

# Morphologie und Organisation individueller oktopaminerger Neurone im Gehirn von *Drosophila m.*



Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Busch

aus Dorndorf

Würzburg, 2009

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Martin Heisenberg

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg vom 15. März 1999:**

Hiermit erkläre ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt zu haben und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Alle aus der Literatur genommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Zuvor habe ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 04.03.2009

Sebastian Busch

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	7
1.1 Oktopamin .....	7
1.2 Funktion von Oktopamin in der Peripherie.....	7
1.3 Architektur des oktopaminergen Systems in der Peripherie .....	9
1.4 Entwicklung von DUM bzw. VUM Neuronen.....	9
1.5 Funktionelle Analyse von peripheren DUM/VUM Neuronen auf Einzelzellebene .....	12
1.6 Funktion von Oktopamin im Zentralnervensystem.....	13
1.7 Organisation von zentralen oktopaminergen Neuronen.....	13
1.8 Korrelation zentraler Interneurone und spezifischer Funktionen von Oktopamin.....	16
1.9 <i>Drosophila</i> als Modellorganismus zur funktionellen Analyse von neuronalen Netzwerken.....	16
1.10 Ein genetisches Werkzeug für die funktionelle Analyse oktopaminerger Neurone .....	17
1.11 Expressionsmuster von <i>tdc2-GAL4</i> .....	18
1.12 Zielsetzung .....	19
2. Materialien .....	21
2.1 Fliegenstämme .....	21
2.2 Reagenzien/Materialien für Klonierung.....	22
2.3 Reagenzien/Materialien für Immunhistochemie .....	25
2.4 Lösungen/Puffer für Klonierung .....	28
2.5 Lösungen/Puffer für Immunhistochemie .....	29
3. Methoden .....	30
3.1 Klonierung.....	30
3.1.1 Klonierungsstrategie von <i>pCaSpeR-hsp70/3.7sim-flp</i> .....	30
3.1.2 Isolierung genomischer DNA .....	30
3.1.3 PCR-Ansatz .....	31
3.1.3 Restriktionsverdau.....	32
3.1.4 Ligation.....	32
3.1.5 Transformation von Bakterien/ DNA Isolierung aus Agarose und Bakterienkulturen .....	32
3.1.6 Ansetzen von Minikulturen .....	32
3.1.7 Ansetzen von Midikulturen.....	33
3.1.8 Sequenzierung.....	33
3.1.9 Transformation der Fliegen.....	33
3.2 Kreuzungsschemen .....	33
3.2.1 Stabile Stämme der <i>P{3.7sim-flp}</i> Insertionen .....	34
3.2.2 Verschiedene Genotypen .....	35
3.2.3 Kartierung von prä- und postsynaptischen Regionen .....	35
3.2.4 Einzelzellfärbung.....	35
3.2.5 Färbung von GAL4 positiven Mitellinienklonen.....	36



3.3 Immunhistochemie.....	37
3.3.1 Immunhistochemische Färbung von „Whole Mount“ Präparaten des adulten Gehirns .....	37
3.3.2 Immunhistochemische Färbung von Vibratom-Schnitten des adulten Kopfes.....	38
3.4 Mikroskopie und Bildbearbeitung .....	38
3.5 Nomenklatur .....	38
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1 Morphologische Polarität von oktopaminerger Neuronen .....	40
4.2 Morphologie von einzelnen oktopaminerger Neuronen.....	40
4.3 Antennalloben-Cluster Neurone (OA-AL2).....	42
4.4 Neurone des Clusters VL (OA-VL).....	46
4.5 Neurone aus Cluster ASM (OA-ASM).....	48
4.6 Das VM Cluster.....	51
4.6.1 Zelluläre Zusammensetzung des VM Clusters .....	51
4.6.2 Ventral Paired Median Neurons.....	56
4.6.3 Aufsteigende VUM Neurone (OA-VUMa) .....	59
4.6.4 Absteigende VUM Neurone (OA-VUMd) .....	61
4.6.5 Weitere Neurone des VM Clusters .....	64
4.6.6 Segmentale Duplikation der OA-VUMa Neurone.....	66
4.6.7 Stereotypie der segmental duplizierten Neurone .....	70
4.6.8 OA-VUM und OA-VPM Neurone gehören zu verschiedenen Zellstammbäumen.....	70
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>72</b>
5.1 Identifizierung individueller oktopaminerger Neurone .....	72
5.2 Transmittereigenschaften von Cluster ASM.....	73
5.3 Morphologische Polarität oktopaminerger Neurone .....	74
5.4 Eine Eingangsregion oktopaminerger Neurone .....	74
5.5 Kombinatorische Organisation oktopaminerger Neurone .....	75
5.6 Vergleichende und funktionelle Aspekte auf Einzelzellebene .....	77
5.7 Segmentale Organisation der oktopaminerger Mittellinienneurone.....	78
5.8 Gepaarte Mittellinienneurone.....	79
5.9 Ursprung oktopaminerger Mittellinienneurone .....	80
5.10 Evolution oktopaminerger Mittellinienneurone .....	81
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>90</b>
<b>8. Summary.....</b>	<b>91</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
9.1 Nomenklatur der Hirnregionen.....	92
9.2 Abkürzungen im Text.....	93
<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>95</b>

11. Publikationsliste .....	97
12. Danksagung .....	98
13. Anhang.....	99
13.1. Kreuzungsschemen .....	99
13.1.1 Etablierung stabiler Stämme der <i>P{3.7sim-flp}</i> Insertionen .....	99
13.1.2 Etablierte Fliegenstämme .....	102

# **1. Einleitung**

## **1.1 Oktopamin**

Der Pianist vor dem Konzert, der Sportler vor dem Wettkampf und der Student vor der Prüfung befinden sich in einer ähnlichen Stressituation. Ihre Aufregung geht einher mit physiologischen Anpassungen, wie der Erhöhung des Herzschlags, des Blutdrucks, des Blutzuckerspiegels und des Muskeltonus`. Diese Effekte werden von dem biogenen Amin Adrenalin vermittelt. In Insekten, die kein Adrenalin synthetisieren, übernimmt Oktopamin äquivalente Aufgaben (Adamo et al. 1995; Röder 2003; Röder 2005).

Oktopamin wurde zum ersten mal 1951 in den Speicheldrüsen von *Octopus* entdeckt, was ausschlaggebend für seine Nomenklatur war (Erspamer und Boretti 1951). Es entsteht in einem zweistufigen Prozess aus der Aminosäure Tyrosin. Dabei katalysiert das Enzym Tyrosin-Decarboxylase (TDC) die Synthese des Zwischenproduktes Tyramin. Zur anschließenden Bildung von Oktopamin ist Tyramin- $\beta$ -Hydroxylase (T $\beta$ H) notwendig (Abb.1A; Röder 2005).

Das oktopaminerge/tyraminerge und das adrenerge System (Adrenalin und sein Vorläufer Noradrenalin) ähneln sich in der chemischen Struktur der biogenen Amine, in ihrer neuronalen Architektur und ihrer Wirkung auf eine Vielzahl von Verhaltensweisen und Stoffwechselfvorgängen.

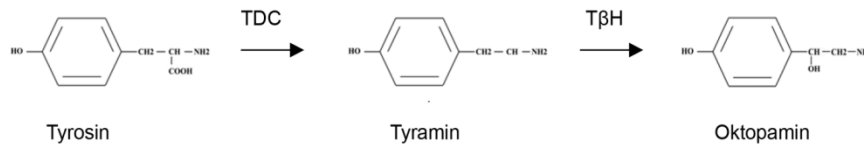
## **1.2 Funktion von Oktopamin in der Peripherie**

Die vielfältigen Funktionen von Oktopamin in der Peripherie wurden in verschiedenen Insektenspezies untersucht (Abb.1B; Prier et al. 1994; Bella et al. 1984; Malamud et al. 1988; Orchard et al. 1982; Wang et al. 1990; Pophof 2002; Röder 2003).

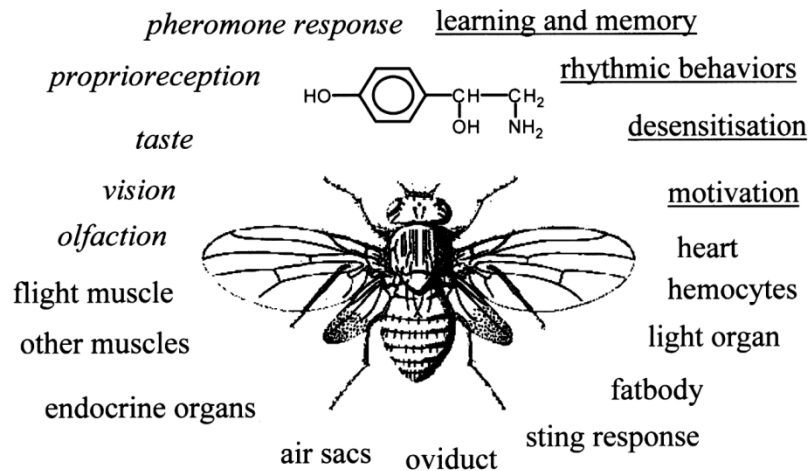
An Skelettmuskeln wirkt Oktopamin neuromodulatorisch, d.h. es wird an unspezifischen Regionen der Präsynapse ausgeschüttet und diffundiert dann zu seinen Zielorten, den prä- und postsynaptischen Bereichen an der Neuromuskulären Verbindung (Hoyle et al. 1980; Watson 1984). Dort induziert es einen Anstieg der Spannkraft und der Relaxations-Rate (Evans 1981; Evans und O`Shea 1977; Hoyle und Barker 1975).

Oktopamin wirkt auch als Neurohormon. Während Stresssituationen wird es in die Hämolymphe freigesetzt (Roeder 2005). Von dort wirkt es auf verschiedene Organe, und führt

A



B



**Abbildung 1. A:** Oktopaminsyntheseweg. Oktopamin entsteht in einem zweistufigen Prozess aus der Aminosäure Tyrosin. Das Enzym TDC katalysiert die Synthese des Zwischenprodukts Tyramin. Der letzte Schritt wird durch das Enzym TβH katalysiert. **B:** Effekt von Oktopamin auf verschiedene Gewebe in Invertebraten. Es moduliert zahlreiche periphere Organe, Sinnesorgane (kursiv) und zentrale Systeme (unterstrichen). *Modifiziert von Roeder 1999.*

z.B. in den Fettkörpern zur Freisetzung von Fettsäuren, um mehr Energie für den Stoffwechsel bereitzustellen (Bräunig und Pflüger 2001; Röder 2005).

Das einzige Beispiel für die Wirkung Oktopamins als Neurotransmitter ist das Lichtorgan der Feuerfliege. Hier setzen abdominale Neurone Oktopamin in den synaptischen Spalt frei. Es bindet dann an postsynaptische Rezeptoren und induziert so die Lichtemission des Organs (Nathanson 1979; Nathanson 1985).

### 1.3 Architektur des oktopaminergen Systems in der Peripherie

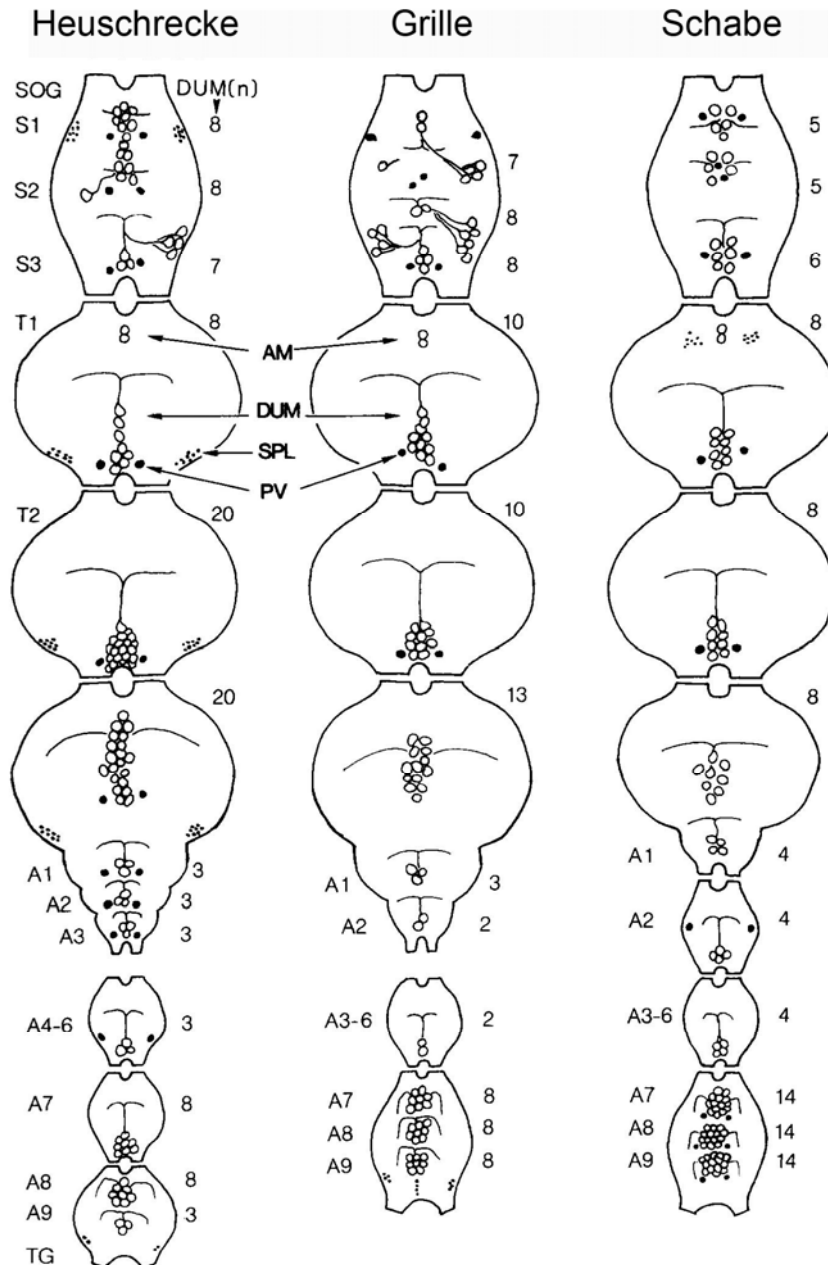
Die Peripherie wird hauptsächlich von einem bestimmten oktopaminergen Zelltyp versorgt, den so genannten DUM (Dorsal Unpaired Median) bzw. VUM (Ventral Unpaired Median) Neuronen, deren Zellkörper sich entlang der dorsalen bzw. ventralen Mittellinie des ventralen Nervensystems befinden (Abb.2). Sie sind ungepaart und formen bilateral symmetrische Axone, die in periphere Nerven ihres eigenen oder eines angrenzenden Ganglions projizieren. Im weiteren Verlauf innervieren sie dann Skelett- bzw. viszerale Muskulatur (Bräunig und Pflüger 2001), sowie innere Organe. Letztere werden von Zellen versorgt, deren Zellkörper in den Abdominalganglien lokalisiert sind.

