983). Der Pilzkörper ist beim

olfaktorischen Lernen involviert, während das laterale Horn eine Rolle bei der angeborenen Duf terkennung spielt (Heisenberg *et al.*, 1985; de Belle und Heisenberg, 1994; Connolly *et al.*, 1994; Heisenberg, 2003). Semmelhack und Wang (2009) konnten bereits zeigen, dass die Attraktivität von Apfelweinessig hauptsächlich von zwei Glomeruli abhängt und die Aversion gegenüber hohen Konzentrationen von Apfelweinessig durch einen weiteren Glomerulus vermittelt wird.

Das Duftbindungsprotein LUSH weist *in vitro* eine Ethanolbindungsstelle auf (Kruse *et al.*, 2003; Thode *et al.*, 2008). *Lush*-Mutanten weisen einen Defekt in der Vermeidung hoher Alkoholkonzentrationen auf. In dem von Kim *et al.* (1998) verwendeten Duft-Fallen-Assay wurde der Duft in Agar-gebunden angeboten und die Fliegen wurden über 60 - 85 Stunden in diesem Assay getestet. Ein Defekt in der Vermeidung hoher Alkoholkonzentrationen konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Das unterschiedliche Verhalten der *lush*-Mutanten im Ethanolpräferenz-Assay und dem Duft-Fallen-Assay kann darauf beruhen, dass die Assays unterschiedliches Verhalten messen. Im Präferenz-Assay steht den Fliegen ein weiteres Gefäß zur Auswahl, während im Duft-Fallen-Assay von Kim *et al.* (1998) nur eine Falle mit Duft angeboten wird. In einem T-Maze-Assay konnten Wang *et al.* (2001) zeigen, dass *lush*-Mutanten keine veränderte Verhaltensweise gegenüber Ethanol aufweisen. Zhou *et al.* hingegen schreiben die Aversion der *lush*-Mutante gegenüber hohen Alkoholkonzentrationen den in den Plastikgefäßen vorkommenden Weichmachern zu und konnten sogar eine Präferenz für 50 % Ethanol zeigen (Zhou *et al.*, 2004). Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen. Zum einen zeigen die *lush*-Mutanten eine Präferenz für fünf Prozent Ethanol (Abbildung 3.40) als auch eine Aversion gegenüber 23 % Ethanol (Abbildung 3.38). Falls sich in den hier verwendeten Plastikgefäßen Weichmacher durch die Zugabe von Ethanol lösen sollten, so haben diese nur einen geringen Einfluss auf das Verhalten (Abbildung 3.41). Die vermeintliche Alkoholbindungsstelle in LUSH ist *in vitro* vorhanden (Kruse *et al.*, 2003; Bucci *et al.*, 2006; Thode *et al.*, 2008), jedoch ist LUSH nicht notwendig um Ethanol zu erkennen, da auch ohne LUSH eine Verhaltensantwort hervorgerufen werden konnte (Wang *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Duftbindungsprotein LUSH eher spezifisch für das Sexpheromon 11-cis Vacenylazetat ist, wie von Xu *et al.* (2005) beschrieben wurde. Dass ein Duftrezeptor spezifisch für ein Sexpheromon ist, konnte auch anhand des BmOR-1-Rezeptors des Seidenspinners gezeigt werden, der spezifisch für Bombykol ist (Sakurai *et al.*, 2004).

Um eine weitere sensorische Modalität zu überprüfen, wurden Fliegen verwendet, bei denen der Geschmackssinn nicht vorhanden sein sollte, jedoch keine Defekte in Gehirn vorliegen sollten (W. Boll, persönliche Kommunikation). Devineni und Heberlein (2009) konnten bereits

mit Hilfe des Rüsselreflexes zeigen, dass der Geschmack von Ethanol für Fliegen nicht attraktiv ist. Die von Ihnen getesteten *poxn*-Mutanten zeigten eine zur Kontrolle vergleichbare Präferenz ethanolhaltiges Futter zu sich zu nehmen und die Autoren folgerten, dass der gustatorische Input keine große inhibitorische Rolle bei der Präferenz spielt. Dies konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden, da sich zwar die *poxn*-Mutanten tendenziell für den Ethanol entschieden haben, aber eine große Varianz in den Daten herrscht, so dass keine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

Anhand des Schmeck-Tests konnte gezeigt werden, dass *SuperA 158*-Fliegen eine normale Schmeckfähigkeit aufweist, diese in $\Delta SfoBs$ 127- und $\Delta SfoBs$ 105-Mutanten reduziert, aber nicht komplett ausgeschaltet ist (Abbildung 3.51 und 3.52). Durch das Laufen auf dem zuckerhaltigen Substrat sollten die an den Tarsen befindlichen Rezeptoren den Zucker erkennen und die Fliegen sollten das Substrat zu sich nehmen (Falk und Atida, 1975). Jedoch besteht die Möglichkeit, dass durch den Schmeck-Test andere chemosensorischen Borsten angesprochen werden, als im Präferenz-Assay. Im Präferenz-Assay könnte das Ethanol als gasförmige Partikel an den Proboscis oder an den Flügelrändern (Stocker, 1994) anheften und hierdurch eine Verhaltensantwort auslösen. Denn nicht nur die Geschmacksqualität, sondern auch wo der Geschmack wahrgenommen wird, ist für die Antwort entscheidend (Vosshall und Stocker, 2007). Jedoch sollten auch diese chemosensorischen Borsten in mechanosensorische Borsten in den $\Delta SfoBs$ 127- und $\Delta SfoBs$ 105-Mutanten umgewandelt sein und auch mit diesen kein Geschmack wahrgenommen werden können (W. Boll, persönliche Kommunikation).

Außerdem scheinen die $\Delta SfoBs$ 127- oder $\Delta SfoBs$ 105-Fliegen eine oder mehrere Veränderungen in ihrem Genom, wie *Second side* Mutationen oder *Modifier*, zu haben, da sich die beiden Mutanten in ihrem Verhalten unterscheiden. Heterozygote *SuperA 158/ΔSfoBs* 127-Fliegen zeigen eine übermäßig starke Präferenz und auch eine besonders starke Aversion (Abbildung 3.52). Dies konnte bei *SuperA 158/ΔSfoBs* 105-Fliegen nicht beobachtet werden. Eine ebenfalls erhöhte Ethanolpräferenz zeigten heterozygote *w¹¹¹⁸;; Or83b^{1/4}*-Fliegen (Abbildung 3.42). Das deutet darauf hin, dass sich eine 50%ige Reduktion des Genprodukts anders als der komplette Verlust des Genprodukts bei gustatorischen und olfaktorischen Modalitäten auswirkt. Dies ist ebenso an der dosisabhängigen Antwort des Or83b-Corezeptors zu erkennen.

Die hier durchgeführten Vorversuche mit ALDH Mutanten und anhand des Verhaltens der ADH-Mutanten (Ogueta *et al.*, 2010) kann ein Einfluss des Alkoholmetabolismus auf die Ethanolpräferenz bestätigt werden. Fehlt das Enzym Alkoholdehydrogenase, so zeigen die Fliegen keine Ethanolpräferenz (Ogueta *et al.*, 2010), denn hierdurch würde sich der toxische Metabolit Acetaldehyd anreichern (David *et al.*, 1984). Eine Anreicherung von

Acetaldehyd ist für Fliegen ohne Alkoholdehydrogenase tödlich, da dieses in adulten Fliegen über die ALDH abgebaut wird (Leal und Barbancho, 1992; Fry und Saweikis, 2006). Daher ist es evolutionär sinnvoll, dass Fliegen ohne ALDH keine Ethanolpräferenz ausbilden. Um dies jedoch bekräftigen zu können, müsste die Datenerhebung für die ALDH-Mutanten fortgesetzt werden und homozygote *17 H*-ALDH-Mutanten müssten auf ihre Präferenz für fünf Prozent Ethanol getestet werden. Zeigen diese Mutanten keine Präferenz, so kann das Fehlen der Präferenz auf die Anreicherung des Acetaldehyds zurückgeführt werden.

4.3 Hohe Ethanolkonzentrationen wirken aversiv

Or83b-, LUSH- und *poxn*-Mutanten zeigen vergleichbar zu den Kontrollfliegen eine Aversion gegenüber 23 % Ethanol, wie sie in Ogueta *et al.* (2010) beschrieben wurde. Diese Aversion gegen 23 % Ethanol steht im Gegensatz zu Ergebnissen des CAFE-Assays. In diesem zeigen Fliegen eine Präferenz, hohe Ethanolkonzentrationen von 10 % bis hin zu 25 % Ethanol vom ersten Tag an zu konsumieren. Diese Präferenz steigert sich im Laufe der nächsten fünf Tage (Ja *et al.*, 2007; Devineni und Heberlein, 2009). Diese Präferenz für Ethanol bietet den Fliegen möglicherweise einen metabolischen Vorteil, da durch das zugesetzte Ethanol mehr Kalorien aufgenommen werden (Ja *et al.*, 2007). Dies steht im Gegensatz zu Devineni und Heberlein, die den Kalorienquotienten ausgeglichen haben und feststellen konnten, dass die Ethanolpräferenz nicht von den zusätzlichen Kalorien abhängt (Devineni und Heberlein, 2009).

Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Versuchen mit 23 % Ethanol und Ogueta *et al.* (2010) können Devineni und Heberlein (2009) bei *poxn*-Mutanten und Kontrollfliegen eine Ethanolpräferenz bei 15 % Ethanol erkennen (Devineni und Heberlein, 2009). Dies kann auf die verschiedenen Versuchsansätze zurückgeführt werden. In dieser Arbeit und bei Ogueta *et al.* (2010) wird ein Fallenassay verwendet, der die Wahlmöglichkeit zwischen zwei Gefäßen bietet. Bei Devineni und Heberlein (2009) und Ja *et al.* (2007) wird der Konsum von ethanolhaltiger Flüssigkeit gemessen. Jedoch konnten Devineni und Heberlein in einem anderen Fallen-Assay eine Ethanolpräferenz für 15 % Ethanol finden. Messungen der Ethanolkonzentration in den Fliegen zeigten, dass Fliegen eine so hohe Konzentration zu sich genommen hatten, die das Verhalten beeinflussen (Devineni und Heberlein, 2009). In der Natur kommen eher geringe Ethanolkonzentrationen bis zu fünf Prozent Alkohol vor (Gibson und Oakeshott, 1981). Daher ist es unwahrscheinlich, dass Fliegen Konzentrationen von 15 % bis hin zu 25 % als attraktiv einstufen, wenn die Kalorien des Ethanols nicht ausschlaggebend sind und sie durch die Aufnahme dieser hohen Konzentrationen ihr Körpergleichgewicht verlieren (Devineni und Heberlein, 2009). Wird das Verhalten von

Fliegen im Olfaktometer gemessen, so zeigt sich eine konzentrationsabhängige Veränderung. Die höchste Präferenz liegt zwischen 8 % und 16 % danach fällt die Kurve steil ab und es kommt zu einer Aversion bei höheren Konzentrationen (Fuyama, 1976). Hoffmann und Parson konnten bei ihren Messungen im Olfaktometer zeigen, dass nur geringe Ethanolkonzentrationen attraktiv sind (0,1 % bis 5 %) und bereits 10 % nicht mehr attraktiv wirkt (Hoffmann und Parson, 1984). Diese Ergebnisse bestätigen die in dieser Arbeit gefundene Aversion gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen. Jedoch bestätigen frühere Arbeiten, die die Attraktivität von Ethanolduft gemessen haben, dass *Drosophila melanogaster* Konzentrationen von 10 bis 15 % Ethanol bevorzugen (Reed, 1938).

Durch die in dieser Arbeit getesteten externen Stimuli konnte bewiesen werden, dass sowohl der Geruch als auch der Geschmack von Ethanol eine Aversion gegenüber 23 % Ethanol hervorrufen. Es scheint sogar, dass das Fehlen von LUSH und *poxn* die Aversion verstärken. Dies würde mit der Theorie übereinstimmen, dass eine Steigerung eines Duftes ausreicht, um eine Verhaltensantwort auszulösen, andere Rezeptoren und/oder andere Glomeruli zu rekrutieren oder verschiedene Duftrezeptoren für die Wahrnehmung von verschiedenen Konzentrationen verantwortlich sind (Kreher *et al.*, 2008; Malnic *et al.*, 1999; Semmelhack und Wang, 2009).

Anhang

Tabellen	117
Ansteuerungsgerät des Lichtversuchs - Außenmaße	127
Ansteuerungsgerät des Lichtversuches - Schaltplan	128
Datenblatt des Gelbfilters	129
Datenblatt der blauen Diode	130
Datenblatt der weißen Dioden	130

Tabellen

Hat TβH einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz?

Tabelle 3: Einfluss der w^{1118} Mutation

Genotyp	a	p-Wert 1 zu 2	p-Wert 2 zu 3
1) w^+	0,001	0,039	
2) $w^+ T\beta H^{nM18}$	1,000	0,039	
3) w^{1118}	0,007		0,007
4) $w^{1118} T\beta H^{nM18}$	0,647		0,007

Tabelle 4: Präferenz zwischen Ethanol in Wasser und Wasser

Genotyp	a	p-Wert
1) w^{1118}	0,000	0,012
2) $w^{1118} T\beta H^{nM18}$	0,021	0,012

Tabelle 5: Der Verlust von Präferenz in der $w^{1118} T\beta H^{nM18}$ Mutante kann durch die Expression von UAS-TβH unter Kontrolle von dTdc2-GAL4 wieder hergestellt werden

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3	p-Wert 4	p-Wert 5
1) $w^{1118}; dTdc2-GAL4$	0,000	-	0,998	0,005	0,071	1,000
2) $w^{1118} UAS-T\beta H$	0,031	0,998	-	0,001	0,019	0,989
3) $w^{1118} T\beta H^{nM18}; dTdc2-GAL4$	1,000	0,005	0,001	-		
4) $w^{1118} T\beta H^{nM18}, UAS-T\beta H$	1,000	0,071	0,019	0,926	-	0,110
5) $w^{1118} T\beta H^{nM18} UAS-T\beta H; dTdc2-GAL4$	0,015	1,000	0,989	0,009	0,110	-

Tabelle 6: Expression von TβH mit Hilfe der Feb15-GAL4 Treiberlinie in $w^{1118} T\beta H^{nM18}$ Mutanten stellt die Ethanolpräferenz wieder her

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) $w^{1118}; Feb15-GAL4$	0,000	-	0,035	0,456
2) $w^{1118} T\beta H^{nM18}; Feb15-GAL4$	0,080	0,035	-	0,001
3) $w^{1118} T\beta H^{nM18} UAS-T\beta H; Feb15-GAL4$	0,000	0,456	0,001	-

Tabelle 7: Expression von *UAS-TβH* mit Hilfe der *6.2_2TβH-GAL4* Treiberlinie in w^{1118} *TβH^{nM18}* Mutanten kann die Ethanolpräferenz nicht wieder herstellen

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) $w^{1118};6.2_2TβH-GAL4$	0,002	-	0,045	0,237
2) $w^{1118} TβH^{nM18};6.2_2TβH-GAL4$	0,845	0,045	-	0,631
3) $w^{1118} TβH^{nM18} UAS-TβH;6.2_2TβH-GAL4$	0,090	0,237	0,631	-

Tabelle 8: Expression von *UAS-TβH* mit Hilfe der *dTdc2-GAL4*; *ChaGAL80* Treiberlinie in w^{1118} *TβH^{nM18}* Mutanten kann die Ethanolpräferenz nicht wieder herstellen

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) $w^{1118}; dTdc2-GAL4; Cha3.3kb-GAL80$	0,000	-	0,000	0,046
2) $w^{1118}; TβH^{nM18}; dTdc2-GAL4; Cha3.3kb-GAL80$	0,189	0,000	-	0,135
3) $w^{1118} TβH^{nM18} UAS-TβH; dTdc2-GAL4; Cha3.3kb-GAL80$	0,424	0,046	0,135	-

Tabelle 9: Die P-Elementinsertion der *NP7088* Linie hat einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) $w^{1118};NP7088$	0,000	-	0,348	0,270
2) $w^{1118} TβH^{nM18}; NP7088$	0,034	0,348	-	0,984
3) $w^{1118} TβH^{nM18} UAS-TβH; NP7088$	0,041	0,270	0,984	-

Tabelle 10: 3 Ist TβH in der Larve oder im adulten Tier notwendig für Ethanolpräferenz- Vergleich der Genotypen mit Hitzeschock

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/ dTdc2-GAL4;UAS-Kir2.1$ mit Hitzeschock	0,832	-	0,181	0,041
2) $w^{1118}; tubP-GAL80^{ts}/ +;UAS-Kir2.1$ mit Hitzeschock	0,013	0,181	-	0,554
3) $w^{1118} tubP-GAL80^{ts}/ +;UAS-mCD8::GFP$ mit Hitzeschock	0,013	0,554	0,041	-

Tabelle 11: Ist TβH in der Larve oder im adulten Tier notwendig für Ethanolpräferenz- Vergleich der Genotypen ohne Hitzeschock

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) $w^{1118}; tubP-GAL80^{TS}/ dTdc2-GAL4; UAS-Kir2.1$	0,004	-	0,727	0,570
2) $w^{1118}; tubP-GAL80^{TS}/ +; UAS-Kir2.1$	0,076	0,727	-	0,920
3) $w^{1118} tubP-GAL80^{TS}/ +; UAS-mCD8::GFP$	0,791	0,570	0,920	-

Tabelle 12: Test der einzelnen Genotypen mit und ohne Hitzeschock

Genotyp	a	Ttest
1) $w^{1118}; tubP-GAL80^{TS}/ dTdc2-GAL4; UAS-Kir2.1$	0,004	0,033
2) $w^{1118}; tubP-GAL80^{TS}/ dTdc2-GAL4; UAS-Kir2.1$ mit Hitzeschock	0,832	0,033
3) $w^{1118}; tubP-GAL80^{TS}/ +; UAS-Kir2.1$	0,076	0,565
4) $w^{1118}; tubP-GAL80^{TS}/ +; UAS-Kir2.1$ mit Hitzeschock	0,013	0,565
5) $w^{1118} tubP-GAL80^{TS}/ +; UAS-mCD8::GFP$	0,791	0,174
6) $w^{1118} tubP-GAL80^{TS}/ +; UAS-mCD8::GFP$ mit Hitzeschock	0,013	0,174

Ist die Aktivierung von Neuronen mit Hilfe von optogenetischen Methoden für Ethanolpräferenz ausreichend?

Tabelle 13: Vergleich warm weiße und kalt weiße Dioden

Genotyp	a	p-Wert
1) $UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2$	0,006	0,004
2) $UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2$ mit Retinal	0,146	0,004

Tabelle 14: Test von gelbem und blauem Licht mit spezifischem Hammer- Aktivierungsmuster

Genotyp	a	p-Wert
1) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i>	0,362	0,025
2) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i> mit Retinal	0,000	0,025

Tabelle 15: Test konstantes blaues Licht gegen blaues Licht mit spezifischem Hammer-Aktivierungsmuster

Genotyp	a	p-Wert
1) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i>	0,000	0,519
2) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i> mit Retinal	0,002	0,519

Tabelle 16: Test von blauem Licht mit 9 Hz gegen blaues Licht mit spezifischem Hammer-Aktivierungsmuster

Genotyp	a	p-Wert
1) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i>	0,115	0,872
2) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i> mit Retinal	0,503	0,872

Tabelle 17: Test von gelbem Licht mit spezifischem Hammer- Aktivierungsmuster gegen konstant leuchtendes blaues Licht

Genotyp	a	p-Wert
1) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i>	0,021	0,899
2) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i> mit Retinal	0,004	0,899

Tabelle 18: Test von konstantem, gelben Licht gegen konstantes, blaues Licht

Genotyp	a	p-Wert
1) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i>	0,267	0,507
2) <i>UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i> mit Retinal	1,000	0,507

Tabelle 19: Test von gelbem Licht mit spezifischem Hammer- Aktivierungsmuster gegen blaues Licht mit spezifischem Hammer- Aktivierungsmuster

Genotyp	a	p-Wert
1) <i>norpA⁻; UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2</i>	0,774	0,015
2) <i>norpA⁻; UAS-ChR2/dTdc2-GAL4; UAS-ChR2 mit Retinal</i>	0,039	0,015

Nehmen externe Stimuli Einfluss auf Ethanolpräferenz?

