

Different Subsets of Serotonergic Neurons Regulate Carbohydrate and Protein Intake and are Modulated by Insulin-like Signaling in *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln vorgelegt von Katharina Monika Sarah Kastenholz aus Köln

Köln, März 2019

Abstract

Serotonin fulfills multiple functions in the CNS – from innate olfactory processing, olfactory learning, and memory to drinking behavior and food intake. Here I further differentiate the subset-specific function of serotonin in the brain on balanced macronutrient intake.

I categorize the function of two subgroups of serotonergic neurons in feeding – one subset which promotes protein feeding, and one subset of only three serotonergic neurons which regulates sucrose and glucose appetite. I show that the modulatory effect of three serotonergic neurons is dependent on developmental timing since developmentally

enhanced 5-HT signaling negatively regulates carbohydrate appetite whereas temporary 5-HT signaling in the adult increases carbohydrate intake. Furthermore, I prove that this carbohydrate-regulatory subset is insulin-like signaling (InR) sensitive and that insulin-like signaling can modulate carbohydrate consumption via these neurons. As the underlying mechanism, I found that InR signaling in serotonergic neurons strongly affects serotonin transporter (Sert) membrane translocation in a cell-type specific manner. The membrane density of Sert affects the 5-HT maintenance in the synaptic cleft and therefore 5-HT signaling. Additionally, I found that the Sert3-Gal4 targeted serotonergic SE1 neuron targets IR60b taste neurons and modulates the sucrose and glucose taste perception via 5HT2B receptors.

I further analyzed the projection pattern of Insulin-Producing Cells (IPCs) and found that IPCs show active zones in the pars intercerebralis where they could serve as DILP release sites in the brain. Moreover, the IPC's axonal structures project through the median bundle and tritocerebrum out of the oesophagus. Thus, my findings further support the concept of DILP release in the pars intercerebralis and additional axonal projections, which release DILP into the circulation in the aorta, proventriculus, crop, and corpora cardiaca, and do not confirm additional local release sites of DILP in the brain.

Octopaminergic neurons targeted by Tdc2-Gal4 have been shown to modulate food intake (Williams et al., 2014). In my thesis, I showed that although they express the InR, developmentally altered InR signaling in this subset does not affect food intake. Moreover, my data shows that octopamine increases the carbohydrate intake since flies which lack octopamine synthesis consume less food solution at higher carbohydrate levels, but the effect is diminished upon reduced carbohydrate content. Secondly, I found that octopamine is not required for developing an ethanol intake preference. Octopamine is involved in the reinforcement of innate odor attraction to ethanol

(Schneider et al., 2012), but not required for the development of a preference for ethanol-containing food. Additionally, I found a macronutrient-specific regulatory effect of InR signaling in TH-positive/dopaminergic neurons with opposing effects on carbohydrate and protein consumption. In a mixed diet of glucose and yeast, the consumption is significantly reduced, therefore the downregulation

of carbohydrate intake by InR signaling in TH-Gal4 neurons is dominant over the protein intake-promoting effect

Furthermore, I tested substances which are known to induce InR resistance and are indicated to promote feeding, like fructose and EtOH, for their effect on food intake (Lustig, 2013). I found that fructose promotes hypercaloric short-term feeding and EtOH hypercaloric long-term feeding in *Drosophila*.

Zusammenfassung

Serotonin erfüllt zahlreiche Funktionen im ZNS – beginnend bei der olfaktorischen Prozessierung, dem olfaktorischen Lernen und der Gedächtnisbildung bis hin zum Trinkverhalten und der Regulierung der Futteraufnahme. In dieser Arbeit differenziere ich die spezifischen Funktionen serotonerger Neuronengruppen im Gehirn auf die Makronährstoffaufnahme. Ich kategorisiere die Funktion zweier serotonerger Neuronengruppen im Fressverhalten – eine Untergruppe, die die Proteinaufnahme fördert und eine Untergruppe, die lediglich aus drei serotonergen Neuronen besteht und den Saccharose- sowie Glukoseappetit reguliert. Ich zeige, dass der modulatorische Effekt der drei serotonergen Neurone gegensätzlich ist, abhängig davon, wann er in der Entwicklung auftritt, denn verstärktes 5-HT Signal dieser Neurone durch die Entwicklung hindurch reguliert die Kohlenhydrataufnahme negativ, wohingegen ein temporär auftretendes 5-HT Signal die Kohlenhydrataufnahme steigert. Des Weiteren beweise ich, dass diese neuronale Gruppe den Insulin Rezeptor exprimiert und dass verändertes InR Signal in dieser Neuronengruppe die Kohlenhydrataufnahme modulieren kann. Als zugrundeliegenden Mechanismus habe ich herausgefunden, dass das InR Signal in serotonergen Neuronen einen starken Einfluss auf die Serotonin Transporter (Sert) Level in der Membran hat, welcher zelltyp-spezifisch variiert. Die Sert Level in der Membrane beeinflussen die Stärke und Dauer für die prä-synaptische Wiederaufnahme des ausgeschütteten 5-HT und damit die Stärke des postsynaptischen Serotonin

Rezeptorsignals. Zudem habe ich herausgestellt, dass die durch die Sert3-Gal4 Treiberlinie angesprochene Neuronengruppe auch das SE1 Neuron beinhaltet, welches das Saccharose und Glukose-spezifische Geschmacksneuron IR60b moduliert. Das IR60b Neuron empfängt das 5-HT Signal über den Serotonin Rezeptor 5HT2B.

In dieser Arbeit habe ich die Projektionen der Insulin-Produzierenden Zellen (IPCs) analysiert und aktive Zonen der IPCs im pars intercerebralis identifiziert, die dort die direkte Freisetzung von DILPs im Gehirn ermöglichen. Zudem habe ich axonale Strukturen entdeckt, die durch das median bundle und tritocerebrum aus dem Ösophagus projizieren und damit das Modell bestärken, dass DILPs im pars intercerebralis und außerhalb des Gehirns in die Aorta, den Proventriculus, den Kropf und die Corpora Cardiacia ausgeschüttet werden.

Für die von Tdc2-Gal4 adressierten octopaminergen Neurone konnte bereits gezeigt werden, dass sie die Futteraufnahme regulieren (Williams et al., 2014). In meiner Arbeit zeige ich, dass obwohl sie den InR exprimieren, ein verändertes InR Signal durch die Entwicklung hindurch keinen Einfluss auf die Futteraufnahme hat. Des Weiteren zeigen meine Ergebnisse, dass Octopamine die Kohlenhydrataufnahme fördert, da Fliegen ohne Octopamine Synthese weniger Futter mit höherem Kohlenhydratanteil konsumieren, während dieser Effekt bei reduziertem Kohlenhydratanteil

verschwindet. Zudem habe ich herausgefunden, dass Octopamine nicht für die Entwicklung einer Ethanol-Präferenz nötig ist.

In dieser Arbeit zeige ich ein Makronährstoff-spezifischen Effekt des InR Signals in TH-positiven/dopaminergen Neuronen, der gegensätzlich auf die Kohlenhydrataufnahme und die Proteinaufnahme wirkt. Die Aufnahme von Glukose und Hefe ist auch reduziert, was zeigt, dass die Kohlenhydratreduzierung dominant über die Förderung der Proteinaufnahme durch InR Signal in den TH-Gal4 adressierten Neuronen ist.

Zuletzt zeige ich, dass Fruktose in Drosophila ein kurzzeitiges hyperkalorisches Essen fördert, wohingegen Ethanol als Nahrungsbestandteil hyperkalorisches Essen über mehrere Tage hinweg induziert.