Periphere DUM/VUM Neurone sind segmental organisiert (Abb.2). In den verschiedenen Thorakal- bzw. Abdominalganglien ist ihre Morphologie und Organisation ähnlich, jedoch zeigen sie Segment-spezifische Unterschiede im Hinblick auf Zellzahl und Zielregionen. Die hohe Konservierung der Architektur peripherer DUM/VUM Neurone zeigen Studien an Heuschrecken, Grillen, Schaben oder Stabheuschrecken, wo man anhand ihrer individuellen Morphologie einzelne homologe Neurone identifizieren konnte (Gras et al. 1990, Spörhase-Eichmann 1992; Denburg und Barker 1992; Pollack et al. 1988; Elia und Gardner 1990; Bartos und Honegger 1992; Arikawa et al. 1984; Tanaka und Washio 1988; Brunn 1989).

### 1.4 Entwicklung von DUM bzw. VUM Neuronen

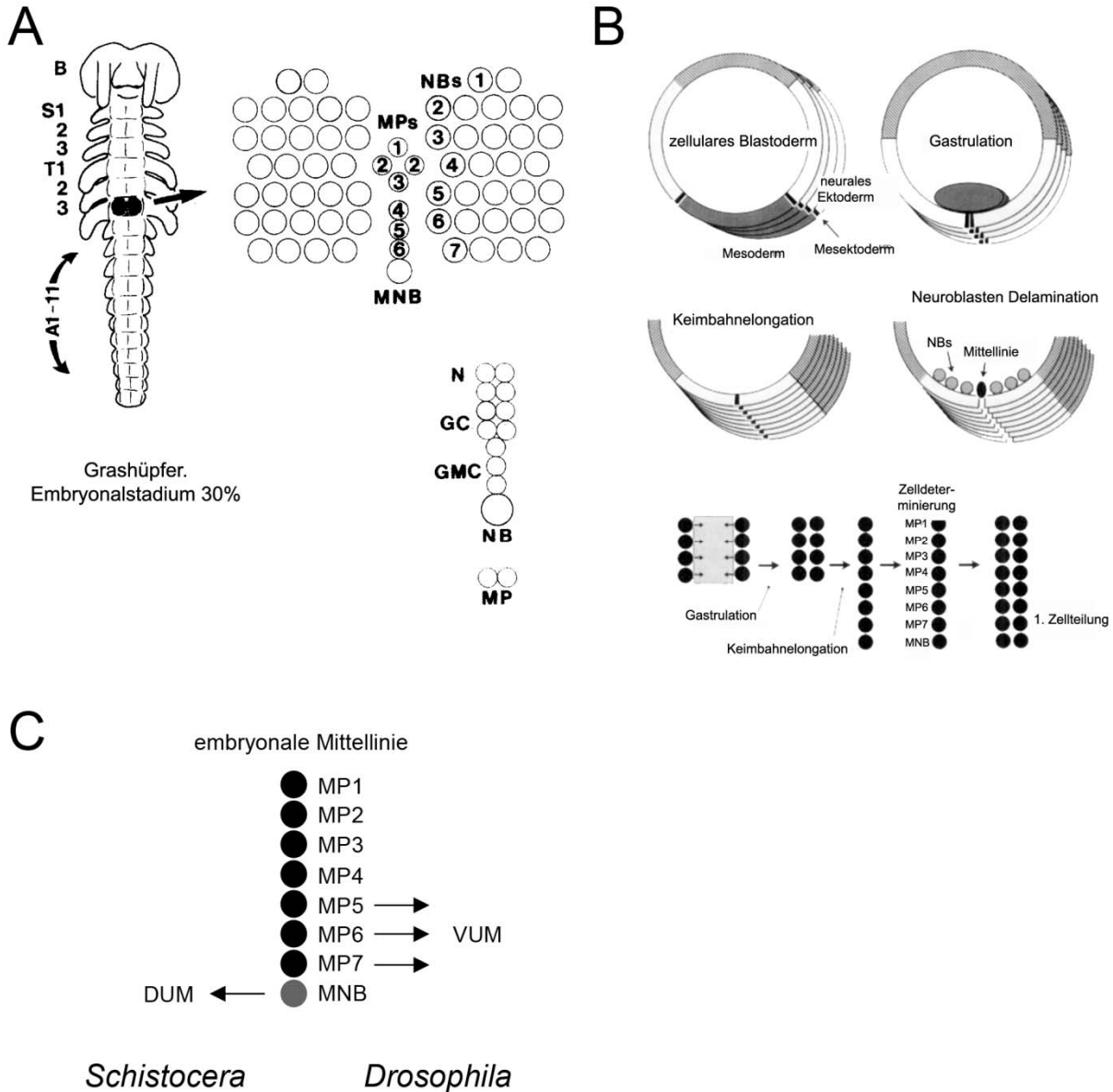
Das Insekten-Nervensystem hat einen segmentierten Bauplan, worin jedes Neuomer aus einem äquivalenten Set von Stammzellen hervorgeht. Dies sind 30 laterale Neuroblasten auf beiden Seiten der Mittellinie, ein Medialer Neuroblast und sieben Mediale Vorläuferzellen. Die Neuroblasten teilen sich wiederholt und produzieren bis zu 100 Nachkommen. Im Gegensatz dazu teilen sich Mediale Vorläuferzellen nur einmal, wodurch zwei Nachkommen gebildet werden (Abb.3A; Goodman und Bate 1981). Die medialen Stammzellen, d.h. der Mediale Neuroblast und die Medialen Vorläuferzellen, entstehen aus dem sogenannten Mesektoderm, während die lateralen Neuroblasten aus dem neuronalen Ektoderm hervorgehen (Abb.3B; Klämbt et al. 1991; Bate 1976).

Die Entwicklung peripherer DUM Neurone wurde in Heuschrecken auf Einzelzellebene untersucht. Das gesamte Set dieser Neurone entsteht aus dem Medialen Neuroblasten (Abb.3C). Diese Stammzelle produziert eine Kette von Nachkommen, deren Differenzierung



**Abbildung 2.** Lokalisation von oktopaminergen Neuronen im ventralen Nervensystem von Heuschrecken, Schaben und Grillen. Die Hauptquelle von peripheren Oktopamin sind DUM Neurone (offene Kreise). Sie befinden sich entlang der Mittellinie und zeigen eine segmentale Organisation. Lateral der DUM Neurone befinden sich gepaarte Somata (PV Neurone; schwarze Kreise). DUM und PV Neurone sind in allen Neuomeren des ventralen Nervensystems zu finden (S1-S3, T1-T3, A1-A9). Einige Oktopamin-immunoreaktive Somata sind auf bestimmte Neuomere beschränkt: AM Neurone befinden sich anterior medial im Segment T1; SPL Neurone haben relative kleine Somata und befinden sich lateral in den jeweiligen Ganglien, d.h. in S1 und T1-3 von Heuschrecken, sowie T1 von Grillen. *Modifiziert von Stevenson und Spörhase-Eichmann 1995.*

altersabhängig ist. Nur die Nachkommen, die aus frühen Teilungen entstehen bilden oktopaminerge DUM Neurone. Jüngere Nachkommen differenzieren sich zu GABAergen Interneuronen aus (Thompson und Siegler 1991b). Die DUM Neurone der verschiedenen



**Abbildung 3.** Vorläuferzellen peripherer VUM/DUM Neurone. **A:** Heuschrecken-Embryo, Stadium 30%. Das Nervensystem von Insekten hat einen segmentierten Bauplan. Jedes Neuomer entsteht aus einem seriell homologen Set von Stammzellen. Dieses Set besteht aus 30 lateralen Neuroblasten (NB) in jeder Hemisphäre. Zusätzlich gibt es an der Mittellinie einen Medialen Neuroblasten (MNB) und sieben Mediale Vorläuferzellen (MP). Wie alle Neuroblasten teilt sich MNB wiederholt asymmetrisch und bildet bis zu 50 Tochterzellen; Ganglion Mutterzellen (GMC). Die GMC teilen sich symmetrisch und produzieren so jeweils zwei Neurone. Im Gegensatz zu den Neuroblasten teilen sich MPs nur einmal. **B:** Entwicklung der Mittellinie in vier embryonalen Stadien von *Drosophila*. Die Vorläuferzellen der embryonalen Mittellinie bilden das Mesektoderm. Während des Blastulastadiums trennen sie das Mesoderm vom neuronalen Ektoderm. Im Verlauf der Gastrulation stülpt sich das Mesoderm ein, so dass die beiden Streifen Mesektoderm an der ventralen Mittellinie aufeinander treffen. Die beiden Streifen bestehen aus jeweils 4 Zellen, die sich während der Keimbahnelongation miteinander vermischen, so dass eine Reihe von 8 Zellen entsteht. Bevor sich diese Stammzellen teilen delaminieren sie vom neuronalen Ektoderm in die Neuroblastenschicht. **C:** Die Mittellinie besteht dann aus sieben Medialen Vorläufern (MP1-7) und einem Medialen Neuroblasten (MNB). Alle oktopaminergen DUM Neurone in den Thorakalganglien der Heuschrecke stammen vom Medialen Neuroblasten ab. Im Gegensatz dazu entstehen die VUM Neurone in *Drosophila* aus den Medialen Vorläufern MP5-7. Modifiziert von Goodman und Bate 1981, Klämbt et al. 1991.

Neuomere entwickeln sich aus äquivalenten Vorläufern, d.h. den Medialen Neuroblasten, und gehören somit zu seriell homologen Zellstammbäumen (Thompson et al. 1993). Zeitlich und segmental begrenzte Apoptose-Ereignisse scheinen der Hauptmechanismus hinter der unterschiedlichen Zahl und zellulären Zusammensetzung von seriell homologen Zellstammbäumen zu sein (Thompson und Siegler 1993).

In *Drosophila* stammen die thorakalen VUM Neurone auch von der embryonalen Mittellinie ab. Jedoch scheinen sie nicht aus dem Medialen Neuroblasten hervorzugehen, sondern aus den Medialen Vorläuferzellen (Abb.3C). Aus drei Medialen Vorläuferzellen entsteht jeweils ein VUM Motor- und ein VUM Interneuron. In vereinzelt Individuen konnte man jedoch unterschiedliche Ereignisse dokumentieren; alle 6 VUM Nachkommen gingen aus einem Vorläufer hervor (Bossing und Technau 1994). Diese Nachkommenzahl ist untypisch für Mediale Vorläuferzellen und war bisher nur von Neuroblasten bekannt. Aufgrund dieser Unklarheiten sollte man vorsichtig sein, wenn man die Homologie von VUM und DUM Neuronen vergleicht.

### **1.5 Funktionelle Analyse von peripheren DUM/VUM Neuronen auf Einzelzellebene**

Periphere DUM Neurone repräsentieren ein ideales System, um Anatomie, Physiologie und Verhalten auf Einzelzellebene zu studieren. Jedes DUM Neuron weist ein individuelles Projektionsmuster auf und ist deshalb in verschiedenen Individuen identifizierbar. Zudem ist das periphere Nervensystem von Insekten einfach aufgebaut und zugänglich für elektrophysiologische und pharmakologische Methoden. So war es in einigen Fällen möglich individuelle DUM Neurone und spezifische Funktionen von Oktopamin zu korrelieren. Zum Beispiel moduliert die Ausschüttung von Oktopamin aus einem einzigen thorakalen DUM Neuron das synaptische Potential und die Spannkraft des Exzensor Tibiae Muskels in *Locusta* (Evans und O'Shea 1977). Die *Drosophila* Mutante *Tβh<sup>M18</sup>* kann kein Oktopamin synthetisieren und zeigt deshalb einen charakteristischen Ovulationsdefekt. Oktopamin-Synthese in einer bestimmten Gruppe von abdominalen VUM Neuronen, welche den Oviduktmuskel innervieren, ist ausreichend, um diesen Defekt zu retten. (Monastirioti 2003; Monastirioti et al. 1996). In *Locusta* wurde gezeigt, daß Stimulation oktopaminerger Neurone, welche die Corpora Cardiaca innervieren, die Freisetzung des adipokinetischen Hormons in die Hämolymphe induziert (Downer et al. 1984). Ebenfalls in *Locusta* verstärken bestimmte mesothorakale DUM Neurone



während des Fluges die Antwort von Propriozeptoren in den Flügeln indem sie Oktopamin freisetzen (Ramirez und Orchard 1990).