Tabelle 20: Präferenz von *w⁺; lush⁻* Fliegen für 5 %

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	1,000	-	0,002	0,207
2) <i>w⁻; ET249</i>	0,015	0,002	-	0,000
3) <i>w⁻; +; lush⁻</i>	0,064	0,207	0,000	-

Tabelle 21: Aversion von *w⁻; +; lush⁻* Fliegen gegen 23 %

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	0,000	-	0,011	0,002
2) <i>w⁻; ET249</i>	0,000	0,011	-	0,000
3) <i>w⁻; +; lush⁻</i>	0,000	0,002	0,000	-

Tabelle 22: Aversion gemessen in Glas von *w⁻; +; lush⁻* Fliegen

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	0,000	-	0,034	0,025
2) <i>w⁻; ET249</i>	0,000	0,034	-	0,000
3) <i>w⁻; +; lush⁻</i>	0,041	0,025	0,000	-

Tabelle 23: Präferenz für *w⁻; +; lush⁻* Fliegen und mit Rettungskonstrukt

Genotyp	a	p-Wert
1) <i>w⁻; +; lush⁻</i> Fliegen	0,004	0,485
2) <i>w⁻; Lush Rescue obp76a</i>	0,049	0,485

Tabelle 24: Ethanolpräferenz von Or83b für 5 % Ethanol

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3	p-Wert 4
1) w^{1118}	0,000	-	0,011	0,003	0,003
2) $w^{1118}; Or83b^1/+$	0,000	0,011	-	0,000	0,000
3) $w^{1118}; Or83b^1/Or83b^2$	0,888	0,003	0,000	-	0,976
4) $w^{1118}; Or83b^1$	1,0000	0,003	0,000	0,976	-

Tabelle 25: Aversion gegen 23 % Ethanol von Or83b

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3	p-Wert 4
1) w^{1118}	0,001	-	0,999	1,000	0,138
2) $w^{1118}; Or83b^1/+$	0,001	0,999	-	0,995	0,113
3) $w^{1118}; Or83b^1/Or83b^2$	0,001	1,000	0,995	-	0,168
4) $w^{1118}; Or83b^1$	0,001	0,138	0,113	0,168	-

Tabelle 26: Ethanolpräferenz von Or83b2 für 5 % Ethanol

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3	p-Wert 4
1) w^{1118}	0,000	-	0,459	0,000	0,000
2) $w^{1118}; Or83b^2/+$	0,003	0,459	-	0,016	0,017
3) $w^{1118}; Or83b^1/Or83b^2$	0,701	0,000	0,016	-	0,998
4) $w^{1118}; Or83b^2$	0,263	0,000	0,017	0,998	-

Tabelle 27: Aversion von Or83b2 gegenüber 23 % Ethanol

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) w^{1118}	0,000	-	0,967	0,440
2) $w^{1118}; Or83b^2/+$	0,000	0,967	-	0,343
3) $w^{1118}; Or83b^2$	0,000	0,440	0,343	-

Tabelle 28: Verdünnung des Kontrollsaftes mit Wasser

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3	p-Wert 4
1) w^{1118}	0,000	-	0,813	0,000	0,000
2) w^{1111} mit H ₂ O	0,000	0,813	-	0,000	0,000
3) $w^{1118}; Or83b^1$	0,041	0,000	0,000	-	1,000
4) $w^{1118}; Or83b^2$ mit H ₂ O	0,177	0,000	0,000	1,000	-

Tabelle 29: Wasser gegen Mangosaft

Genotyp	a	p-Wert
1) w^{1118}	0,000	2,66x 10⁻⁵
2) $w^{1118};; Or83b^1$	0,000	2,66x 10⁻⁵

Tabelle 30: Apfelsaft gegen Mangosaft

Genotyp	a	p-Wert
1) w^{1118}	0,000	0,027
2) $w^{1118};; Or83b^1$	0,003	0,027

Tabelle 31: Wasser gegen 5 % Ethanol in Wasser

Genotyp	a	p-Wert
1) w^{1118}	0,001	0,547
2) $w^{1118};; Or83b^1$	0,000	0,457

Tabelle 32: Saft mit und ohne Ethanol gegen Ethanol

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3	p-Wert 4
1) w^{1118}	0,000	-	0,032	0,037	0,039
2) w^{1118} mit Ethanol	0,000	0,032	-	0,000	0,000
3) $w^{1118};; Or83b^1$	0,000	0,037	0,000	-	1,000
4) $w^{1118};; Or83b^1$ mit Ethanol	0,000	0,039	0,000	1,000	-

Tabelle 33 Konzentrationskurve von Essigsäure

Genotyp	a	p-Wert
1) w^{1118}	0,804	0,867
2) $w^{1118};; Or83b^1$	0,804	0,867
3) w^{1118}	0,002	0,004
4) $w^{1118};; Or83b^1$	1,000	0,004
5) w^{1118}	0,000	0,026
6) $w^{1118};; Or83b^1$	0,043	0,026
7) w^{1118}	0,000	0,030
8) $w^{1118};; Or83b^1$	0,002	0,030
9) w^{1118}	0,238	0,024
10) $w^{1118};; Or83b^1$	1,000	0,024

11) w^{1118}	0,000	2,6E-5
12) $w^{1118};; Or83b^1$	0,008	2,6E-5
13) w^{1118}	0,001	2,6E-8
14) $w^{1118};; Or83b^1$	0,001	2,6E-8

Tabelle 34: Test für 2 % Essigsäure von Or83b Fliegen

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) w^{1118}	0,238	-	0,071	0,842
2) $w^{1118};; Or83b^1$	0,000	0,071	-	0,016
3) $w^{1118};; Or83b^2$	1,000	0,842	0,016	-

Tabelle 35: Test von 5 % Essigsäure von Or83b Fliegen

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) w^{1118}	0,000	-	0,000	0,000
2) $w^{1118};; Or83b^1$	0,002	0,000	-	0,706
3) $w^{1118};; Or83b^2$	0,000	0,000	0,706	-

Tabelle 36: Test von Saft gegen 10 % Ethanol von Or83b Fliegen

Genotyp	a	p-Wert
1) w^{1118}	0,011	0,670
2) $w^{1118};; Or83b^1$	0,377	0,670

Tabelle 37: Test von *poxn*-Mutanten für 5 % Ethanol

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) $w^+; SuperA 158$	0,002	-	0,999	0,614
2) $w^+; SuperA 158/\Delta SfoBs 105$	0,215	0,999	-	0,642
3) $w^+; \Delta SfoBs 105$	0,281	0,614	0,642	-

Tabelle 38: Test von *poxn*-Mutanten für 23 % Ethanol

Genotyp	a	p-Wert 1	p-Wert 2	p-Wert 3
1) $w^+; SuperA 158$	0,000	-	0,281	0,808
2) $w^+; SuperA 158/\Delta SfoBs 105$	0,000	0,281	-	0,080
3) $w^+; \Delta SfoBs 105$	0,000	0,808	0,080	-

Tabelle 39: Test von *poxn*-Mutanten für 5 % Ethanol

Genotyp	a	<i>p</i> -Wert 1	<i>p</i> -Wert 2	<i>p</i> -Wert 3
1) <i>w</i> ⁺ ; <i>SuperA 158</i>	0,017	-	0,062	0,305
2) <i>w</i> ⁺ ; <i>SuperA 158/ΔSfoBs 127</i>	0,000	0,062	-	0,000
3) <i>w</i> ⁺ ; <i>ΔSfoBs 127</i>	1,000	0,305	0,000	-

Tabelle 40: Test von *poxn*-Mutanten für 23 % Ethanol

Genotyp	a	<i>p</i> -Wert 1	<i>p</i> -Wert 2	<i>p</i> -Wert 3
1) <i>w</i> ⁺ ; <i>SuperA 158</i>	0,001	-	0,018	0,974
2) <i>w</i> ⁺ ; <i>SuperA 158/ΔSfoBs 127</i>	0,001	0,018	-	0,049
3) <i>w</i> ⁺ ; <i>ΔSfoBs 127</i>	0,004	0,974	0,049	-

Tabelle 41: Farben-Schmeck-Test: rot belohnt

Genotyp	<i>p</i> -Wert 1	<i>p</i> -Wert 2	<i>p</i> -Wert 3
1) <i>w</i> ⁺ ; <i>SuperA 158</i>	-	0,016	0,003
2) <i>w</i> ⁺ ; <i>ΔSfoBs 127</i>	0,016	-	0,682
3) <i>w</i> ⁺ ; <i>ΔSfoBs 105</i>	0,003	0,682	-

Tabelle 42: Farben-Schmeck-Test: blau belohnt

Genotyp	<i>p</i> -Wert 1	<i>p</i> -Wert 2	<i>p</i> -Wert 3
1) <i>w</i> ⁺ ; <i>SuperA 158</i>	-	0,000	0,000
2) <i>w</i> ⁺ ; <i>ΔSfoBs 127</i>	0,000	-	0,424
3) <i>w</i> ⁺ ; <i>ΔSfoBs 105</i>	0,000	0,424	-

Tabelle 43: Aufnahme von Farbe: rot

Genotyp	<i>p</i> -Wert 1	<i>p</i> -Wert 2	<i>p</i> -Wert 3
1) <i>w</i> ⁺ ; <i>SuperA 158</i>	-	0,061	0,002
2) <i>w</i> ⁺ ; <i>ΔSfoBs 127</i>	0,061	-	0,220
3) <i>w</i> ⁺ ; <i>ΔSfoBs 105</i>	0,002	0,220	-

Tabelle 44: Aufnahme von Farbe: blau

Genotyp	p -Wert 1	p -Wert 2	p -Wert 3
1) w^+ ; <i>SuperA 158</i>	-	0,001	0,000
2) w^+ ; Δ <i>SfoBs 127</i>	0,001	-	0,042
3) w^+ ; Δ <i>SfoBs 105</i>	0,000	0,042	-

Tabelle 45: Rot und blau mit Saccharoselösung

Genotyp	p -Wert 1	p -Wert 2	p -Wert 3
1) w^+ ; <i>SuperA 158</i>	-	0,710	0,719
2) w^+ ; Δ <i>SfoBs 127</i>	0,710	-	1,000
3) w^+ ; Δ <i>SfoBs 105</i>	0,719	1,000	-