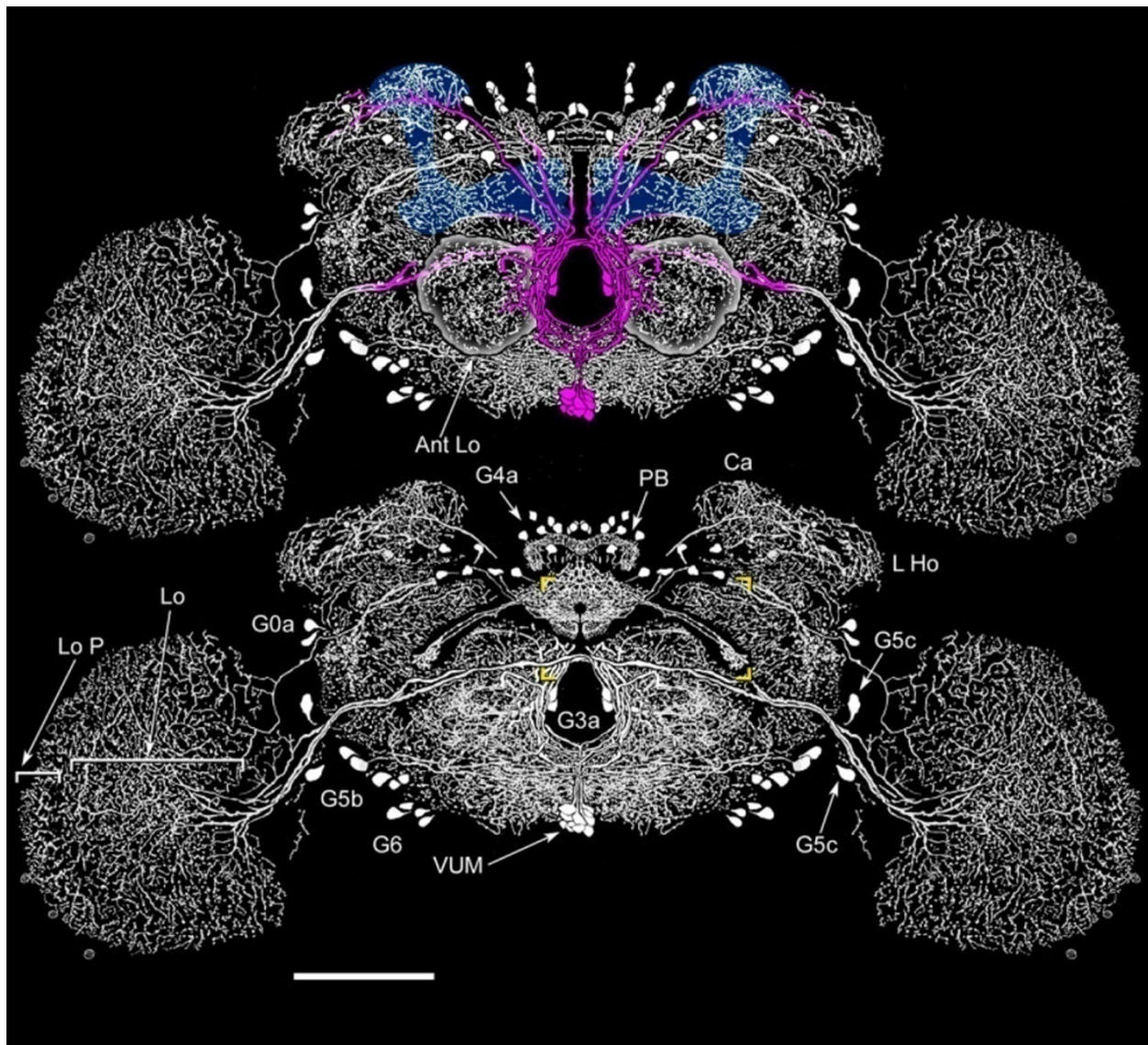
## 1.6 Funktion von Oktopamin im Zentralnervensystem

Besonders interessant ist die Rolle von Oktopamin innerhalb des Zentralnervensystems (Abb.1B). Hier zeigt es eine Reihe unterschiedlicher Wirkungen, die von der Modulation einfacher Reflexe, bis hin zur Regulation komplexer Verhaltensweisen reichen.

Oktopamin ist beispielsweise in die Kontrolle und Aufrechterhaltung von rhythmischen Bewegungen, wie Laufen oder Fliegen involviert (Sombati et al. 1984; Yellman et al. 1997). Es vermittelt außerdem Dishabituation innerhalb des Nervensystems. So reicht in *Locusta* Oktopamin-Applikation aus, um den „Kick-Reflex“, der normalerweise komplett habituiert, wieder herzustellen (Sombati et al. 1984). Im olfaktorischen Lernen wird das oktopaminerge System selektiv für die Verarbeitung und Weiterleitung des Belohnungssignals benötigt, aber nicht für die Duftwahrnehmung oder generell die Lernfähigkeit (Schroll et al., 2006; Schwärzel et al., 2003; Vergoz et al. 2007). Die *Drosophila* Mutante *TβH<sup>M18</sup>*, der Oktopamin fehlt, kann keine normale Ethanol toleranz entwickeln, während ihre Ethanol sensitivität intakt bleibt (Scholz et al. 2000). Zudem ist in diesen Fliegen das Aggressions-Verhalten stark reduziert (Baier et al. 2002; Hoyer et al. 2007; Zhou et al. 2008). In Bienen verstärkt Oktopamin die Erkennung von Mitgliedern der eigenen Kolonie und moduliert das Verhalten gegenüber fremden Individuen (Robinson et al. 1999). Überdies ist es in die Regulierung von Arbeitsteilung involviert, d.h. der altersabhängigen Umschaltung der Arbeiterinnen vom Pflegedienst zur Nahrungssuche (Schulz und Robinson 1999; Schulz und Robinson 2001).

## 1.7 Organisation von zentralen oktopaminergen Neuronen

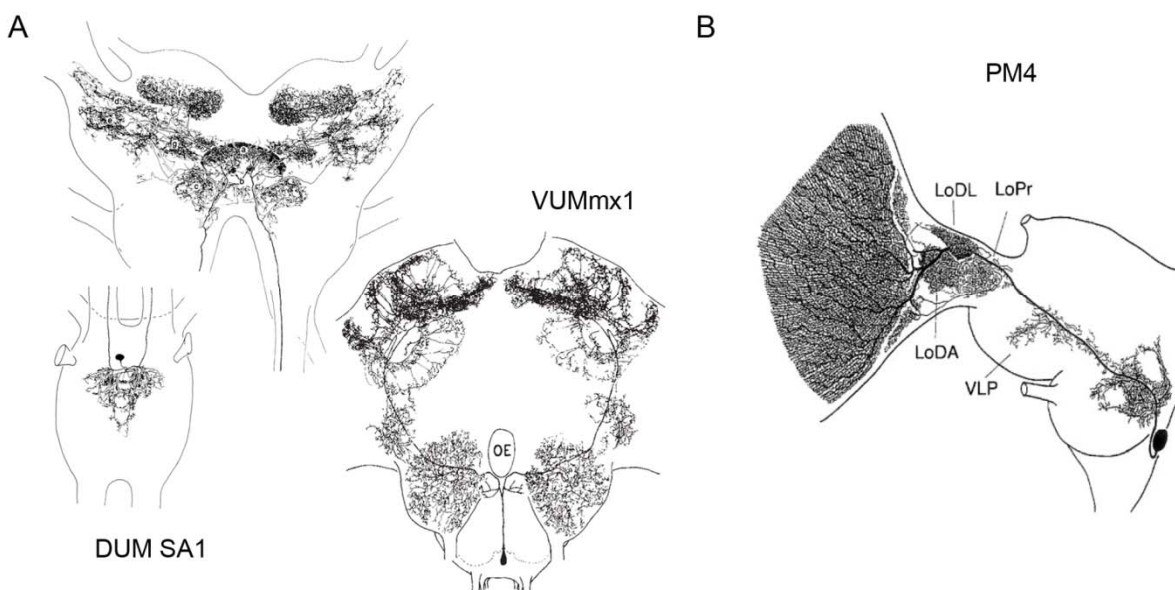
Vergleichende anatomische Studien des zentralen oktopaminergen Systems zeigten deutliche Gemeinsamkeiten unter verschiedenen Spezies (Dacks et al. 2005; Konings et al. 1988; Kreissl et al. 1994; Monastirioti et al. 1995; Sinakevitch et al. 2005; Sinakevitch und Strausfeld 2006; Spörhase-Eichmann et al. 1992; Stern et al. 1995). In allen analysierten Insekten verzweigt sich eine kleine Zahl oktopaminergere Neurone extensiv in den meisten, wenn nicht allen, Neuropilen des Gehirns (Abb.4; Sinakevitch et al., 2005; Sinakevitch und Strausfeld, 2006). Dabei scheint eine Unterteilung in separate Systeme möglich, d.h. verschiedene, zwischen bestimmten



**Abbildung 4.** Architektur des oktopaminergen Systems im Hirn von *Drosophila* (oben: anterior; unten: posterior). Eine relativ kleine Zahl von Neuronen formt komplizierte Verzweigungen, die über das gesamte Hirn verteilt sind. Modifiziert von Sinakevitch und Strausfeld 2006.

Insektenspezies konservierte Zellcluster, tragen zur Innervierung bestimmter Neuropile im Gehirn bei.

In Heuschrecken und Honigbienen wurde eine besondere Klasse von oktopaminergen DUM/VUM Neuronen des Subösophagealen Ganglions mit Hilfe von intrazellulären Färbungen auf Einzelzellebene rekonstruiert (Abb.5A; Bräunig 1991; Schröter et al. 2007). DUM Neurone in *Locusta migratoria* und VUM neurone in *Apis mellifera* sind ungepaart und formen bilateral symmetrische Innervationen. Ihre Zellkörper befinden sich entlang der dorsalen bzw. ventralen Mittellinie. Da Anzahl und Lokalisation der Mittellinienneurone mit der OA-Cytochemie korreliert,



**Abbildung 5.** Einzelzellfärbungen von zentralen oktopaminergen Neuronen in *Locusta m.* bzw. *Apis m.* **A:** ungepaarte Mittellinienneurone des Subösophagealen Ganglions. DUMSA1 in der Heuschrecke innerviert den Zentralkomplex, die Calyces der Pilzkörper, sowie Teile des Protocerebrums. VUMmx1 der Honigbiene projiziert in die Antennalloben, in das laterale Protocerebrum und in die Calyces der Pilzkörper. **B:** Gepaarte PM4 Neurone in Heuschrecken innervieren die optischen Loben. *Modifiziert von Bräunig 1991, Hammer 1993, Stern 1999.*

geht man davon aus, daß alle in diesen Studien identifizierten DUM/VUM Typen oktopaminerg sind (Bräunig 1991; Kreissl et al. 1994; Schröter et al. 2007; Sinakevitch et al. 2005).

In der Honigbiene zeigt das subösophageale VUM-Cluster eine segmentale Organisation, d.h. jeweils 6-10 Somata befinden sich im mandibularen, maxillaren bzw. labialen Segment (Kreissl et al. 1994). In *Locusta* gibt es eine anteriore und ein posteriore Zellgruppe bestehend aus 13-14 bzw. 7 Somata, deren Assoziation mit einem Segment schwierig ist (Bräunig 1991). In beiden Spezies projizieren Neurone des posterioren Clusters zurück in die Thorakalganglien während die anterioren Neurone (mandibular und maxillar in der Honigbiene) markante Hirnregionen, wie die Pilzkörper, die Antennalloben oder den Zentralkomplex, innervieren (Bräunig 1991; Bräunig und Burrows 2004; Schröter et al. 2007). In beiden Spezies findet man zusätzlich gepaarte oktopaminerge Mittellinienneurone in den Gnathalsegmenten (VM Neurone in *Locusta*; Stevenson und Spörhase-Eichmann 1995; Kreissl et al. 1994), deren Morphologie bisher nicht beschrieben wurde.

## 1.8 Korrelation zentraler Interneurone und spezifischer Funktionen von Oktopamin

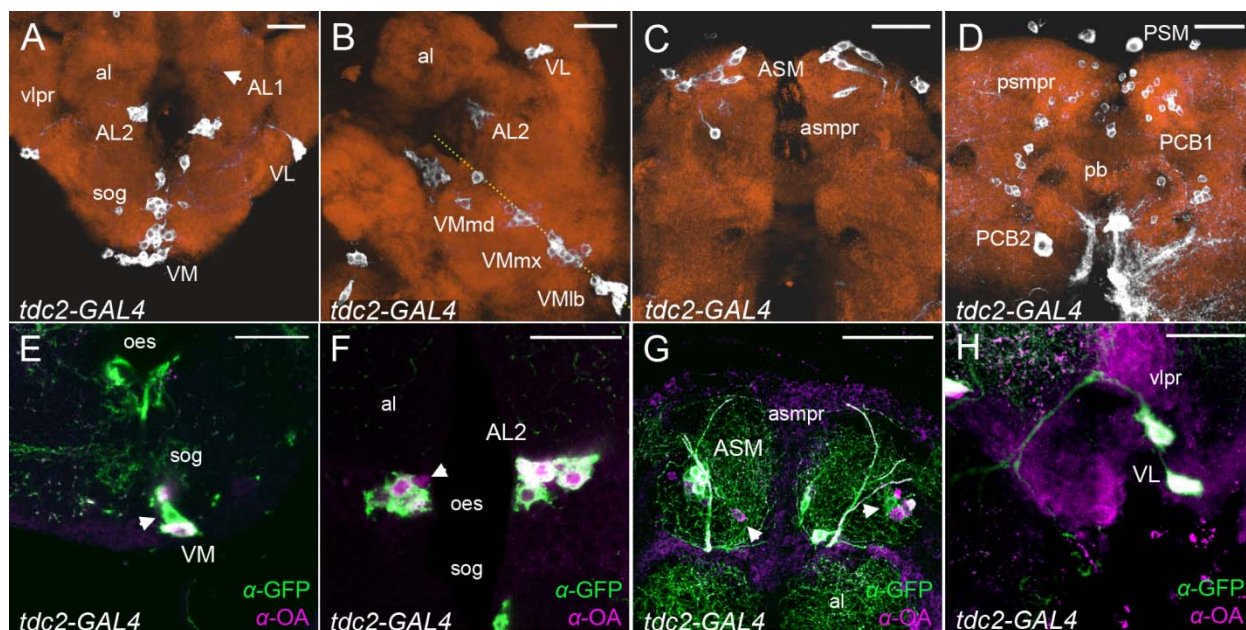
Aufgrund der komplexen Struktur und beschränkten Zugänglichkeit des Zentralnervensystems gibt es nur wenige Studien, in denen spezifische Funktionen und individuelle oktopaminerge Neurone korreliert werden konnten (e.g. Certel et al. 2007; Zhou et al. 2008). Einer der wenigen Fälle ist VUMmx1, ein bestimmtes maxillares VUM Neuron der Honigbiene (Abb.5A). Elektrische Stimulation von VUMmx1 ersetzt das Zucker-Belohnungssignal im assoziativen olfaktorischen Lernen (Hammer 1993).

Die PM4 Neurone in *Locusta*, welche den optischen Lobus innervieren (Abb.5B), sind ein weiteres Beispiel für die Korrelation von individuellen Neuronen und spezifischen Funktionen von Oktopamin. Wahrscheinlich tragen PM4 Neurone durch die Ausschüttung von Oktopamin zur Dishabituation des visuellen Interneurons DCMD bei, dass in Fluchtverhalten der Heuschrecke involviert ist (Stern 1999).

## 1.9 *Drosophila* als Modellorganismus zur funktionellen Analyse von neuronalen Netzwerken

In den letzten Jahrzehnten konnte sich das Modellsystem *Drosophila m.* für die funktionelle Analyse neuronaler Netzwerke etablieren. Dazu trugen vor allem die genetischen Werkzeuge bei, mit deren Hilfe man nicht-invasiven Zugang zu neuronalen Netzwerken erhält. Die Mutanten, die in *Drosophila* in großer Zahl verfügbar sind, und das UAS/GAL4 System (Brand und Perrimon 1993) haben sich in dieser Hinsicht als besonders praktikabel erwiesen. Das UAS/GAL4 System ermöglicht eine räumlich oder zeitlich beschränkte Expression von Reporter- bzw. Effektorgenen (Duffy 2002) und wurde für die Manipulation neuronaler Funktion verwendet (Kitamoto 2001; Brand und Dorman 1995; Sweeney et al. 1995; Baines et al. 2001; Schroll et al. 2006). Das Modellsystem *Drosophila* wird komplettiert durch die zahlreichen Paradigmen, mit denen man auch komplexe Verhaltensweisen untersuchen kann, sowie durch die Zugänglichkeit für Elektrophysiologie (Wilson et al. 2004) und in vivo Imaging (Fiala und Spall 2003).





**Abbildung 6.** Expressionsmuster von *tdc2-GAL4*. **A-D:** Jedes Feld zeigt eine Projektion von Konfokal-Aufnahmen aus verschiedenen Hirnbereichen. Das Neuropil und die Somata GAL4 positiver Neurone wurden mit  $\alpha$ -Synapsin (orange) bzw. UAS-mCD8::GFP (white) gefärbt. In allen Abbildungen werden Zellcluster mit Großbuchstaben und Hirnregionen mit Kleinbuchstaben beschrieben. **A:** Frontalansicht auf das ventrale Supraösophageale und Subösophageale Ganglion von *tdc2-GAL4*. Cluster VM befindet sich an der ventralen Mittellinie des Subösophagealen Ganglions (sog). Cluster AL1 besteht aus einem gepaarten Zellkörper (Pfeil) am anterioren Rand der Antennalloben (al). Cluster AL2 befindet sich ventro-medial der Antennalloben und Cluster VL zwischen Antennalloben und ventro-lateralen Protocerebrum (vlpr). **B:** Ventrale Ansicht des Subösophagealen Ganglions (sog). Das Hirn ist um 45° nach links gedreht. Die gestrichelte Linie deutet die Mittellinie des Subösophagealen Ganglions an. Cluster VM ist in drei Subcluster geteilt: VMmd, VMmx und VMlb von anterior nach posterior. **C:** Gepaarte Somata im anterior superior medialen Protocerebrum (asmpr) formen Cluster ASM. **D:** In der posterioren Zellrinde markiert *tdc2-GAL4* Cluster PSM an der Protocerebralbrücke (pb) und am posterior superior medialen Protocerebrum (psmpr). Kleine Somata (PB1) sind um die Protocerebralbrücke herum verteilt. Zwei große Somata (PB2) befinden sich ventral der Protocerebralbrücke. **E-H:** Oktopamin-Immunoreaktivität in *tdc2-GAL4*. Das Oktopaminsignal wurde mit anti-Oktopamin dargestellt (magenta). Der Membranmarker mCD8::GFP (grün) färbt die Fortsätze und Zellkörper GAL4 positiver Neurone. Oktopamin-Immunoreaktivität ist nur in den Clustern VM (E), AL2 (F), ASM (G) und VL (H) detektierbar. **E:** Vergrößerung von Cluster VM. Die Färbung mit anti-Oktopamin ist sehr variabel. Gelegentlich färbt anti-Oktopamin die GFP-positiven Neurone nur schwach (Pfeil). **F:** Vergrößerung von Cluster AL2. Ein Oktopamin-immunoreaktives Neuron in Cluster AL2 überlappt nicht mit *tdc2-GAL4* (Pfeil). **G:** Einige Zellen in Cluster ASM überlappen mit dem Oktopaminsignal. Zusätzlich gibt es Somata, die ausschließlich von anti-Oktopamin oder GFP markiert werden. **H:** GFP- und Oktopamin-Signal kolokalisieren in beiden Zellkörpern von Cluster VL. *Modifiziert von Busch et al. 2009.*

## 1.10 Ein genetisches Werkzeug für die funktionelle Analyse

### oktopaminerger Neurone

Ein genetisches Werkzeug für die Analyse oktopaminerger Neurone ist die GAL4 Linie *tdc2* (Cole et al. 2005). In dieser Linie ist GAL4 unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des Gens *tdc2*. Letzteres kodiert für das Enzym TDC und sollte daher von oktopaminerger Neuronen exprimiert werden.

Zellcluster	Zellzahl (S.E.M.)	<i>n</i>	OA positive Zellen (in Prozent)	<i>n</i>
VM	27 (0.65)	8	78-100	7
AL2	7 (0.26)	8	100	6
VL	2 (0.16)	8	100	6
ASM	8 (0.46)	8	25-100	7
AL1	1 (0.13)	8		
PSM	5 (0.62)	8		
PCB1	65 (3.96)	8		
PCB2	2 (0.13)	8		
<b>Gesamt</b>	<b>137 (4.7)</b>	<b>8</b>		

**Tabelle 1.** Zellzahl der verschiedenen Cluster von *tdc2-GAL4* und deren Überlappung mit Oktopamin-Immunoreaktivität. *Modifiziert von Busch et al. 2009.*

Die Neurone dieser GAL4 Linie konnten mit einigen modulatorischen Funktionen von Oktopamin korreliert werden. So ist zum Beispiel Oktopamin-Synthese in diesen Neuronen allein ausreichend, um komplexe Verhaltensweisen wie Fliegen, Eiablage, Zuckerbelohnungslernen und Aggression ausführen zu können (Brembs et al. 2007; Zhua et al. 2008; und unpublizierte Daten). Letzteres Verhalten ist nicht mehr intakt, wenn man den synaptischen Ausgang der GAL4 positiven Neurone blockt oder ihre Membran hyperpolarisiert (Hoyer et al. 2007). Schließlich wurde in Schroll et al. 2006 gezeigt, dass lichtinduzierte Aktivität in diesen Zellen ausreicht, um das Zuckerbelohnungssignal im larvalen Lernen zu ersetzen.

### 1.11 Expressionsmuster von *tdc2-GAL4*

Das Expressionsmuster der GAL4 Linie wurde ausführlich von Busch (Diplomarbeit 2006) bzw. Selcho (Diplomarbeit 2006) charakterisiert. *Tdc2-GAL4* markiert etwa 137 Neurone im adulten Gehirn (Tab.1). Sie formen charakteristische Zellcluster: Cluster VM besteht aus 27

Somata, die sich entlang der ventralen Mittellinie des Subösophagealen Ganglions befinden. Sie können in drei Subcluster geteilt werden, die sich entlang der antero-posterioren Achse erstrecken. Die drei Subcluster repräsentieren wahrscheinlich die drei Neuromere des gnathalen Segments (Mandibular, Maxillar und Labial; Abb.6A und B; Tab.1). Das Cluster AL2 befindet sich am ventro-medialen Rand der Antennalloben und besteht aus 7 Zellen pro Hemisphäre (Abb.6A und B; Tab.1). Zwei gepaarte Zellkörper, die zwischen den Antennalloben und dem ventrolateralen Protocerebrum lokalisiert sind (Abb.6A und B; Tab.1), bilden das Cluster VL. Cluster ASM besteht aus 8 Zellkörpern pro Hemisphäre im anterioren superior medialen Protocerebrum (Abb.6C und Tab.1).

In den Clustern VM, AL2 und VL zeigen alle Somata Oktopamin-Immunoreaktivität während das Cluster ASM nicht vollständig überlappt (Abb.6E-H; Tab.1; Selcho [Diplomarbeit 2006]; Dacks et al. 2005). Zusätzlich markiert *tdc2-GAL4* Zellcluster, die nicht mit dem Oktopaminsignal überlappen. Diese Cluster befinden sich im posterior superior medialen Protocerebrum (PSM), am anterioren Rand des Antennallobus (AL1) und an der Protocerebralbrücke (PB1 und PB2; Abb.6D; Tab.1). *Tdc2-GAL4* färbt keinesfalls alle oktopaminergen Neurone im adulten Gehirn. Im Ellipsoidkörper findet man beispielsweise Oktopamin-Immunoreaktive Verzweigungen, aber keine Projektionen GAL4 positiver Neurone. Sinakevitch und Strausfeld (2006) identifizierten zusätzliche oktopaminerge Zellcluster, die nicht von *tdc2-GAL4* markiert werden. Jedoch bestehen diese Cluster aus einer relativ geringen Zahl an Neuronen.

### 1.12 Zielsetzung

Die Funktion und die Organisation des oktopaminergen Systems ist in der Peripherie verschiedener Insektenpezies, wie Heuschrecken, Grillen, Schaben und Stabheuschrecken, auf Einzelzellebene bekannt (Gras et al. 1990, Spörhase-Eichmann 1992; Denburg und Barker 1992; Pollack et al. 1988; Elia und Gardner 1990; Bartos und Honegger 1992; Arikawa et al. 1984; Tanaka und Washio 1988; Brunn 1989). Um die zelluläre Grundlage oktopaminerner Neuromodulation innerhalb des Zentralnervensystems zu verstehen, ist eine detaillierte morphologische Analyse zentraler oktopaminerner Neurone notwendig. Im Modellorganismus *Drosophila* ist mit Hilfe genetischer Werkzeuge der Zugang zu zentralen oktopaminergen Neuronen möglich.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Beschreibung und Kategorisierung individueller oktopaminerner Neurone im Hirn von *Drosophila m.* Die Kombination der Flp-Out

Technik (Wong et al. 2002) mit der GAL4-Line *tdc2*, sollte die Färbung einzelner oktopaminerger Neurone ermöglichen. Da *tdc2-GAL4* nicht alle Oktopamin-immunoreaktive Zellcluster im Gehirn markiert, beschränkt sich die Einzelzellanalyse auf die Cluster AL2, VL, ASM und VM. Um prä- und postsynaptische Regionen voneinander zu unterscheiden, wurde die subzelluläre Lokalisation entsprechender Markerproteine, d.h. Syt-HA bzw. Rdl-HA, analysiert (Sanchez-Soriano et al. 2005; Robinson et al. 2002).

Oktopaminerge Mittellinienneurone des Subösophagealen Ganglions zeigen eine besondere Morphologie. Sie versorgen weite Bereiche des Zentralgehirns mit extensiven Verzweigungen (Bräunig und Pflüger 2001). Auch die zelluläre Zusammensetzung des Mittellinienclusters ist außergewöhnlich, da es aus gepaarten und ungepaarten Neuronen besteht (Kreissl et al. 1994; Sinakevitch et al. 2005; Sinakevitch und Strausfeld 2006; Stevenson und Spörhase-Eichmann 1995). Um die Ordnung hinter dieser komplexen Organisation zu verstehen, sollten die embryonalen Anlagen der verschiedenen Mittellinienneurone verglichen werden. Dazu wurde ein neues genetisches Werkzeug hergestellt, mit dessen Hilfe man nur die oktopaminergeren Neurone färben kann, die von der embryonalen Mittellinie abstammen.

Diese Arbeit soll nicht nur einen Einblick in die Architektur individueller Neurone, sondern auch über die Organisation des oktopaminergeren Systems auf Einzelzellebene erbringen. Ein Vergleich mit anderen Spezies könnte konservierte anatomische Merkmale des oktopaminergeren Systems verdeutlichen und Einblicke in dessen Evolution liefern.



## 2. Materialien

### 2.1 Fliegenstämme

Genotyp	Quelle
$w^*$ ; $Sp/CyO$ ; $TM2/TM6b$ , $Tb^1$	Würzburger Fliegensammlung
$y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4$ ; $P\{Tdc2-GAL4.C\}2/CyO$	H. Tanimoto
$w^*$ ; $P\{Tdc2-GAL4.C\}2/CyO$	Cole et al. 2005
$y^* w^* P\{hsp70-flp\}1$ ; $P\{UAS(FRT.CD2.y^*)CD8-GFP\}/CyO$ ; $TM2/TM6b$ , $Tb^1$	Wong et al. 2002
$w^* P\{UAS-Rdl.HA\}$ ; $P\{UAS-Rdl.HA\}$	Sanchez-Soriano et al. 2005
$w^* P\{UAS-HA-syt\}$ ; $Syn^{97}$	Robinson et al. 2002
$w^{1118}$ ; $P\{UAS-EGFP\}34/TM3$ , $Sb^1$	Bloomington #5430
$y^* w^* P\{hsp70-flp\}1$ ; $P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/cyO$ ; $TM2/TM6b$ , $Tb^1$	Chee Hon Lee; Gary Struhl
$y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4$ ; $P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/CyO$ ; $P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL6$	L. Luo
Wildtyp CantonS	Würzburger Fliegensammlung

**Tabelle 2.** Verwendete Fliegenstämme. Genotyp der Balancer-Chromosomen:  $CyO = In(2LR)O$ ,  $Cy^1 cn^2 dp^{IV1} pr^1$ ;  $TM6b = In(3LR)TM6b$ ,  $Antp^{HU} e^1 Tb^1$ ;  $TM2 = In(3LR)$ ,  $Ubx^{130} e^s emc^2$ ;  $TM3 = In(3LR)TM3$ ,  $Sb^1 Ubx^{bx-34e} e^1 kni^{fi-1} I(3)89a^1 p^1 w^{sep}$

## 2.2 Reagenzien/Materialien für Klonierung

Enzym	Art.Nr.	Puffer	Art.Nr.
NotI	#ER0591	10x Puffer R	#BR5
SpeI (BcuI)	#ER1251	10x Puffer G	#BG5
XbaI	#ER0681	10x Puffer O	#BO5
XhoI	#ER0691	10x Puffer Tango	#BY5
BamHI	#ER0051	10x Puffer Ecl136II Sacl	#B26
KpnI	#ER0521		
SacI	#ER0431		
DraI	#ER0221		

**Tabelle 3.** Restriktionsenzyme bzw. -Puffer. Firma: Fermentas (Burlington, Kanada).

Primer	Sequence	T <sub>M</sub> [°C]	Verwendung
<b>3,7_sim_5</b>	5'- GAT TAC TAG TAT TTA TTT TAC CGC TTC ATT ACC -3'	62	Amplifikation
<b>3,7_sim_3</b>	5'- ATT ACT CGA GTT TAA AGA TAT CCT TTT TTA TAG ATC C -3'	62,8	Amplifikation
<b>FLP_5</b>	5'- ATT AGC GGC CGC CAA AAA AAT GCC ACA ATT TGG TAT A -3'	63,3	Amplifikation
<b>FLP_3_102</b>	5'- ACT ATC TAG AAT ACA GCT CAC TGT TCA CGT -3'	64	Amplifikation
<b>FLP_0153</b>	5'-TGGCCCAAATCTCACATT-3'	52,4	Sequenz.
<b>FLP_0453</b>	5'-ATACCCCGCATGGAATGG-3	56	Sequenz.
<b>FLP_5871</b>	5'-GATTCCTGCTTGGAATTT-3'	52,4	Sequenz.
<b>FLP_6171</b>	5'-GAACGTTGATCCGAAATCA-3'	52,4	Sequenz.
<b>T7</b>	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	53,2	Sequenz.
<b>T3</b>	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	53,2	Sequenz.