Tabelle 46: Rot und blau ohne Saccharoselösung

Genotyp	p -Wert 1	p -Wert 2	p -Wert 3
1) w^+ ; <i>SuperA 158</i>	-	0,228	0,258
2) w^+ ; Δ <i>SfoBs 127</i>	0,228	-	0,997
3) w^+ ; Δ <i>SfoBs 105</i>	0,258	0,997	-

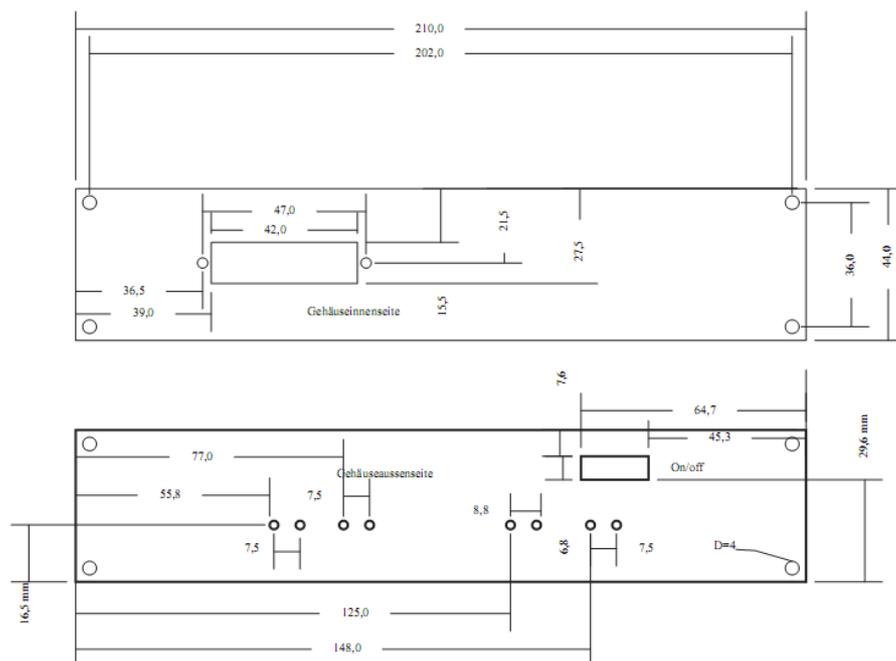
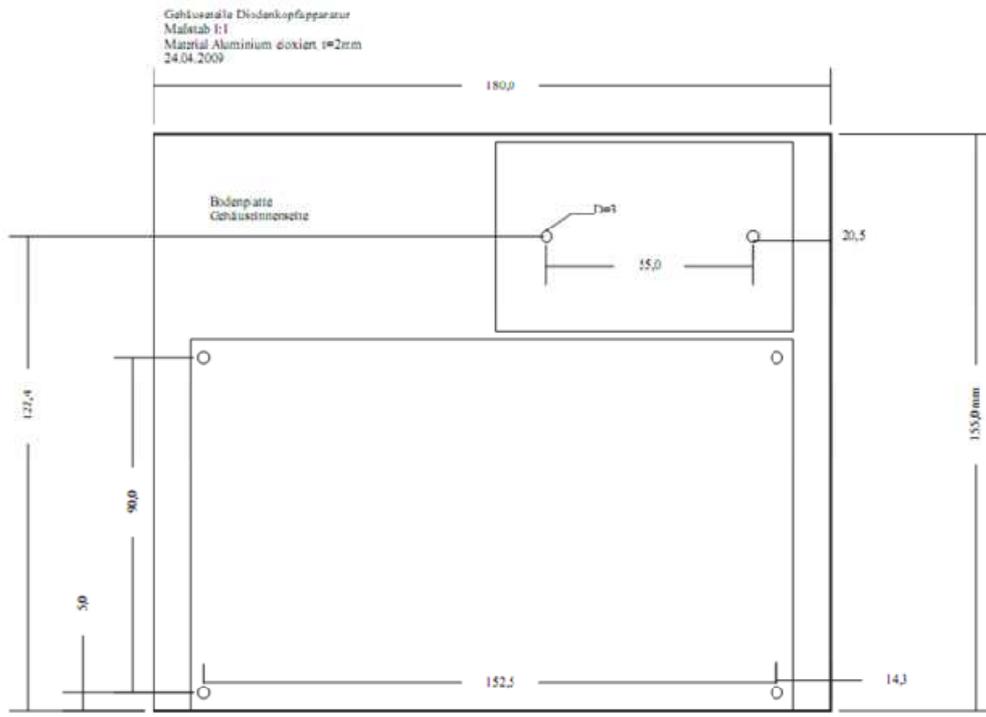
Tabelle 47: Test von *ALDH*-Mutanten für 5 % Ethanol

Genotyp	<i>a</i>	p -Wert 1	p -Wert 2	p -Wert 3
1) <i>14 B</i>	0,035	-	0,659	0,958
2) <i>14 B/Df</i>	0,003	0,659	-	0,496
3) <i>14 B/17 H</i>	0,017	0,958	0,496	-

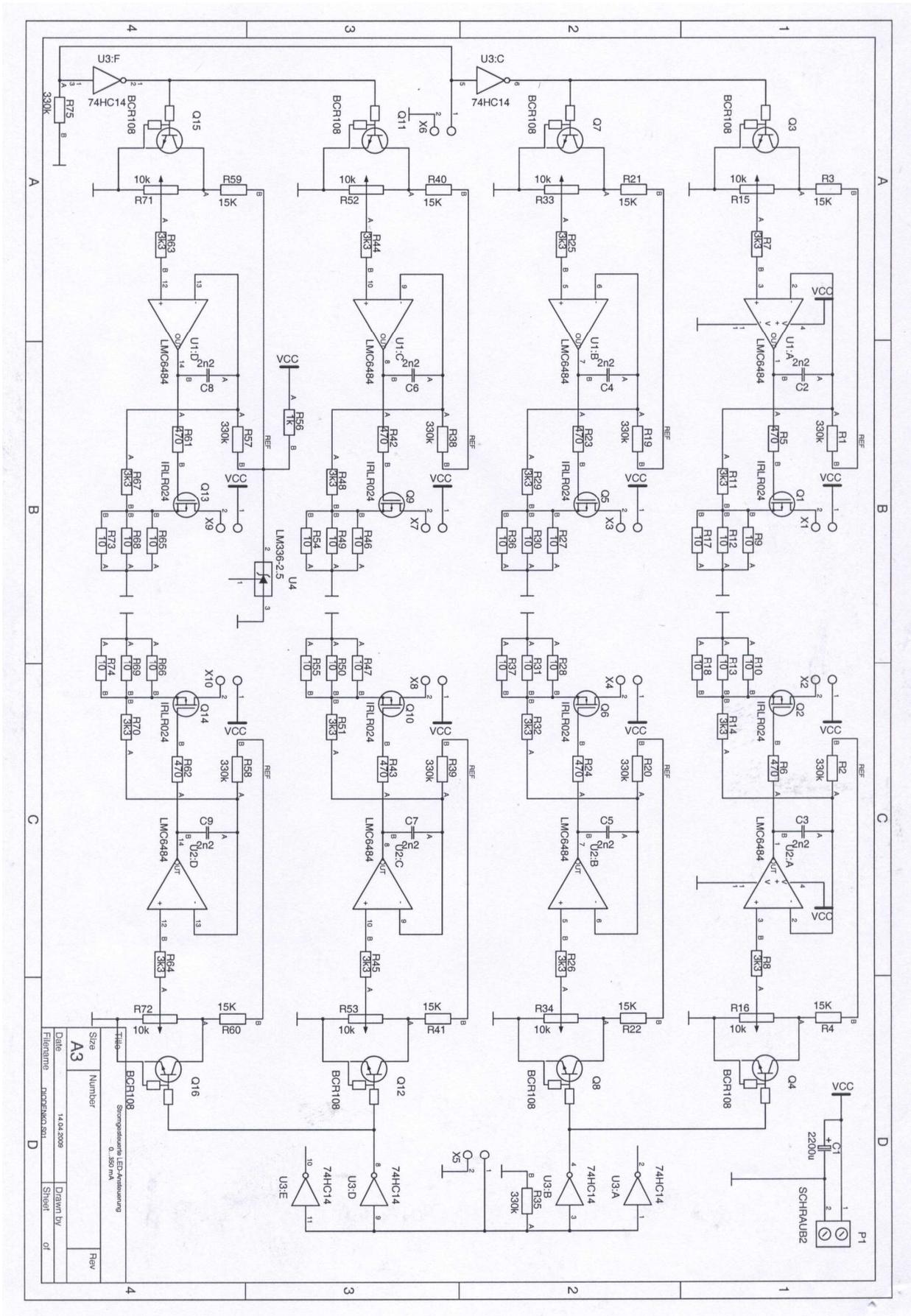
Tabelle 48: Test der zweiten *ALDH*-Mutante für 5 % Ethanol

Genotyp	<i>a</i>	p -Wert 1	p -Wert 2	p -Wert 3
1) <i>24 J</i>	0,541	-	0,999	0,932
2) <i>24 J/Df</i>	0,093	0,999	-	0,917
3) <i>24 J/14 B</i>	0,115	0,932	0,917	-

Gehäuseplan des Ansteuerungsgerätes



Schaltplan des Ansteuerungsgeräts



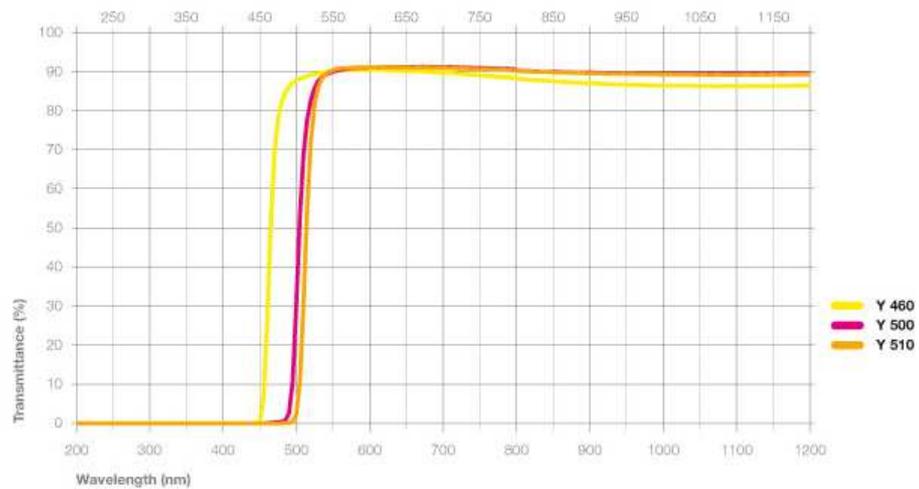
Datenblatt des Gelbfilters

YELLOW	HEBO	Schott	Hoya
	Y 460	≈ GG 455	≈ Y-46
	Y 500	≈ GG 495	≈ Y-50
	Y 510	≈ OG 515	