**Tabelle 4.** Primerliste. Firma: Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

Ampicilin:

100ng/ml

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

EDTA

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Art.Nr.: 8043.2

Bromphenol Blau Natriumsalz

Firma: AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Art.Nr.: A3640.0010

Xylene Cyanol

Firma: Sigma Aldrich (St. Louis, MO)

Art.Nr.: 335940-10G

Agarose

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Art.Nr.: 2267.3

Tris

Firma: AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Art.Nr.: A1086.5000

Ethanol

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Art.Nr.: 9065.4

Borsäure

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Art.Nr.: 6943.3

Bacto Trypton Firma: Carl Roth GmbH

(Karlsruhe, Deutschland)

Art.Nr.: 8952.3

Yeast Extract

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Art.Nr.: 2363.2

SDS

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Art.Nr.: 4360.2

Agar-Agar

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Art.Nr.: 2266.2

One Shot Top 10 Competent Cells:

Firma: Invitrogen (Carlsbad, CA)

Art.Nr. : C404010

S.O.C.-Medium:

One Shot Top10 Competent Cells Kit

Firma: Invitrogen (Carlsbad, CA)

Art.Nr. : C404010

T4-DNA-Ligase

Firma : Fermentas (Burlington, Kanada)  
Art.Nr. : #EL0014

dNTP Set

Firma: Fermentas (Burlington, Kanada)  
Art.Nr.: #R0181

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase

Firma : Finnzymes (Espoo, Finnland)  
Art.Nr. : F-530S

5x Phusion GC Reaction Buffer

Firma : Finnzymes (Espoo, Finnland)  
Art.Nr. : F-519

DMSO

Firma : Finnzymes (Espoo, Finnland)  
Art.Nr. : F-515

Vektoren

*pBluescript II SK (+/-)*

Firma: Stratagene (La Jolla, CA)  
Siehe Abb.7

10x Ligations-Puffer für T4-DNA-Ligase

Firma : Fermentas (Burlington, Kanada)

Gene Ruler 1kb DNA Ladder

Firma: Fermentas (Burlington, Kanada)  
Art.Nr. : #SM0311

QIAprep Spin Miniprep Kit

Firma : Qiagen (Hilden, Deutschland)  
Art.Nr. : 27104

Hi Speed Plasmid Midi Kit

Firma : Qiagen (Hilden, Deutschland)  
Art.Nr. : 12643

QIAquick Gel Extraction Kit

Firma : Qiagen (Hilden, Deutschland)  
Art.Nr. : 28704

*pCaSpeR-hsp70/247-Gal80*

Backbone: pCaSpeR- hs  
Referenz: Knapek S.  
Siehe Abb.7

### 2.3 Reagenzien/Materialien für Immunhistochemie

Antigen	Immunogen	Hersteller, Spezies, Typ, Art.Nr.	Verwendete Konzentration
Green Fluorescent Protein (GFP)	GFP direkt isoliert aus <i>Aequorea victoria</i>	Molecular Probes (Eugene, OR), rabbit polyclonal, #A6455	1:5000
<i>Maus</i> CD8 $\alpha$ Kette	Con A-stimulierte BALB/c T Zellen	Invitrogen (Carlsbad,CA), rat monoclonal, #MCD0800	1:100
<i>Influenza</i> Hemagglutinin Epitop (YPYDVPDYA)	Synthetisches Peptid, CYPYDVPDYASL	Covance (Berkeley, CA), mouse monoclonal, clone 16B12, #MMS-101P	1:1000
<i>Drosophila</i> Synapsin	Erstes offense Leseraster des <i>Drosophila</i> Synapsin Proteins	Klagges et al., mouse monoclonal	1 :20

**Tabelle 5.** Primäre Antikörper. Die spezifität der primären Antikörper wurde in Busch et al. 2009 kontrolliert.

Antikörper	Produktbezeichnung	Hersteller, Art.Nr.	Verwendete Konzentration
Alexa 488 $\alpha$ -rabbit	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Molecular Probes Art.Nr.: A11034	1:1000
Cy3 $\alpha$ -mouse	CyTM3 conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Art.Nr.: 115-166-003	1:250
Cy3 $\alpha$ -rat	CyTM3 conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Rat IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Art.Nr.: 112-166-003	1:500

**Tabelle 6.** Sekundäre Antikörper.

NaCl

Firma: Fluka AG (Buchs, Schweiz)  
Art.Nr.: 71381

KCl

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)  
Art.Nr.: 6781.3

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Firma: Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)  
Art.Nr.: 1.04873.0250

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Firma: AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)  
Art.Nr.: A3593.1000

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)  
Art.Nr.: 2370

MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)  
Art.Nr.: 2189.1

10% Formaldehyd (10% FA)

Firma: AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Art.Nr.: A3684

TritonX 100

Firma: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Art.Nr.: 6683

Glycerin

Firma: AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Art.Nr.: A3552

Normal Goat Serum

Firma: Jackson Immuno Research (West Grove, PA)

Art.Nr.: 005-000-121

Vectashield - Mounting Medium For

Fluorescence

Firma: Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA)

Art.Nr.: H-1000

Entellan

Firma: Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)

Art.Nr.: 107961.0500

Konfokales Mikroskop:

Leica CLSM SP 1

Leica CLSM SP2

Firma: Leica (Wetzlar, Deutschland)

Software:

ImageJ (Freeware; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

Adobe Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, CA)

## 2.4 Lösungen/Puffer für Klonierung

### Homogenisierungspuffer

0,1M NaCl  
0,1M Tris/HCL (pH 8,0)  
0,05M EDTA  
0,5% SDS

### 6x Stop-Puffer

83,3% Glycerol  
0,08% Brom-Phenol blau  
0,08% Xylene Cyanol FF  
16 mM Tris-HCl  
83 mM EDTA  
in dest. Wasser

### großes Agarose-Gel (200ml)

0.8% Agarose  
60 µg/ml Ethidium-Bromid  
in 1x TBE

### kleines Agarose-Gel (50ml)

0.8% Agarose  
60µg/ml Ethidium-Bromid  
in 1x TBE

### Markerlösung

~83,3 ng DNA/µl in 1x Stop-Puffer

### Laufpuffer TBE 10X

0,5M Tris  
0,5M Borsäure  
25mM EDTA  
in dest. Wasser

### LB-Medium (1l, pH 7,4)

Bacto Trypton 10g  
Yeast Extract 5g  
NaCl 10g  
in dest. Wasser

### Agarplatten mit Ampicilin

LB-Medium pH 7,4 1 l  
Agar-Agar 16 g  
Ampicilin (100ng/ml) 1ml

### Medium für Mini- und Midi-Kulturen

LB Medium und Ampicilin im Verhältnis  
1:1000



## 2.5 Lösungen/Puffer für Immunhistochemie

### Ringer-Lösung (pH 7)

128 mM NaCl  
5 mM KCl 0,35g  
0,35 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,43 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
4 mM  $\text{MgCl}_2$   
in dest. Wasser

### 10x PBS

70 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
30 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
1.3 M NaCl  
in dest. Wasser

### PBT (0,3% TritonX)

0,3% Triton-X-100  
in 1x PBS (pH 7,4)

### 4% Formaldehyd-Lösung

4% Formaldehyd  
0,3% Triton-X-100  
in 1x PBS (pH 7,4)

### 2% Formaldehyd-Lösung

2% Formaldehyd  
0,3% Triton-X-100  
in 1x PBS (pH 7,4)

### Blocklösung

3% normal goat  
in PBT

### 7% Agarose

7% Agarose  
in dest. Wasser

## **3. Methoden**

### **3.1 Klonierung**

#### **3.1.1 Klonierungsstrategie von *pCaSpeR-hsp70/3.7sim-flp***

Für die Klonierung von *P{3.7sim-flp}* wurde genomische DNA des Wildtypstammes *CantonS* isoliert. Um den frühen Promotor des Gens *sim* zu amplifizieren (ein 3.7 kb großes Fragment 5` des zweiten Exons), der spezifisch in der embryonalen Mitellinie aktiv ist (Nambu et al. 1991), wurden die PCR-Primer *3.7\_sim\_5* und *3.7\_sim\_3* (Tab. 4) verwendet. Das PCR Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Spe1* und *Xho1* in den Zwischenvektor *pBluescript II SK (+/-)* kloniert.

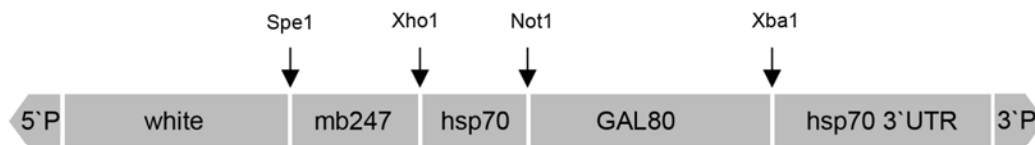
Die kodierende Sequenz des Gens *flp* wurde aus der Linie *y\* w\* P{hsp70-flp}1* (Tab.7). amplifiziert. Dazu wurde das Primerpaar *FLP\_5* und *FLP\_3\_102* (Tab. 4) verwendet. Über die Restriktionsschnittstellen *Not1* und *Xba1* wurde auch *flp* in *pBluescript II SK (+/-)* kloniert. Die Identität des Fragments *3.7sim* wurde durch Sequenzierung des 5` bzw. 3` Endes überprüft. Die gesamte *flp* cDNA wurde sequenziert, um Punktmutationen auszuschließen.

In zwei Schritten wurden *3.7sim* und *flp* in den Zielvektor *pCaSpeR-hsp70/247-GAL80* (Abb.7) kloniert. Dazu wurden dieselben Restriktionsschnittstellen verwendet wie zuvor. Auf diese Weise wurde *3.7sim* 5` des *hsp70* minimal Promotors inseriert. Dabei ersetzte das PCR Fragment die *mb247* Promotorsequenz. Das Fragment *flp* ersetzte die für *GAL80* kodierende Sequenz, die sich 3` des *hsp70* minimal Promotors befand (Abb.7).

#### **3.1.2 Isolierung genomischer DNA**

Um genomische DNA zu isolieren, wurden jeweils 3 Ansätze vorbereitet. Pro Ansatz wurden 10 Fliegen in 100 µl Homogenisierungspuffer zerrieben. Anschließend inkubierte das Homogenat 30 Minuten bei 68°C. Nach Hinzugabe von 40 µl 8M K-Acetat inkubierten die Ansätze weitere 30-50 min auf Eis. Es folgte 10 minütiges Zentrifugieren bei 13000U/min. Zum Überstand wurde 1 ml 100% Ethanol gegeben bevor die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubierten. Danach wurden die Ansätze 20 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 200µl 70 % EtOH gewaschen und erneut 5 Minuten abzentrifugiert. Nachdem das Pellet an der

## pCaSpeR-hsp70/mb247-GAL80



## pCaSpeR-hsp70/3.7sim-flp



**Abbildung 7.** Vektorkarten von *pCaSpeR-hsp70/mb247-GAL80* und *pCa-SpeR-hsp70/3.7sim-GAL80*. Zur Klonierung von *pCa-SpeR-hsp70/3.7sim-GAL80* wurden die Fragmente *mb247* bzw. *GAL80* durch *3.7sim* und *flp* ersetzt. Dazu wurden die entsprechenden Restriktionsschnittstellen verwendet (Spe1 und Xho1 bzw. Not1 und Xba1). Das „Rückrat“ beider Vektoren entspricht dem von *pCaSpeR-hsp70* (Pirotta 1988).

Luft getrocknet war, wurde es in 10µl dest. Wasser (10 µl H<sub>2</sub>O pro 10 Fliegen) gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten DNA an einem Photometer bestimmt.

## 3.1.3 PCR-Ansatz

mit DMSO:

5× Phusion GC Buffer	10µl
10mM dNTPs	1µl
Primer a	2µl
Primer b	2µl
DNA- Template	1µl
DMSO	1,5µl
Phusion DNA- Polymerase	0,5µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>32µl</u>
	50 µl

ohne DMSO:

5× Phusion GC Buffer	10µl
10mM dNTPs	1µl
Primer a	2µl
Primer b	2µl
DNA- Template	1µl
Phusion DNA- Polymerase	0,5µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>33,5µl</u>
	50 µl

Die Annealing-Temperaturen der Primerpaare *3,7\_sim\_5* / *3,7\_sim\_3* und *FLP\_5* / *FLP\_3\_102bp* betrug 55,2°C bzw. 52°C.

### **3.1.3 Restriktionsverdau**

Das Endvolumen der Restriktionsansätze wurde auf 20µl festgelegt. In den Testverdau beliefen sich die DNA-Mengen zumeist auf ca. 500 ng, bei Klonierungsschritten (zur Ligation) auf 1-2 µg.

Zusätzlich kamen zu den Ansätzen je 1µl der jeweilig verwendeten Restriktionsenzyme sowie 2µl des zu diesen Enzymen passenden Puffers. Um das Endvolumen zu erreichen, wurden die Ansätze mit dest. Wasser aufgefüllt. Die Inkubation der Ansätze lief über 1,5 h bei 37°C. Nach dem Verdau wurde zu den Proben 4 µl 6x Stop-Puffer hinzugegeben.

### **3.1.4 Ligation**

Das Endvolumen der Ligationsansätze wurde auf 30µl festgelegt. Das molare Verhältnis von eingesetzter Vektor- und Insert-DNA variierte von 1:1 bis 1:4. Von dem Enzym Ligase wurde 1µl und vom 10x Ligase-Puffer 3µl eingesetzt. Mit dest. Wasser wurde der Ansatz auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Die Ligation erfolgte dann bei 18°C über Nacht.

### **3.1.5 Transformation von Bakterien/ DNA Isolierung aus Agarose und Bakterienkulturen**

Für die Transformation von Bakterien sowie die Isolierung von DNA aus Agarose bzw. Mini- und Midikulturen wurden das „One Shot Top 10 Competent Cells Kit“, das „QIA-GEN Gel Extraction“ Kit, das „QIAprep Spin MiniprepKit“ bzw. das „Hi Speed Plasmid Midi Kit“ verwendet. Die entsprechenden Protokolle sind der Betriebsanleitung zu entnehmen.

### **3.1.6 Ansetzen von Minikulturen**

Von den Agar-Platten wurden Klone mit einer Pipettenspitze gepickt und in jeweils 1 Reagenzglas mit 2,5 ml LB-Medium + Ampicilin (1:1000) gegeben. Die Proben wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 3.1.7 Ansetzen von Mikokulturen

Nach Testverdaus waren die positiven Klone erkennbar. Von ihnen wurden die restlichen 1ml der Mikokultur zu 50-100ml LB-Medium + Ampicilin (1:1000) gegeben und bei 37°C über Nacht auf dem Rüttler inkubiert.

### 3.1.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung von *pBluescript-3,7sim* bzw. *pBluescript-flp* und die Synthese der entsprechenden Primer übernahm die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland). Für die verschiedenen Primer wurde jeweils ein Ansatz benötigt. Je Ansatz wurde 1µg DNA (gelöst in Wasser) verschickt. Um das 5' bzw. 3' Ende von dem klonierten Fragment *3,7sim* zu sequenzieren, wurden die Standard Primer T7 und T3 verwendet (Tab. 4). Die Primer T7, *FLP\_1053*, *FLP\_0453*, *FLP\_5871* sowie *FLP\_6171* wurden ausgesucht (Tab. 4), um überlappende Abschnitte des Fragments *flp* zu sequenzieren. Auf diese Weise konnte die komplette Sequenz des Fragments bestimmt werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden von Eurofin MWG Operons in digitaler Form übermittelt.

### 3.1.9 Transformation der Fliegen

Die Transformation der Fliegen übernahm die Firma Best Gene Inc. (Chino Hills, CA). Hierzu wurde ein Ansatz mit 50 µg DNA (gelöst in Wasser) versandt. Zur Injektion wurden Embryonen des Genotyps  $w^{1118}$  verwendet. Im adulten Stadium wurden einzelne Individuen (G0) mit  $w^{1118}$  rückgekreuzt. Transformanten aus dieser Kreuzung (G1) wurden erneut mit  $w^{1118}$  gepaart, um diese Linien zu verbreitern. Die daraus hervorgehende G2 Generation wurde per Luftpost von Best Gene Inc. verschickt.

## 3.2 Kreuzungsschemen

Die im folgenden dargestellten Stämme bzw. Kreuzungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, auf Standard-Drosophila Medium bei 25°C und unter einem konstanten Tag-Nacht-Zyklus (14/10 Stunden) aufgezogen.

Genotyp	Kreuzung (Anhang)
$w^*$ ; $P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/cyO$ ; $TM2/TM6b$ , $Tb^1$	13.1.2.1
$w^*$ $P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4$ ; $Sp/CyO$ ; $TM2/TM6b$ , $Tb^1$	13.1.2.2
$w^*$ $P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4$ ; $P\{Tdc2-GAL4.C\}2$ , $P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/cyO$ ; $TM2/TM6b$ , $Tb^1$	13.1.2.3
$y^*$ $w^*$ $P\{hsp70-flp\}1$ ; $Sp/CyO$ ; $TM2/TM6b$ , $Tb^1$	13.1.2.4
$y^*$ $w^*$ $P\{hsp70-flp\}1$	13.1.2.5
$w^*$ ; $P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO$ ; $TM2/TM6b$ , $Tb^1$	13.1.2.6
$y^*$ $w^*$ $P\{hsp70-flp\}1$ ; $P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO$ ; $TM2/TM6b$ , $Tb^1$ ; $P\{UAS-EGFP\}34/TM2$	13.1.2.7

**Tabelle 7.** Etablierte Fliegenstämme.

### 3.2.1 Stabile Stämme der $P\{3.7sim-flp\}$ Insertionen

Die Transformation der Fliegen erbrachte 6 Linien mit unterschiedlichen Insertionen ( $w^{1118}$ ;  $P\{3.7sim-flp\}\#1 - \#6$ ). Von diesen Linien (G2-Generatiom) wurden Männchen mit Weibchen des Genotyps  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  verkreuzt. Unter den Nachkommen (F1) wurden Männchen selektiert, die  $Sp$ ,  $TM2$  und die Insertion (gelbe bzw. rote Augen) trugen. Sie wurden mit  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  rückgekreuzt.

Die nächste Generation (F2) wurde systematisch auf die Kombination von Augenfarbe und Balancer-Chromosomen untersucht. Daran war erkennbar auf welchem Chromosom die Insertion liegt. Trägt beispielsweise ein Nachkomme  $TM2$  und  $TM6b$  und hat zudem noch rote Augen, so kann man ausschließen, dass die entsprechende Insertion auf Chromosom III liegt.

Keine der Insertionen befindet sich auf dem X-Chromosom, da in der F1 Generation jeweils Männchen und Weibchen mit roten Augen zu finden waren. Jeweils 3 Insertionen liegen auf dem II. (#3, 4 und 5) bzw. III. Chromosom (#1, 2 und 6).

Aus der F2 Generation wurden Männchen und Jungfrauen des gleichen Genotyps selektiert und verkreuzt. Daraus resultierten Linien, die ihre jeweiligen Insertionen über bestimmten Balancer-Chromosomen tragen. Insertion #5 wurde verworfen, da sie lethal über  $CyO$  ist. Die Kreuzungsschemen für jede Linie sind im Anhang angeführt (13.1.1).

### 3.2.2 Verschiedene Genotypen

Verschiedene Fliegenstämme, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, mussten erst generiert werden (Tab. 5). Die entsprechenden Kreuzungsschemen sind in Anhang 13.1.2 angeführt.

### 3.2.3 Kartierung von prä- und postsynaptischen Regionen

*Tdc2-GAL4* markiert eine bestimmte Gruppe oktopaminerger Neurone im adulten Gehirn (Busch [Diplomarbeit 2006]). Zur Kartierung von präsynaptischen und dendritischen Regionen wurden Fliegen generiert, die gleichzeitig den Membranmarker *mCD8::GFP* und den präsynaptischen Marker *Syt-HA* bzw. den postsynaptischen Marker *Rdl-HA* exprimieren. Die GAL4 unabhängige Expression der verwendeten Reproterkonstrukte wurde in Busch et al. 2009 kontrolliert.

#### Kartierung von präsynaptischen Regionen

♀ *y\* w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4; P{Tdc2-GAL4.C}2/CyO* × ♂ *w\* P{UAS-HA-syt}; Syn<sup>97</sup>*

↓

♀ *y\* w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4/ w\* P{UAS-HA-syt}; P{Tdc2-GAL4.C}2/+; Syn<sup>97</sup>/+*

#### Kartierung von postsynaptischen Regionen

♀ *y\* w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4; P{Tdc2-GAL4.C}2/CyO* × ♂ *w\* P{UAS-Rdl.HA}; P{UAS-Rdl.HA}*

↓

♀ *y\* w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4/ w\* P{UAS-Rdl.HA}; P{Tdc2-GAL4.C}2/+; P{UAS-Rdl.HA}/+*

### 3.2.4 Einzelzellfärbung

Für Einzelzellfärbungen wurden die Kreuzungen bei 18°C auf Standard Drosophila Medium gehalten. Dabei wurde die Parentalgeneration alle zwei Tage umgesetzt, um eine synchronisierte Entwicklung der Nachkommen zu gewährleisten. Zwischen 3 und 13 Tagen nach Eiablage erhielten die Nachkommen einen 37°C Hitzeschock für 20-30 Minuten, um die Expression von Flipase zu induzieren.





Funtionelle Analyse von *simflp* #3 (II)

♀  $w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; P\{Tdc2-GAL4.C\}2, P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/CyO; TM2/TM6b, Tb1$

X

♂  $w^*; P\{sim-flp\}\#3/CyO$

↓

♀  $w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4/w^*; P\{Tdc2-GAL4.C\}2, P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/P\{sim-flp\}\#3; TM2/+$

Kontrolle *tub*>*GAL80*>

♀  $y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; P\{Tdc2-GAL4.C\}2/CyO$

X

♂  $w^*; P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$

↓

♀  $y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4/w^*; P\{Tdc2-GAL4.C\}2/ P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}; TM2/+$

### 3.3 Immunhistochemie

#### 3.3.1 Immunhistochemische Färbung von „Whole Mount“ Präparaten des adulten

##### Gehirns

3-5 Tage alte Fliegen wurden auf Eis betäubt. Um das Hirn freizulegen, wurden die Kopfkapsel sowie die Tracheen in Ringerlösung entfernt. Die Proben fixierten für 2 Stunden bei Raumtemperatur und wurden anschließend 3 x 10 Minuten in 0,3% PBT gewaschen. Nach 1,5 Stunden Blocken in 3% normal goat Lösung wurden die Proben über Nacht bei 4°C in der primären Antikörper-Lösung (Tab. 5) inkubiert. Am nächsten Tag folgte 6-maliges Waschen in 0,3% PBT. Dann wurden die Proben in der sekundären Antikörper-Lösung inkubiert (Tab. 6), d.h. erneut über Nacht bei 4°C. Vor dem Eindeckeln wurden die Proben 6 x 10 Minuten in 0,3% PBT gewaschen. Zur Einbettung wurde das „Mounting Medium for Fluorescence“ von Vectashield verwendet.

### 3.3.2 Immunhistochemische Färbung von Vibratom-Schnitten des adulten Kopfes

3-5 Tage alte Fliegen wurden auf Eis betäubt. Das Entfernen des Proboscis sowie das Abtrennen des Kopfes vom Thorax erfolgte im Fixativ (2% Formaldehyd-Lösung). Anschließend fixierten die Proben für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach 4-maligen Waschen in 1x PBS wurden die Köpfe in 7% Agarose eingebettet. Von den Proben wurden mit einem Vibratom (Leica, Nussloch; Deutschland) 90µm dicke Saggitalschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden 4 x 15 Minuten in 0,3% PBT gewaschen und anschließend 1,5 h mit 3% normal goat Lösung geblockt. Die Inkubation in der primären Antikörper-Lösung (Tab. 5) erfolgte über Nacht bei 4°C. Dann wurden die Proben 6 x 10 Minuten mit 0,3% PBT gewaschen und über Nacht bei 4°C in der sekundären Antikörper-Lösung (Tab. 6) inkubiert. Die Proben wurden dann 6 x 10 Minuten mit 0,3% PBT gewaschen und in Entellan eingebettet.

### 3.4 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Alle Proben wurden an einem Konfokalen Mikroskop des Typs Leica CSLM SP 1 gescannt. Mit 20x bzw. 40x Objektiven wurden Bilderstapel mit der Schrittgröße 1 bzw. 1,5µm aufgenommen. Bildauswahl und Projektionen wurden mit ImageJ durchgeführt. Mit Adobe Photoshop 7.0 wurden Helligkeit, Kontrast sowie die Farbe der Bilder verändert. Um auch feine Verzweigungen der Neurone deutlich zu machen, wurden diese in weiß (RGB Verhältnis 255:255:255) und die Neuropil-Färbung in orange (RGB Verhältnis 255:85:0) gezeigt. Die Kolo-kalisation von Prä- bzw. Postsynatischen Markern mit mCD8::GFP wurden in magenta und grün dargestellt.

### 3.5 Nomenklatur

Der *Drosophila* Hirnatlas von Otsuna und Ito (2006) und die dazugehörige Nomenklatur wurde als Orientierung zur Beschreibung von GAL4 positiven Neuronen genutzt (Otsuna et al. 2006). Um die verschiedenen Zelltypen eindeutig und systematisch zu benennen, wurde ein hierarchisches Nomenklatur-Muster verwendet. Zu jedem Zelltyp wurde das Präfix „OA“ hinzugefügt, um ihn von anderen Neuronen mit ähnlicher Lokalisation zu unterscheiden. Zellen desselben Clusters aber verschiedener morphologischer Kategorien wurden mit entsprechenden Abkürzungen unterschieden. Zum Beispiel steht i, b, a und d für ipsilateral,

bilateral, aufsteigend bzw. absteigend. Schließlich wurden die verschiedenen Zelltypen einer morphologischen Kategorie durch Nummerierung unterschieden.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Morphologische Polarität von oktopaminergen Neuronen**

*Tdc2-GAL4* markiert etwa 137 Neurone im Sub- und Supraösophagealen Ganglion von *Drosophila*, jedoch nicht alle oktopaminergen Neurone. Ausschließlich die Oktopamin-immunoreaktiven Zellcluster AL2, VL, ASM und VM überlappen mit *tdc2-GAL4* Expression. Die Verzweigungen der markierten Neurone erstrecken sich über das gesamte Hirn, einschließlich markanter Neuropile, wie Antennalloben, Pilzkörper, Zentralkomplex und Optische Loben. Frei von Innervation sind nur der Ellipsoidkörper, die Lamina, sowie die  $\alpha/\beta$  Loben und der Pedunkulus der Pilzkörper (Busch et al. 2009; Busch [Diplomarbeit 2006]; Abb.8).