Yellow Glass Characteristic

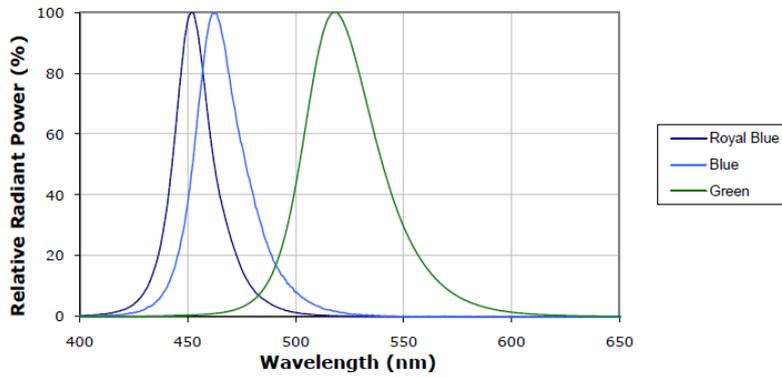
Type	Thickness (mm)	A [2856K]			D65			Chemical Stability		N _d	α × 10 ⁻⁷ (°C)	T ₀ (°C)	T _s (°C)	ρ (g/cm ³)
		x	y	Y	x	y	Y	Da	Dw					
Y 460	2	0.492	0.462	96.0	0.401	0.490	92.0	1	3	1.523	103	527	605	2.64
Y 500	2	0.502	0.468	94.5	0.422	0.514	89.6	1	3	1.523	103	527	605	2.64
Y 510	2	0.519	0.471	91.5	0.456	0.526	84.0	1	2	1.523	103	527	605	2.64

Type	Thickness (mm)	λ ₀ (nm)	λ _p (nm)	Tλ _p (%)	T _k (nm/°C)	Bubbles	Striae	Stress
Y 460	2	460 ± 10	560	≥ 89.5	≥ 0.8	C-B	3C	3
Y 500	2	500 ± 10	580	≥ 89.5	≥ 1.2	C-B	3C	3
Y 510	2	510 ± 10	600	≥ 89.5	≥ 1.2	C-B	3C	3



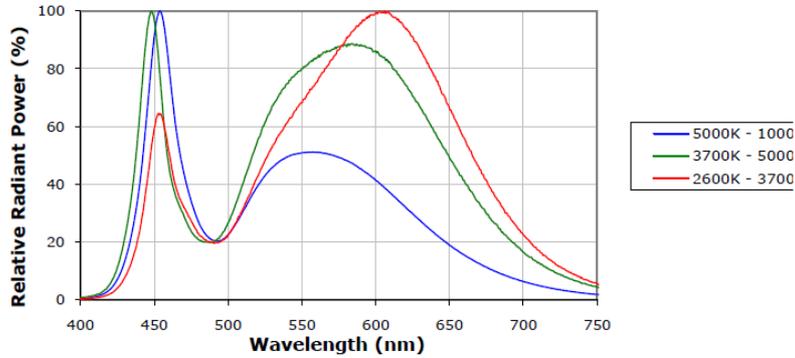
Diodendatenblätter

Blaue Diode



Color	Dominant Wavelength Range				Base Order Codes Min Luminous Flux (lm)		Order Code
	Min.		Max.		Group	Flux (lm)	
	Group	DWL (nm)	Group	DWL (nm)			
Blue	B3	465	B6	485	J	23.5	XREBLU-L1-0000-00J01
					K	30.6	XREBLU-L1-0000-00K01

Weißer Dioden



Color	CCT Range		Base Order Codes Min Luminous Flux (lm)		Order Code
	Min.	Max.	Group	Flux (lm)	
Cool White	5,000 K	10,000 K	P4	80.6	XREWHT-L1-0000-00901
			Q2	87.4	XREWHT-L1-0000-00A01
			Q3	93.9	XREWHT-L1-0000-00B01
			Q4	100	XREWHT-L1-0000-00C01
			Q5	107	XREWHT-L1-0000-00D01
Warm White	2,600 K	3,700 K	N3	56.8	XREWHT-L1-0000-005E7
			N4	62.0	XREWHT-L1-0000-006E7
			P2	67.2	XREWHT-L1-0000-007E7
			P3	73.9	XREWHT-L1-0000-008E7
			P4	80.6	XREWHT-L1-0000-009E7

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Alddehyddehydrogenase
ChR2	Channelrhodopsin-2
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gr	gustatorischer Rezeptor
Ir	ionotroper Rezeptor
Or	olfactory receptor, Duftrezeptor
<i>poxn</i>	<i>pox neuro</i>
TDC	Tyrosin-Decarboxylase
T β H	Tyramin- β -Hydroxylase
UAS	upstream activating sequence

Neuroanatomische Bezeichnungen

AL	Antennallobus
ASM	anterior superior median des Protocerebrums
eb	Ellipsoidkörper
fb	Fächerförmiger Körper
lat SOG	lateral des subösophagialen Ganglions
lb	labial
md	mandibular
MIL	mittig inferior lateral des Protocerebrums
MSM	mittig superior medial des Protocerebrums
mx	maxillar
oes	Ösophagus, Unterschlund
PB1 bzw. 2	Protocerebrale Brücke 1 bzw. 2
PI	Pars intercerebralis
PL	posterior lateral des Protocerebrums
PSL	posterior superior lateral des Protocerebrums

PSM	posterior superior median des Protocerebrums
SOG	subösophagiales Ganglion, Unterschlundganglion
VL	Ventro-lateral des Protocerebrums
VM-Cluster	ventrales Mittellinien-Cluster
VUM	ventrales ungepaartes mediales Neuron

Zusammenfassung

Präferenz bestimmt verschiedenen Verhaltensweisen, wie die Wahl zwischen verschiedenen Futterquellen oder Paarungspartner. Eine Chemikalie, die Präferenz auslöst ist Ethanol. Dieser führt Fliegen zu fermentierenden Früchten. Hierbei zeigen Fliegen eine dosisabhängige Ethanolpräferenz. Geringe Konzentrationen sind für *Drosophila melanogaster* attraktiv, während hohe Konzentrationen von 23 % Ethanol für sie aversiv sind (Ogueta *et al.*, 2010).

Um eine Präferenz ausbilden zu können, sind neuronale Grundlagen und Mechanismen notwendig. Eine neuronale Grundlage wird durch das tyraminerge/oktopaminerge Neurotransmittersystem vermittelt. *Tyramin- β -Hydroxylase*- Mutanten (T β H) können keine positiven Assoziationen zwischen einem angebotenen Duft und einer Belohnung herstellen (Schwärzel *et al.*, 2003). Da Präferenz eine positive Bewertung eines Stimulus darstellt, sollte der Einfluss von T β H auf die Ethanolpräferenz getestet werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die T β H^{M18}-Mutanten keine Präferenz für fünf Prozent Ethanol zeigen, da sie den gegebenen Duftstimulus zwar riechen, diesen aber nicht als positiv einstufen können. Dieser Phänotyp kann durch die Expression des *UAS-T β H* Transgens mithilfe zweier GAL4-Fliegenlinien - *dTdc2-GAL4* und *Feb15-GAL4* - gerettet werden. Eine immunhistochemische Untersuchung der GAL4-Expressionsdomänen verschiedener Fliegenlinien konnte zeigen, dass nur ca. 22 T β H-positiven Neurone in den Clustern AL2 und VM im Gehirn von *Drosophila melanogaster* für die Ethanolpräferenz notwendig sind. Durch neuronale Ausschaltung der *dTdc2-GAL4*-abhängigen Neurone in der adulten Fliege konnte die Präferenz aufgehoben werden. Das bedeutet, dass T β H in der Entscheidungssituation vorhanden sein muss, um eine Präferenz auszubilden. Ferner konnte durch die Aktivierung des Channelrhodopsins-2 mit blauem Licht in diesen *dTdc2-GAL4*-abhängigen Neurone in adulten Fliegen Präferenz ausgelöst werden. Diese Präferenz war unabhängig davon, ob die Fliegen durch das blaue Licht einen visuellen Reiz bekamen. Damit ist T β H notwendig und ausreichend um Ethanolpräferenz in adulten Fliegen zu vermitteln.

Or83b-Mutanten können keinen durch Duft hervorgerufenen Verhaltensantworten zeigen (Larsson *et al.*, 2004). Durch die Verwendung dieser olfaktorischen Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Ethanolpräferenz durch einen olfaktorischen Stimulus ausgelöst wird. Der *Or83b*-Rezeptor scheint eine wichtige Rolle für die Ethanolpräferenz zu spielen, jedoch nicht für die Aversion. Daher scheint es, dass die Ethanolpräferenz und die Aversion anderen mechanistischen Grundlagen unterliegen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die *Or83b*-Mutanten nicht anosmisch sind, sondern einen Defekt in der Unterscheidung komplexer Düfte aufweisen. Außerdem wird in *Or83b*-Mutanten der Duft an sich schwächer

wahrgenommen und daher eine Verhaltensantwort erst bei höheren Konzentrationen ausgelöst.

Des Weiteren sollten Mutanten für das Duftbindungsprotein LUSH untersucht werden, da diese hohe Ethanolkonzentrationen nicht vermeiden (Kim *et al.*, 1998). Diese *lush*-Mutanten zeigen eine Ethanolpräferenz und eine reduzierte Aversion für hohe Ethanolkonzentrationen. Damit hängt die Ethanolpräferenz und die Aversion nicht alleine von LUSH ab.

Um eine weitere sensorische Modalität zu überprüfen, wurden *pox neuro (poxn)*-Mutanten verwandt. In diesen Mutanten sind alle chemosensorische Borsten in mechanosensorische Borsten umgewandelt und sie können daher nicht mehr schmecken. Anhand dieser *poxn*-Mutanten konnte kein Einfluss des Geschmacks auf die Präferenz oder die Aversion gezeigt werden.