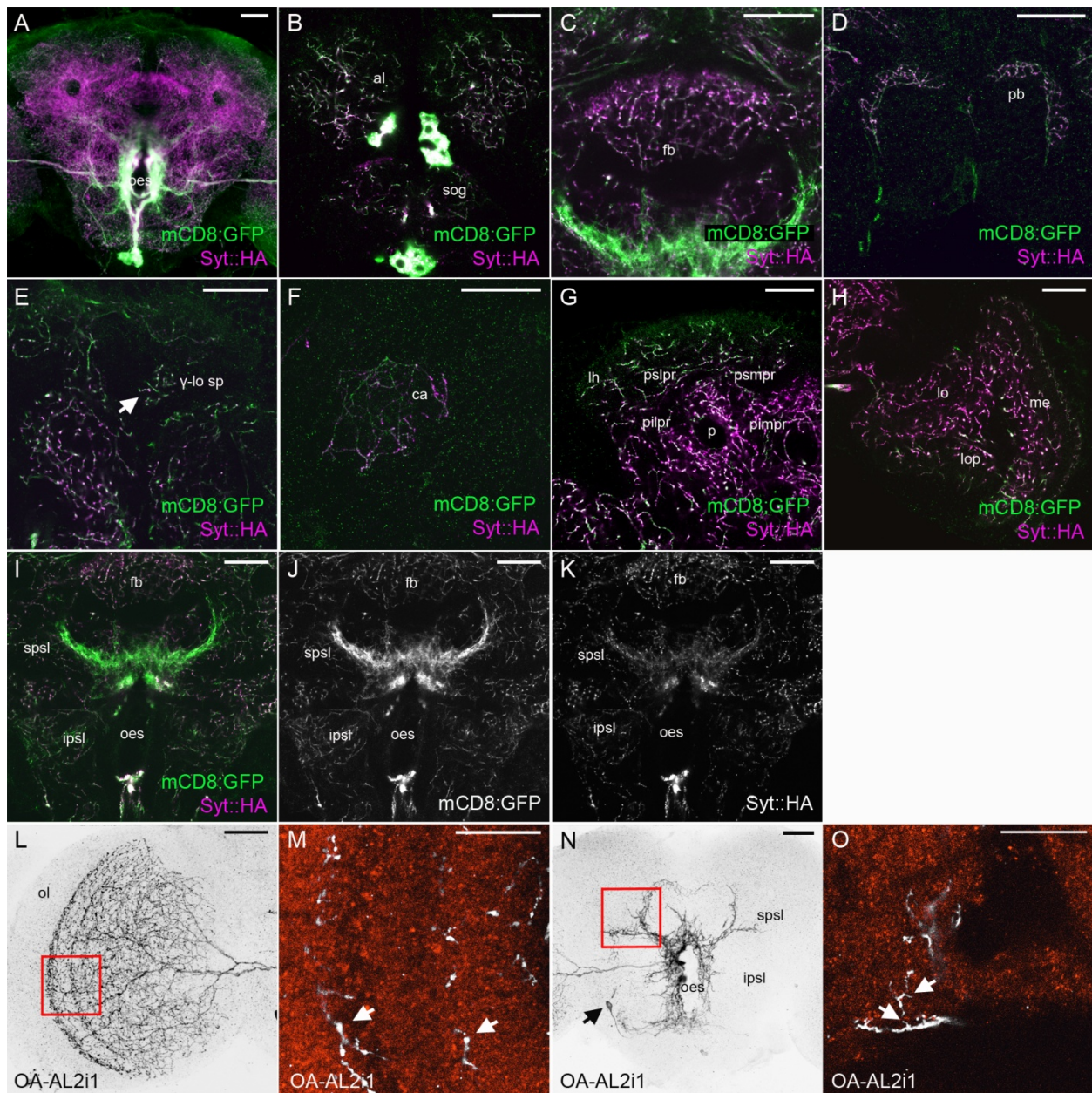
Die Nervenendigungen dieser Neurone weisen eine stark polarisierte Struktur auf, d.h. sie formen dendritische Dornfortsätze in einer bestimmten Region, der posterioren Slope (siehe Hirnats, Otsuna et al. 2006), während varikose Endigungen auf die verschiedenen Hirnregionen verteilt sind (Abb.8 L-O). Diese polarisierte Morphologie ist möglicherweise Ausdruck einer Funktion als Post- bzw. Präsynapsen (siehe auch Busch et al. 2009; Abb.8 und 9; siehe Einzelzell-Morphologie).

Um dies näher zu untersuchen, wurden die post- bzw. präsynaptischen Markerproteine Rdl-HA (Abb.9) und Syt-HA (Abb.8) in den GAL4 positiven Neuronen exprimiert. Gleichzeitig markiert der Membranmarker mCD8::GFP die gesamten Fortsätze der GAL4 positiven Neurone, d.h. sowohl dicke Axone als auch feine Nervenendigungen. Wie erwartet kolokalisiert Syt-HA mit varikosen Nervenendigungen im gesamten Hirn (Abb.8 A-H). Rdl-HA markiert vorwiegend Verzweigungen in der posterioren Slope, welche dünne dendritische Dornen ausbilden (Abb.8N und O, 9). Syt-HA ist kaum in dieser Region zu finden (Abb.8 I-K).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mehrzahl der GAL4 positiven Neurone synaptischen Eingang in der posterioren Slope erhalten. Ihre Zielregionen, an welche Sie das neuromodulatorische Signal übermitteln, scheinen klar von der Eingangsregion getrennt und über das gesamte Hirn verteilt zu sein.

### **4.2 Morphologie von einzelnen oktopaminergen Neuronen**

Die komplexen Verzweigungen der markierten Neurone machen es unmöglich die Morphologie einzelner Zellen nachzuvollziehen. Deshalb wurde der Membranmarker



**Abbildung 8**

mCD8::GFP, mit Hilfe der Flp-Out-Methode, in einzelnen Neuronen von *tdc2-GAL4* exprimiert (Wong et al. 2002). Welche Zelle auf diese Weise gefärbt wird ist zufällig. Nach der Analyse von 1060 Hirnpräparaten (Tab.8) konnten 28 verschiedene Zelltypen kategorisiert werden, basierend auf Zellkörperlage und Projektionsmuster.

Die Neurite und Endigungen der jeweiligen Zelltypen offenbarten eine unerwartete Stereotypie in verschiedenen Proben (Abb.10). Außerdem zeigt die Mehrzahl der analysierten

**Abbildung 8. A-K:** Präsynaptische Regionen von *tdc2-GAL4* Neuronen im adulten Gehirn, markiert mit dem präsynaptischen Marker *Syt-HA* (magenta). *UAS-mCD8::GFP* (grün) färbt die neuronalen Fortsätze derselben Zellen. **A:** Projektion von Konfokal-Aufnahmen. *Syt-HA* (magenta) ist im ganzen Hirn lokalisiert. Die dichten Fortsätze (grün), welche den Ösophagus (oes) umgeben, sind schwächer mit *Syt-HA* gefärbt als andere Hirn-Regionen. **B-H:** Konfokal-Schnitte von bestimmten Hirn-Regionen. Der präsynaptische Marker *Syt-HA* färbt generell varikose Endigungen. **B-D:** Die Antennalloben (al), das SOG (sog), sowie der Fächerförmige Körper (fb) und die Protocerebralbrücke (pb) beinhalten zahlreiche, mit *Syt-HA* markierte, Nervenendigungen. **E, F:** Vergrößerung des Pilzkörpers. Das *Syt-HA* Signal ist detektierbar im Sporn des  $\gamma$ -Lobus ( $\gamma$ -lo sp) und in den Calyces (ca), aber nicht in den vertikalen Loben (siehe Pfeil) und Teilen der Medialen Loben. **G:** Vergrößerung des Protocerebrums. *Syt-HA* markiert varikose Endigungen im gesamten Protocerebrum. lh: Laterales Horn; psldr: posterior superior laterales Protocerebrum; psmpr: posterior superior mediales Protocerebrum; pilpr: posterior inferior laterales Protocerebrum; pimpr: posterior inferior mediales Protocerebrum. **H:** *Syt-HA* kolokalisiert mit Endigungen in den gesamten Optischen Loben, d.h. Lobula (lo), Lobula Platte (lop) und Medulla (me). **I-K:** Konfokale Schnitte durch die posteriore Slope.  $\alpha$ -GFP- bzw.  $\alpha$ -HA-Signal sind getrennt in J und K dargestellt. Im Vergleich zu *mCD8::GFP* markiert *Syt-HA* die Verzweigungen in der superior (spsl) und inferior (ipsl) posterioren Slope nur schwach. **L-O:** Polarisierte Morphologie von Zelltyp OA-AL2i1. Projektion von Konfokal-Aufnahmen der Optischen Loben und der posterioren Slope (L und N). Der rote Rahmen zeigt die vergrößerte Region in M und O. *mCD8::GFP* (weiß) färbt die Verzweigungen von OA-AL2i1 im Neuropil (orange). **L und M:** Varikose Endigungen (siehe Pfeile) in den Optischen Loben. **N und O:** In der posterioren Slope formt OA-AL2i1 Verzweigungen, die mit dendritischen Dornen dekoriert sind (Pfeile in O). Der schwarze Pfeil in N deutet auf eine andere gefärbte Zelle im selben Präparat. Sie innerviert das anteriore Subösophageale Ganglion. Messbalken: 25  $\mu$ m (A-L and N) ; 10  $\mu$ m (M und O).

Neurone die für sie charakteristische morphologische Polarität, d.h. eine klare räumliche Trennung von dendritischen Dornfortsätzen und varikosen Endigungen (Abb.8L-O).

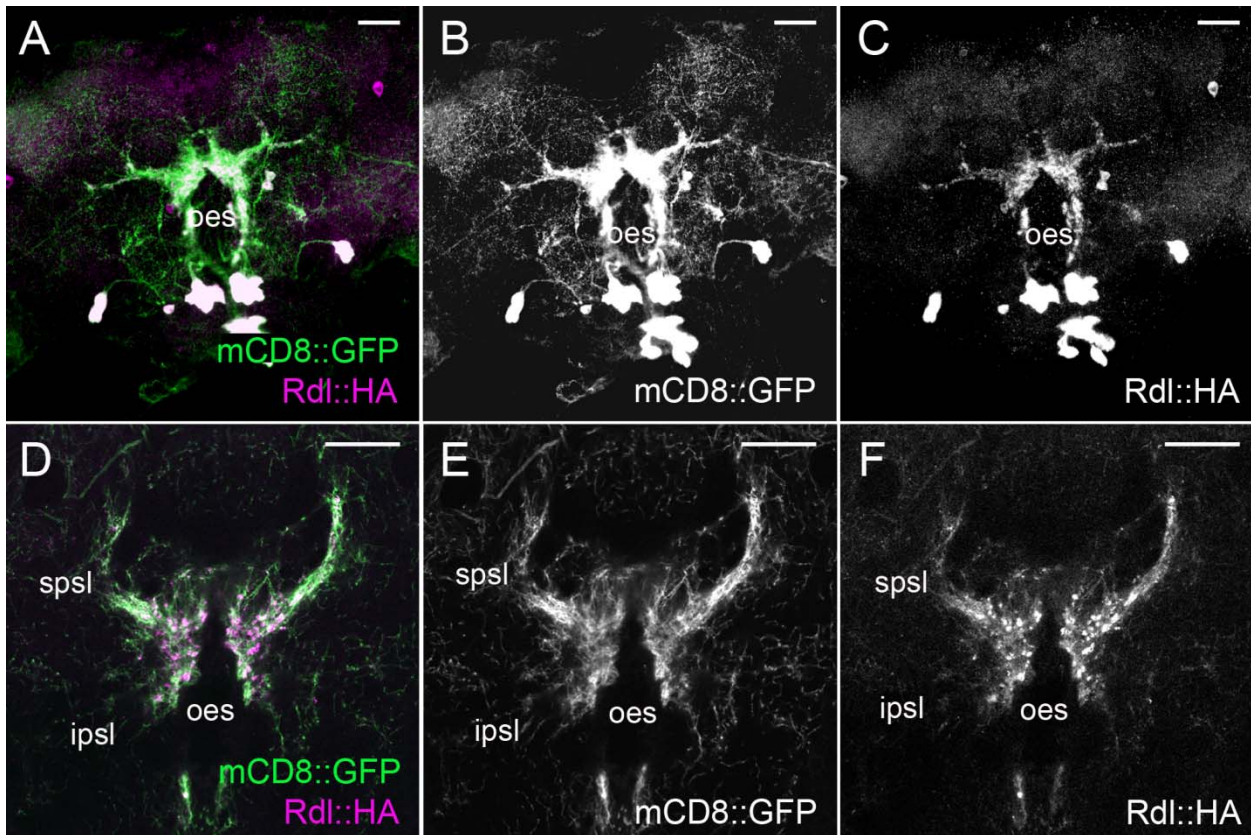
Im folgenden wird für jeden Zelltyp der Oktopamin-immunoreaktiven Cluster AL2, VL, ASM und VM ein Beispiel präsentiert (siehe auch Busch et al. 2009). Eine Beschreibung von Zellen aus anderen oktopaminergen Clustern im Gehirn war nicht möglich, da *tdc2-GAL4* dort keine Expression zeigt (Busch et al. 2009; Selcho [Diplomarbeit 2006]).

Die Nomenklatur der Zelltypen orientiert sich an ihrer Zellkörperlage. Deshalb soll das Präfix „OA“ sie von anderen Neuronen in diesen Regionen unterscheiden. Solche Neurone werden möglicherweise in der Zukunft auf ähnliche Weise benannt.

### 4.3 Antennalloben-Cluster Neurone (OA-AL2)

Das Cluster AL2 besteht aus 7 Zellen. Die anatomische Analyse erbrachte 5 verschiedene Zelltypen. Vier von ihnen innervieren den ipsilateralen Optischen Lobus und tragen den Namen OA-AL2i1-4 (Abb.11). Der fünfte Zelltyp, OA-AL2b1, projiziert zu beiden Optischen Loben (Abb.12). Alle AL2-Neurone weisen eine stark polarisierte Struktur auf, d.h. eine klare Trennung von dendritischen und varikosen Verzweigungen. Die Projektionen der einzelnen Zelltypen sind stereotyp. Beispielsweise zeigt OA-AL2i1 einheitliche Projektionsmuster in verschiedenen Präparaten (Abb.10A-L). Da alle oktopaminergen Zelltypen eine ähnlich reproduzierbare Morphologie aufweisen, ist eine eindeutige Kategorisierung möglich.