Bislang konnte ein Einfluss des Ethanolmetabolismus auf die Ethanolpräferenz aufgrund des Enzyms Alkoholdehydrogenase gezeigt werden (Ogueta *et al.*, 2010). Deswegen sollte das zweite Enzym im Alkoholmetabolismus, die Aldehyddehydrogenase (ALDH) untersucht werden. Mit Hilfe von ALDH-Mutanten sollte herausgefunden werden, ob die Anreicherung des Metaboliten Acetaldehyd einen Einfluss auf die Ethanolpräferenz hat. Vorversuche mit ALDH-Mutanten konnten einen Einfluss des Enzyms ALDH aufdecken. ALDH-Mutanten scheinen keine Ethanolpräferenz aufzuweisen. Dies kann wahrscheinlich auf die gesteigerte Konzentration des toxischen Abbauproduktes Acetaldehyd zurückgeführt werden.

Abstract

Preference guides an animal towards a food source or a mating partner. One example of a substance which influences preference is ethanol, which attracts insects to fermenting fruits. Here, adult flies show a dose dependent preference to ethanol-containing food sources. Flies are attracted to food sources containing low concentrations of ethanol, whereas those containing higher concentrations of ethanol (23%) cause aversion (Ogueta *et al.*, 2010).

Neuronal networks and mechanisms form the basis for ethanol preference and aversion. One such network is the tyraminerpic/octopaminergic neurotransmitter system. Mutants for the gene *Tyramine- β -hydroxylase* (*T β H*), the rate-limiting enzyme which converts tyramine to octopamine, fail to build positive associations between an odor stimulus and a reward (Schwärzel *et al.*, 2003). Since preference is a positive evaluation of a stimulus, the influence of T β H on preference was tested. Here, it could be shown that the *T β H*^{*nm18*} mutant is not able to show ethanol preference because the odor stimulus is not judged as positive even they can smell the odor. This phenotype could be rescued via the expression of the *T β H* transgene under the control of two GAL4 driver lines: *dTdc2-GAL4* and *Feb15-GAL4*, which drive transgene expression in different neurons. Immunohistochemical dissection of the GAL4 expressing domains revealed that approx. 22 T β H positive neurons in the clusters AL2 and VM in the brain of *Drosophila melanogaster* are important for mediating ethanol preference. When the expression of T β H was silenced in these neurons in adult flies, they were not able to show ethanol preference anymore. This shows that T β H has to be present in a particular set of neurons in order for flies to show ethanol preference. In addition we also showed that ethanol preference can be mediated via the activation of channelrhodopsin-2 via blue light in adult flies in *dTdc2-GAL4*-dependend neurons.

Next, the correlation between ethanol preference and an odor stimulus was further studied. For this purpose, *Or83b* mutants, which are not able to show odor mediated behaviors, were used (Larsson *et al.*, 2004). Using different olfactory mutants, it could be shown that ethanol preference is caused by an olfactory stimulus. The receptor Or83b seems to play an important role in ethanol preference, which is not observed for ethanol aversion. It would thus seem that ethanol preference and aversion are mediated by different mechanisms. It should also be noted that the *Or83b* mutant is able to smell, but shows defects in discriminating complex odors. *Or83b* mutants also have a weaker ability to perceive odors and therefore the behavioral answer is shifted to higher concentrations. Mutants of the odorant binding protein LUSH were also studied, as *lush* mutants show defects in avoidance of high ethanol concentrations (Kim *et al.*, 1998). Here, the *lush* mutants show normal ethanol preference

and a reduced aversion to high ethanol concentrations. This shows that the preference nor the aversion is only LUSH-dependend.

For another approach, *pox neuro (poxn)* mutants were used. These mutants are not able to taste, because their chemosensory bristles are converted to mechanosensory bristles. With the aid of these mutants it could be shown that taste has no influence on ethanol preference and aversion.

So far the influence of ethanol metabolism on ethanol preference could only be shown for the enzyme alcohol dehydrogenase (Ogueta *et al.*, 2010). Hence the second enzyme - aldehyde dehydrogenase (ALDH) - should also be examined. With the aid of *ALDH* mutants, the role of the enrichment of the metabolite acetaldehyde for ethanol preference could be examined. Preliminary experiments with *ALDH* mutants show that ALDH has an influence on preference. This is probably due to the higher concentration of acetaldehyde.

Literaturverzeichnis

- Ashburner**, M. (1998). Speculations on the subject of alcohol dehydrogenase and its properties in *Drosophila* and other flies. *Bioessays*, 20(11):949-54.
- Awasaki**, T. & Kimura, K. (1997). *pox-neuro* is required for development of chemosensory bristles in *Drosophila*. *J Neurobiol.* 32(7):707-21.
- Baines**, RA., Uhler, JP., Thompson, A., Sweeney, ST. & Bate, M. (2001). Altered electrical properties in *Drosophila*. Neurons developing without synaptic transmission. *The J of Neurosci.* 21(5): 1523-1531
- Barrows**, WM. (1907). Reaction of pomace fly, *Drosophila amepelophila* loew, to odorous substances. *J.Exp. Zool.* 4:515-540.
- Bellmann**, D., Richardt, A., Freyberger, R., Nuwal, N., Schwärzel, M., Fiala, A. & Störtkuhl, KF. (2010). Optogenetically induced olfactory stimulation in *Drosophila* larvae reveals the neuronal basis of odor-aversion behavior. *Front Behav Neurosci.* 4:27.
- Benton**, R., Sachse, S., Michnick, SW. & Vosshall, LB. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.* 4(2):e20.
- Benton**, R., Vannice, KS., Gomez-Diaz, C. & Vosshall, LB. (2009). Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell.* 136(1):149-62.
- Boll**, W. & Noll, M. (2002). The *Drosophila* *Pox neuro* gene: control of male courtship behavior and fertility as revealed by a complete dissection of all enhancers. *Development.* 129(24):5667-81.
- Bopp**, D., Jamet, E., Baumgartner, S., Burri, M. & Noll, M. (1989) Isolation of two tissue-specific *Drosophila* paired box genes, *Pox meso* and *Pox neuro*. *EMBO J.* 8(11):3447-57.
- Bräunig**, P. & Burrows, M. (2004). Projection patterns of posterior dorsal unpaired median neurones of the locust subesophageal ganglion. *J Comp Neurol* 478:164–175
- Bräunig**, P. (1991). Suboesophageal DUM neurones innervate the principal neuropiles of the locust brain. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 332:221–240
- Brembs**, B., Christiansen, F., Pflüger, HJ. & Duch, C. (2007). Flight initiation and maintenance deficits in flies with genetically altered biogenic amine levels. *J Neurosci.* 27(41):11122-31
- Bucci**, BK., Kruse, SW., Thode, AB., Alvarado, SM. & Jones, DN. (2006). Effect of n-alcohols on the structure and stability of the *Drosophila* odorant binding protein LUSH. *Biochemistry.* 45(6):1693-701.
- Busch**, S. & Tanimoto, H. (2010). Cellular configuration of single octopamine neurons in *Drosophila*. *J Comp Neurol.* 518(12):2355-64.
- Busch**, S., Selcho, M., Ito, K. & Tanimoto, H. (2009). A map of octopaminergic neurons in the *Drosophila* brain. *J Comp Neurol.* 513(6):643-67.

- Cadiou**, N., Cadiou, J., El Ghadraoui, L., Grimal, A. & Lamboeuf, Y. (1999). Conditioning to ethanol in the fruit fly-a study using an inhibitor of ADH. *J Insect Physiol.* 45(6):579-586.
- Certel**, SJ., Leung, A., Lin, CY., Perez, P., Chiang, AS. & Kravitz, EA. (2010). Octopamine neuromodulatory effects on a social behavior decision-making network in *Drosophila* males. *PLoS One.* 5(10):e13248
- Claridge-Chang**, A., Roorda, RD., Vrontou, E., Sjulson, L., Li, H., Hirsh, J. & Miesenböck, G. (2009). Writing memories with light-addressable reinforcement circuitry. *Cell.* 139(2):405-15.
- Cole**, SH., Carney, GE., McClung, CA., Willard, SS., Taylor, BJ. & Hirsh, J. (2005). Two functional but noncomplementing *Drosophila* tyrosine decarboxylase genes: distinct roles for neural tyramine and octopamine in female fertility. *J Biol Chem.*280(15):14948-55.
- Collier**, S & Gubb, D. (1997). *Drosophila* tissue polarity requires the cell-autonomous activity of the fuzzy gene, which encodes a novel transmembrane protein. *Development.* 124(20):4029-37.
- Colomb** ,J., Kaiser, L., Chabaud, MA. & Preat, T. (2009). Parametric and genetic analysis of *Drosophila* appetitive long-term memory and sugar motivation. *Genes Brain Behav.* 8(4):407-15.
- Connolly**, JB., Roberts, IJ., Armstrong, JD., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T. & O'Kane, CJ. (1996). Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies *Science* 274, 2104–2107.
- Couto**, A., Alenius, M. & Dickson, BJ. (2005). Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr Biol.* 15(17):1535-47.
- Dambly-Chaudière**, C., Jamet, E., Burri, M., Bopp, D., Basler, K., Hafen, E., Dumont, N., Spielmann, P., Ghysen, A. & Noll, M. (1992) The paired box gene *pox neuro*: a determinant of poly-innervated sense organs in *Drosophila*. *Cell.* 69(1):159-72.
- David**, JR., Daly,K, & Van Herrewege, J. (1984). Acetaldehyde utilization and toxicity in *Drosophila* adults lacking alcohol dehydrogenase or aldehyde oxidase. *Biochem Genet.* 22(11-12):1015-29.
- de Belle**, JS. & Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of MBs. *Science* 263, 692–695.
- Devaud**, JM. (2003). Experimental studies of adult *Drosophila* chemosensory behavior. *Behav Processes.* 64(2):177-196.
- Devineni**, AV. & Heberlein, U. (2009). Preferential ethanol consumption in *Drosophila* models features of addiction. *Curr Biol.*19(24):2126-32.
- Dierks**, A. & Fischer, K. (2008). Feeding responses and food preferences in the tropical, fruit-feeding butterfly, *Bicyclus anynana*. *J Insect Physiol.* 54(9):1363-70
- Dudley**, R. (2000). Evolutionary origins of human alcoholism in primate frugivory. *Q Rev Biol.* 75(1):3-15.

- Dudley, R.** (2002). Fermenting fruit and the historical ecology of ethanol ingestion: is alcoholism in modern humans an evolutionary hangover? *Addiction*. 97(4):381-8.
- Duffy, JB.** (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*.34(1-2):1-15
- Eisses, KT., Schoonen, WG., Aben, W., Scharloo, W. & Thörig, GE.** (1985). Dual function of the alcohol dehydrogenase of *Drosophila melanogaster*: ethanol and acetaldehyde oxidation by two allozymes ADH-71k and ADH-F. *Mol Gen Genet*. 199(1):76-81.
- Elmore, T., Ignell, R., Carlson, JR. & Smith, DP.** (2003). Targeted mutation of a *Drosophila* odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *J Neurosci*. 23(30):9906-12.
- Falk, R. & Atidia, J.** (1975). Mutation affecting taste perception in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 254(5498):325-6.
- Falk, R., Bleiser-Avivi, N., Atida, J.** (1976). Labellar taste organs of *Drosophila melanogaster*. *J Morphol*. 150:327-342
- Farooqui, T., Robinson, K., Vaessin, H. & Smith, BH.** (2003). Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J Neurosci*. 23(12):5370-80.
- Fry, JD. & Saweikis, M.** (2006) Aldehyde dehydrogenase is essential for both adult and larval ethanol resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res*. 87-92.
- Fry, JD., Bahnck, CM., Mikucki, M., Phadnis, N. & Slattery, W.** (2004). Dietary ethanol mediates selection on aldehyde dehydrogenase activity in *Drosophila melanogaster*. *Integr. Comp. Biol*. 44:275-283
- Fuyama, Y.** (1976). Behavior genetics of olfactory responses in *Drosophila*. I. Olfactometry and strain differences in *Drosophila melanogaster*. *Behav Gen* 6(4):407-420
- Geer, BW., Langevin, ML. & McKechnie, SW.** (1985). Dietary ethanol and lipid synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet*. 23(7-8):607-22.
- Gibson, JB. & Oakeshott, JG.** (1981). Genetics of biochemical and behavioural aspects of alcohol metabolism. *Aust N Z J Med*. 11(2):128-31.
- Gibson, JB., May, TW. & Wilks, AV.** (1981). Genetics variation at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster* in relation to environment variation. Ethanol levels in breeding sites and allozyme frequencies. *Oecologia* 51:191-198
- Hallem, EA., Dahanukar, A. & Carlson, JR.** (2006) Insect odor and taste receptors. *Annu Rev Entomol*. 51:113-35.
- Hammer, M.** (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366:59-63
- Hammer, M. & Menzel, R.** (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn Mem*. 5(1-2):146-56.

- Hampel, S.** (2007). Funktionelle Analyse des Einflusses von putativen TbH-positiven Neuronen auf das ethanolinduzierte Verhalten von *Drosophila melanogaster*. *Dissertation Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg*
- Hanesch, U.,** Fischbach, K-F. & Heisenberg, M. (1989). Neuronal achitecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tiss Res* 257:343-366
- Heinstra, PW.,** Eisses, KT., Schoonen, WG., Aben, W., Winter, AJ., Horst, DJ., Marrewijk, WJA., Beenackers, AMTh., Scharloo, W. & Thörig, GE. (1983). A dual function of alcohol dehydrogenase in *Drosophil*. *Genetica* 60(2), 129-137
- Heinstra, PW.,** Scharloo, W. & Thörig, GE. (1987). Physiological significance of the alcohol dehydrogenase polymorphism in larvae of *Drosophila*. *Genetics*. 117(1):75-84.
- Heisenberg, M.** (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci*.4(4):266-75.
- Heisenberg, M.,** Borst, A., Wagner, S. & Byers, D. (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J. Neurogenet.* 2, 1–30.
- Hill, CA.,** Fox, AN., Pitts, RJ., Kent, LB., Tan, PL., Chrystal, MA., Cravchik, A., Collins, FH., Robertson, HM. & Zwiebel, LJ. (2002). G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science*. 298(5591):176-8.
- Hoffmann, AA. &** Parsons, PA. (1984). Olfactory response and resource utilization in *Drosophila*: interspecific comparisons. *Biol J Linn Soc.* 22:43-53
- Hulme, AC.** (1970). The biochemistry of fruits and their products, Vol. 1, Academic Press, New York
- Hulme, AC.** (1971). The biochemistry of fruits and their products, Vol. 2, Academic Press, New York
- Imai, T.,** Sakano, H. & Vosshall, L. B. (2010). Topographic mapping--the olfactory system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(8):a001776.
- Ja, WW.,** Carvalho, GB., Mak, EM., de la Rosa, NN., Fang, AY., Liong, JC., Brummel, T. & Benzer, S. (2007). Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(20):8253-6.
- Johns, DC.,** Marx, R., Mains, RE., O'Rourke, B. & Marbán, E. (1999). Inducible genetic suppression of neuronal excitability. *The J of Neurosci.* 19(5): 1691-1697.
- Joseph, RM.,** Devineni, AV., King, IF. & Heberlein, U. (2009). Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(27):11352-7.
- Kaupp, UB.** (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci.* 11(3):188-200.
- Keene, AC.,** Stratmann, M., Keller, A., Perrat, PN., Vosshall, LB. & Waddell, S. (2004). Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. *Neuron*.44(3):521-33.

- Kiefer**, SW. & Dopp, JM. (1989). Taste reactivity to alcohol in rats. *Behav. Neurosci.* 103:1318-1326
- Kim**, MS., Repp, A. & Smith, DP. (1998) LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 150(2):711-21.
- Kong**, EC., Allouche, L., Chapot, PA., Vranizan, K., Moore, MS., Heberlein, U. & Wolf, FW. (2010a). Ethanol-regulated genes that contribute to ethanol sensitivity and rapid tolerance in *Drosophila*. *Alcohol Clin Exp Res.* 34(2):302-16.
- Kong**, EC., Woo, K., Li, J., Lebestky, T., Mayer, N., Sniffen, MR., Heberlein, UI, Bianton, RJ., Hirsh, J. & Wolf, FW. (2010b). A pair of dopamine neurons target the D1-like dopamine receptor DopR in the central complex to promote ethanol-stimulated locomotion in *Drosophila*. *PLoS One.* 5(4):e9954.
- Konings**, PN., Vullings, HG., Geffard, M., Buijs, RM., Diederer, JH. & Jansen, WF. (1988). Immunocytochemical demonstration of octopamine-immunoreactive cells in the nervous system of *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res.* 251(2):371-9.
- Kreher**, SA., Mathew, D., Kim, J. & Carlson, JR. (2008). Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron.* 59(1):110-24.
- Kreissl**, S., Eichmüller, S., Bicker, G., Rapus, J. & Eckert, M. (1994). Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee. *J Comp Neurol.* 348(4):583-95.
- Krieger**, J., Klink, O., Mohl, C., Raming, K. & Breer, H. (2003). A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 189(7):519-26.
- Kruse**, SW., Zhao, R., Smith, DP. & Jones, DN. (2003). Structure of a specific alcohol-binding site defined by the odorant binding protein LUSH from *Drosophila melanogaster*. *Nat Struct Biol.* 10(9):694-700.
- Kutsukake**, M., Komatsu, A., Yamamoto, D. & Ishiwa-Chigusa, S. (2000). A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Gene.* 245(1):31-42.
- Larsson**, MC., Domingos, AI., Jones, WD., Chiappe, ME., Amrein, H. & Vosshall, LB. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron.* 43(5):703-14.
- Leal**, JFM. & Barbancho, M. (1992). Acetaldehyd detoxification mechanisms in *Drosophila melanogaster* adults involving aldehyde dehydrogenase (ALDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) enzymes. *Insect Biochem Molec Biol.* 22:885-892
- Lee**, T., Lee, A. & Luo, L. (1999): Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126 (18): 4065-76
- Lietáert**, MC., Libion-Mannaert, M., Hougouto, N. & Elens, A. (1982). How can *Drosophila* flies without aldehyde oxidase detoxify acetaldehyde? *Experientia.* 38(6):651-2.

- Livingstone, MS.** & Tempel, BL. (1983). Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. *Nature*.303(5912):67-70.
- Malnic, B.,** Hirono, J., Sato, T. & Buck, LB. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*. 96(5):713-23.
- McClung, C.** & Hirsh, J. (1999). The trace amine tyramine is essential for sensitization to cocaine in *Drosophila*. *Curr Biol*. 9(16):853-60.
- McGuire, SE.,** Le, PT., Osborn, AJ., Matsumoto, K. & Davis, RL. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science*. 302(5651):1765-8.
- McKechnie, SW** & Morgan, P. (1982). Alcohol dehydrogenase polymorphism of *Drosophila melanogaster*. Aspects of alcohol and temperature variation in the larval environment. *Australian J of Biol Sci* 35(1) 85 - 94
- Monastiriotti, M.** (1999). Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech*. 45(2):106-21.
- Monastiriotti, M.** (2003). Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 2003 Dec 1;264(1):38-49.
- Monastiriotti, M.,** Gorczyca, M., Rapus, J., Eckert, M., White, K. & Budnik, V. (1995). Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*. 356(2):275-87.
- Monastiriotti, M.,** Linn, CE Jr. & White, K. (1996). Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J Neurosci*. 16(12):3900-11.
- Montooth, KL.,** Siebenthal, KT. & Clark, AG. (2006). Membrane lipid physiology and toxin catabolism underlie ethanol and acetic acid tolerance in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*. 209(Pt 19):3837-50.
- Nagel, G.,** Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. & Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*.100(24):13940-5.
- Neuhaus, EM.,** Gisselmann, G., Zhang, W., Dooley, R., Störtkuhl, K. & Hatt, H. (2005). Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci*. 8(1):15-7.
- Nuwal, N.** (2010): Optogenetic investigation of nervous system functions using walking behavior and genome wide transcript analysis of Synapsin and Sap47 mutants of *Drosophila*. *Dissertation Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg*
- Ogueta, M.,** Cibik, O., Eltrop, R., Schneider, A. & Scholz, H. (2010). The influence of Adh function on ethanol preference and tolerance in adult *Drosophila melanogaster*. *Chem Senses*. 35(9):813-22.
- Otsuna, H.** & Ito, K. (2006). Systematic analysis of the visual projection neurons of *Drosophila melanogaster*. I. Lobula-specific pathways *J Comp Neurol*. 497(6):928-58.

- Pak, WL.** (1979). Study of photoreceptor function using *Drosophila* mutants, in Neurogenetics: Genetic approaches to the nervous system, X.O. Breakfield, ed. New York: Elsevier-North Holland, pp. 67-99
- Pak, WL.** (1995). *Drosophila* in vision research. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36(12):2340-57
- Parsons, PA., Stanley, SM. & Spence, GE.** (1979). Environmental ethanol at low concentrations: Longevity and development in the sibling species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Australian J of Zool* 27(5) 747 - 754
- Pitts, RJ., Fox, AN. & Zwiebel, LJ.** (2004). A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(14):5058-63.
- Poeck, B., Triphan, T., Neuser, K. & Strauss, R.** (2008). Locomotor control by the central complex in *Drosophila*-An analysis of the tay bridge mutant. *Dev Neurobiol.* 68(8):1046-58.
- Pulver, SR., Pashkovski, SL., Hornstein, NJ., Garrity, PA., Griffith, LC.** (2009). Temporal dynamics of neuronal activation by Channelrhodopsin-2 and TRPA1 determine behavioral output in *Drosophila* larvae. *J Neurophysiol.* 101(6):3075-88.
- Ranger, CM., Reding, ME., Persad, AB. & Herms, DA.** (2010). Ability of stress-related volatiles to attract and induce attacks by *Xylosandrus germanus* and other ambrosia beetles. *Agric For Entomol.* 12:177-185
- Reed, MR.** (1938). The olfactory reaction of *Drosophila melanogaster* meigen to the products of fermenting banana. *Physiol. Zool.* 11:317-325
- Renn, SC., Armstrong, JD., Yang, M., Wang, Z., An, X., Kaiser, K. & Taghert, PH.** (1999). Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex. *J Neurobiol.* 41(2):189-207.
- Richmond, RC. & Gerking, JL.**(1979). Oviposition site preference in *Drosophila*. *Behav Genet.*9(3):233-41.
- Richter, CP. & Campbell, KH.** (1940). Alcohol taste thresholds and concentration of solution preferred by rats. *Science.* 91(2369):507-8.
- Roeder, T.** (1999). Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol.* 59(5):533-61.
- Roeder, T.** (2005). Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol.* 50:447-77.
- Sakurai, T., Nakagawa, T., Mitsuno, H., Mori, H., Endo, Y., Tanoue, S., Yasukochi, Y., Touhara, K. & Nishioka, T.** (2004). Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(47):16653-8.
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, LB. & Touhara, K.** (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature.* 452(7190):1002-6.

- Schneider, A.** (2008). Untersuchungen der neuronalen Plastizität in verschiedenen Verhaltensparadigmen und zum Beitrag des Ethanolstoffwechsels zur Alkoholpräferenz in *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg*
- Scholz, H.** (2005). Influence of the biogenic amine tyramine on ethanol-induced behaviors in *Drosophila*. *J Neurobiol.* 63(3):199-214
- Scholz, H., Ramond, J., Singh, CM. & Heberlein, U.** (2000). Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron.* 28(1):261-71.
- Schroll, C., Riemensperger, T., Bucher, D., Ehmer, J., Völler, T., Erbguth, K., Gerber, B., Hendel, T., Nagel, G., Buchner, E. & Fiala, A.** (2006). Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. *Curr Biol.* 16(17):1741-7.
- Schröter, U., Malun, D. & Menzel, R.** (2007). Innervation pattern of suboesophageal ventral unpaired median neurones in the honeybee brain. *Cell Tissue Res.* 327(3):647-67.
- Schwärzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S. & Heisenberg, M.** (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci.* 23(33):10495-502.
- Scinska, A., Koros, E., Habrat, B., Kukwa, A., Kostowski, W. & Bienkowski, P.** (2000). Bitter and sweet components of ethanol taste in humans. *Drug Alcohol Depend.* 60(2):199-206
- Semmelhack, JL. & Wang, JW.** (2009). Select *Drosophila* glomeruli mediate innate olfactory attraction and aversion. *Nature.* 459(7244):218-23.
- Siegmund, T. & Korge, G.** (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol.* 431(4):481-91.
- Sinakevitch, I. & Strausfeld, NJ.** (2006). Comparison of octopamine-like immunoreactivity in the brains of the fruit fly and blow fly. *J Comp Neurol.* 494(3):460-75.
- Singhal, N.** (2007). Evaluation of techniques to study feeding behavior in *Drosophila*. *Thesis im Rahmen der Promotionseignungsprüfung an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg*
- Spörhase-Eichmann, U., Vullings, HG., Buijs, RM., Hörner, M. & Schürmann, FW.** (1992). Octopamine-immunoreactive neurons in the central nervous system of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Cell Tissue Res.* 268(2):287-304.
- Steller, H. & Pirrotta, V.** (1986). P transposons controlled by the heat shock promoter. *Mol Cell Biol.* 6(5):1640-9.
- Stevenson, P. & Spörhase-Eichmann, U.** (1995). Localization of octopaminergic neurones in insects. *Comp Biochem Physiol [A]* 110:203–215
- Stevenson, PA. & Spörhase-Eichmann, U.** (1995). Localization of octopaminergic neurones in insects. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 110(3):203-15.
- Stocker, RF. & Schorderet M.** (1981). Cobalt filling of sensory projections from internal and external mouthparts in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.* 216(3):513-23.

- Stocker**, RF. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res.* 275(1):3-26.
- Stocker**, RF., Singhm RN., Schorderet, M. & Siddiqi, O. (1983). Projection patterns of different types of antennal sensilla in the antennal glomeruli of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 232(2):237-48.
- Suh**, GS., Wong, AM., Hergarden, AC., Wang, JW., Simon, AF., Benzer, S., Axel, R. & Anderson, DJ. (2004). A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature.* 431(7010):854-9.
- Thode**, AB., Kruse, SW., Nix, JC. & Jones, DN. (2008). The role of multiple hydrogen-bonding groups in specific alcohol binding sites in proteins: insights from structural studies of LUSH. *J Mol Biol.* 376(5):1360-76.
- Ueno**, K., Kohatsu, S., Clay, C., Forte, M., Isono, K. & Kidokoro, Y. (2006). Galpha is involved in sugar perception in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.* 26(23):6143-52.
- van der Zel**, A., Dadoo, R., Geer, BW. & Heinstra, PW. (1991). The involvement of catalase in alcohol metabolism in *Drosophila melanogaster* larvae. *Arch Biochem Biophys.* 287(1):121-7.
- Van Herrewege**, J. & David, JR. (1980). Alcohol tolerance and alcohol utilisation in *Drosophila*: partial independence of two adaptive traits. *Heredity.* 44(2):229-35.
- Van Herrewege**, J., David, JR. & Grandthan, R. (1980). Dietary utilization of aliphatic alcohols by *Drosophila*. *Experienta* 36:846-847
- Vollbach**, M. (2010). Morphologische Charakterisierung TßH exprimierender Neurone im Nervensystem von *Drosophila melanogaster*. *Bachelorarbeit an der Universität zu Köln.*
- Vömel**, M. & Wegener, C. (2008). Neuroarchitecture of aminergic systems in the larval ventral ganglion of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 3(3):e1848.
- Vosshall**, LB. & Stocker, RF. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci.* 30:505-33.
- Wang**, Y., Wright, NJ., Guo, H., Xie, Z., Svoboda, K., Malinow, R., Smith, DP. & Zhong, Y. (2001). Genetic manipulation of the odor-evoked distributed neural activity in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron.*29(1):267-76
- Weiner**, H. (1979). Acetaldehyde metabolism. In E. Majchrowicz and E.P.Noble (eds.), *Biochemistry and pharmacology of ethanol*, Vol. 1, pp. 125-144, Plenum, New York
- West**, AS. (1961). Chemicals attractants for adult *Drosophila* species. *J.Econ. Entomol.* 54(4):677-681
- Wetzel**, CH., Behrendt, HJ., Gisselmann, G., Störtkuhl, KF., Hovemann, B. & Hatt, H. (2001). Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous cell system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(16):9377-80.
- Xu**, P., Atkinson, R., Jones, DN. & Smith, DP. (2005). *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron.* 45(2):193-200.

- Yao, CA., Ignell, R. & Carlson, JR. (2005).** Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the *Drosophila* antenna. *J Neurosci.* 25(37):8359-67.
- Zhou, C., Rao, Y. & Rao, Y. (2008).** A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nat Neurosci.* 11(9):1059-67.
- Zhou, JJ., Zhang, GA., Huang, W., Birkett, MA., Field, LM., Pickett, JA. & Pelosi, P. (2004).** Revisiting the odorant-binding protein LUSH of *Drosophila melanogaster*: evidence for odour recognition and discrimination. *FEBS Lett.* 558(1-3):23-6.
- Zhu, J., Park, KC. & Baker, TC. (2003).** Identification of odors from overripe mango that attract vinegar flies, *Drosophila melanogaster*. *J Chem Ecol.* 29(4):899-909.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bedanken bei

- Frau Prof. Dr. Henrike Scholz bedanken für die Ermöglichung und die Korrektur dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Ansgar Büschges für die Übernahme der Zweitkorrektur, sowie für die Betreuung bei den Lichtexperimenten.
- Konrad Öchsner, Hans Kadaschabek und Andreas Eckart für die Mitentwicklung, den Bau und die Programmierung der Apparatur für die Lichtexperimente.
- Herrn Prof. Dr. James Fry, Herrn Prof. Dr. Markus Noll und Werner Boll für die Beretistellung von Fliegenstämmen und die hilfreichen Ratschläge.
- meiner Familie für ihre Unterstützung und für den regen Gedankenaustausch.
- Till Bockemühl, Oliver Hendrich, Li Ming Gooi und Alice Schubert für die Korrekturen und regen Diskussionen.
- allen anderen, die korrigiert haben, mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, mit mir über alles diskutiert haben und mich aufgebaut haben, wenn nichts gelaufen ist, wie geplant.

Alle Menschen sind klug - die einen vorher, die anderen nachher.

Voltaire

Erklärung

Erklärung gemäß §4 Abs. 1 Nr. 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln vom 2. Februar 2006.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Henrike Scholz betreut worden.

Andrea Schneider