**Abbildung 9.** Vermeintliche Input-Regionen von *tdc2-GAL4* Neuronen im adulten Hirn, markiert mit dem postsynaptischen Marker *UAS-Rdl-HA* (magenta). Der Membranmarker *UAS-mCD8::GFP* (grün) wurde koexprimiert, um die gesamten neuronalen Fortsätze zu färben. **A-C:** Projektion von Konfokal-Aufnahmen des Zentralhirns.  $\alpha$ -GFP- bzw.  $\alpha$ -HA-Signal sind getrennt in B und C dargestellt. Rdl-HA markiert vorwiegend Verzweigungen um den Ösophagus (oes). Rdl-HA akkumuliert auch in den Zellkörpern. **D-F:** Konfokal-Schnitte von der posterioren Slope.  $\alpha$ -GFP- bzw.  $\alpha$ -HA-Signal sind getrennt in E und F dargestellt. Der postsynaptische Marker Rdl-HA kolokalisiert mit dendritischen Verzweigungen in der posterioren Slope (spsl, ipsl), d.h. um den Ösophagus (oes). Messbalken = 25 $\mu$ m.

Die Trefferrate einzelner Zellen variiert abhängig vom Zelltyp (Tab.8). Zum Beispiel zeigen OA-AL2i2 und OA-AL2i3 eine relativ hohe Trefferhäufigkeit, was auf die Existenz mehrerer Zellen mit ununterscheidbaren Projektionsmustern hindeutet. Im Gegensatz dazu wurde OA-AL2b1 in nur zwei von 1060 Präparaten gefärbt. Angesichts dieser geringen Trefferrate ist es denkbar, dass in Cluster AL2 weitere, bisher nicht gefärbte, Zelltypen vorhanden sind.

Die Zellkörper der AL2-Neurone befinden sich ventro-medial der Antennalloben (Busch et al. 2009; Busch [Diplomarbeit 2006]). Sie senden einen Neurit entlang des Ösophagus und verzweigen sich posterior der Großen Kommissur. Typischerweise formen sie dort, in der posterioren Slope, dünne dendritische Dornen (Abb. 8N, O, 11B, F, J, und N). Im Fall von OA-AL2i1, OA-ALi2 und OA-AL2i3 breiten sich diese Verzweigungen ipsilateral in das posterior laterale und ventro-mediale Protocerebrum aus (Abb. 11B, G und K). OA-AL2i1 innerviert

Zelltyp	<i>tdc2-GAL4</i> (n=1060)
OA-AL2i1	27
OA-AL2i2	66
OA-AL2i3	37
OA-AL2i4	12
OA-AL2b1	2
OA-VPM1	131
OA-VPM2	7
OA-VPM3	34
OA-VPM4	5
OA-VPM5	2
OA-VUMa1	138
OA-VUMa2	100
OA-VUMa3	99
OA-VUMa4	35
OA-VUMa5	4
OA-VUMa6	5
OA-VUMa7	2
OA-VUMa8	2
OA-VUMd1	13
OA-VUMd2	12
OA-VUMd3	12
OA-VUMd4	-
OA-VL1	26
OA-VL2	21
OA-ASM1	20
OA-ASM2	19
OA-ASM3	100

**Tabelle 8.** Trefferhäufigkeit der Zelltypen aus Cluster VM, AL2, VL und ASM in 1060 Präparaten.



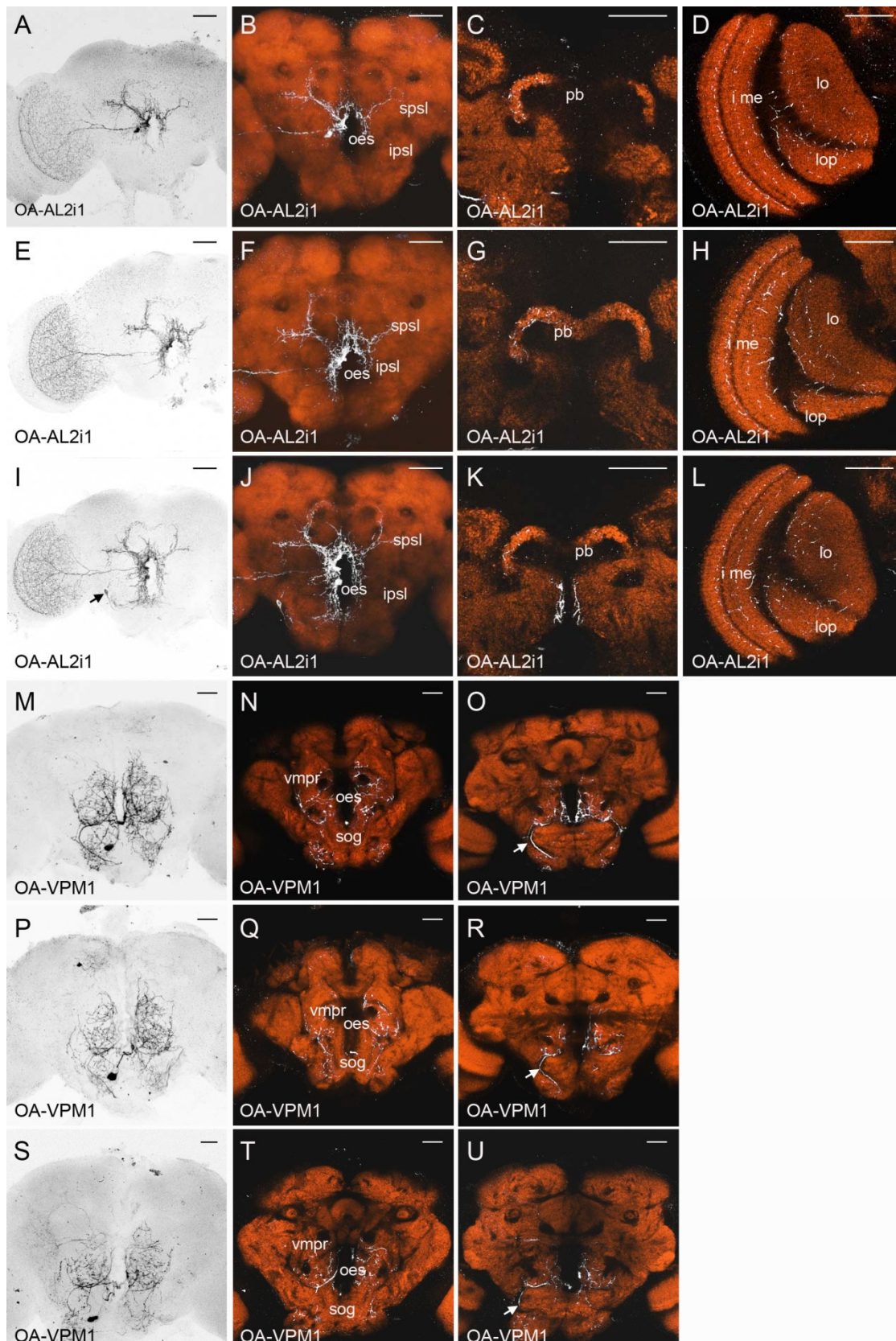


Abbildung 10

**Abbildung 10.** Zwei repräsentative Beispiele für die stereotypen Projektionsmuster der kategorisierten Zelltypen. Projektionsmuster von OA-AL2i1 (A-L) und OA-VPM1 (M-U) in je drei verschiedenen Präparaten. Die linke Spalte zeigt Projektionen von Konfokal-Aufnahmen der gesamten Zellen (markiert mit mCD8::GFP). Die weiter rechts gelegenen Spalten stellen bestimmte Verzweigungen der Zellen (mCD8::GFP, in weiß) im Neuropil (orange) dar. **A-L:** Jedes Präparat von OA-AL2i1 zeigt ähnliche Innervationsmuster in der inferior und superior posterioren Slope (ipsl und spsl in B, F, und J), der Protocerebralbrücke (pb in C, G, und K) und dem Optischen Lobus (D, H und L; I me: innere Medulla, lo: Lobula, lop: Lobula Platte). Der schwarze Pfeil in I markiert eine zweite Zelle, die in diesem Präparat gefärbt ist. **M-U:** Jede Probe von OA-VPM1 weist ähnliche Innervationsmuster im ventro-medialen Protocerebrum (vmpr) und SOG (N, Q, and T) auf. In jedem Präparat kann man einen charakteristischen sekundären Neuriten finden, der vom ventro-medialen Ösophagus (oes) in die ipsilaterale Hemisphäre projiziert (siehe Pfeile in O, R und U). Messbalken = 25 µm.

zusätzlich das posterior inferior mediale Protocerebrum. Alle OA-AL2i Neurone bilden einen sekundären Fortsatz in der posterioren Slope aus, d.h. ventro-lateral zum Ösophagus. Dieser projiziert zum ipsilateralen Optischen Lobus (Abb. 11B, F, J und N). Auf seinem Weg zweigen feinere Äste von dem Fortsatz ab und bilden varikose Endigungen in der inferior posterioren Slope aus (Abb. 11O).

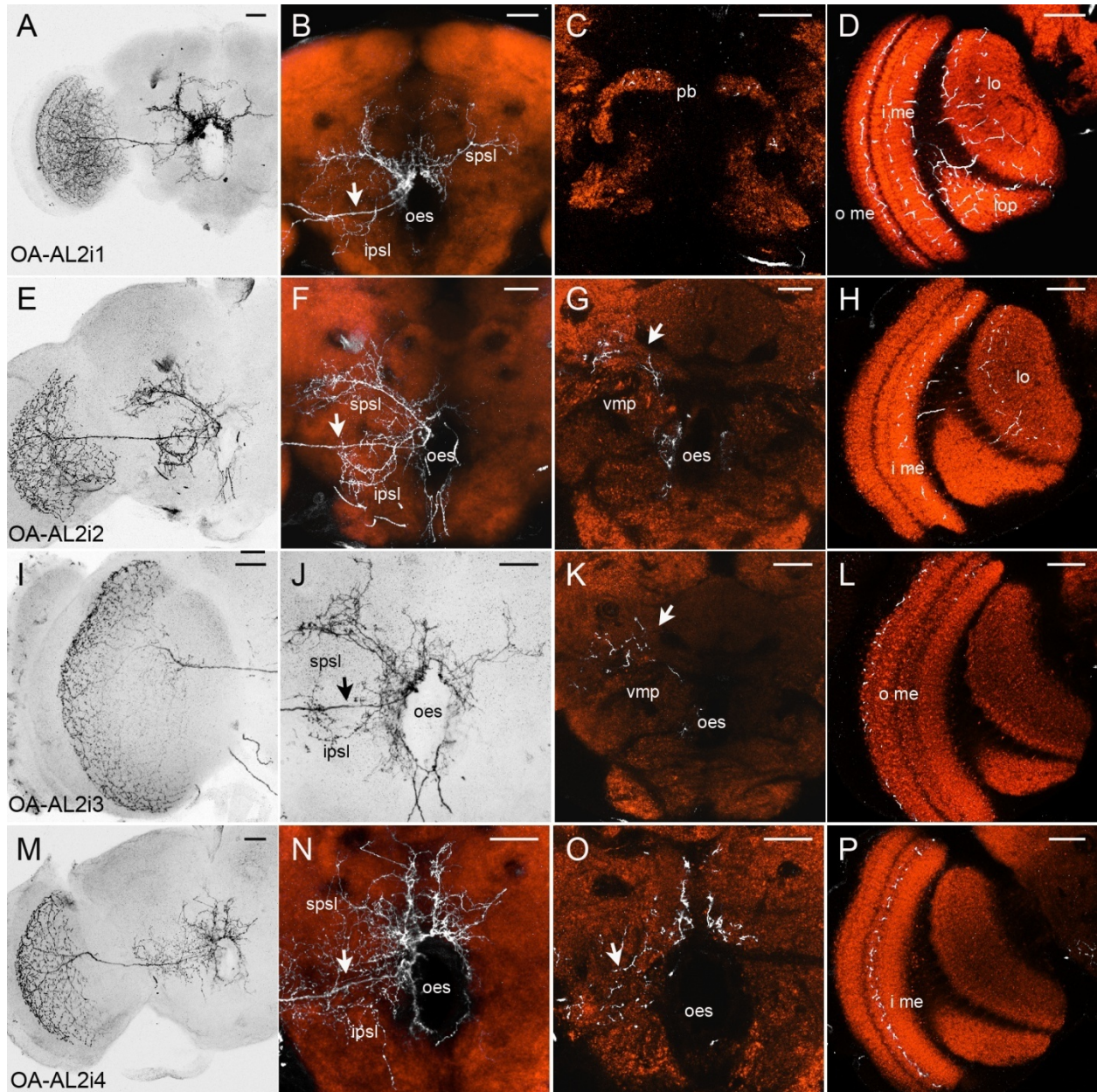
OA-AL2i1-4 zeigen charakteristische Innervationsmuster in den Optischen Loben, wo sie ebenfalls varikose Endigungen formen (Abb. 8L, M, 11D, H, L, und P). OA-AL2i1 innerviert den gesamten Optischen Lobus bis auf die Lamina (Abb. 11D). OA-AL2i2 verzweigt sich in der Lobula und der inneren Medulla (Abb. 11H). OA-AL2i3 und OA-AL2i4 weisen Nervenendigungen in der äußeren (Abb. 11L) bzw. inneren (Abb. 11P) Medulla auf. Ein Zelltyp, OA-AL2i1, projiziert zusätzlich zur Protocerebralbrücke (Abb. 11C).

OA-AL2b1 zeigt eine weitere Eigenschaft: der sekundäre Fortsatz teilt sich gabelförmig dorso-lateral vom Ösophagus, um beide Optische Loben zu innervieren (Abb. 12A und D). In den Optischen Loben verzweigt sich OA-AL2b1 in den Lobulae (Abb. 12B und C). Aus diesen Fortsätzen entstehen zusätzliche Kollaterale, die varikose Endigungen in den posterior lateralen, posterior inferior lateralen und ventro-lateralen Protocerebra ausbilden (Abb. 12B).

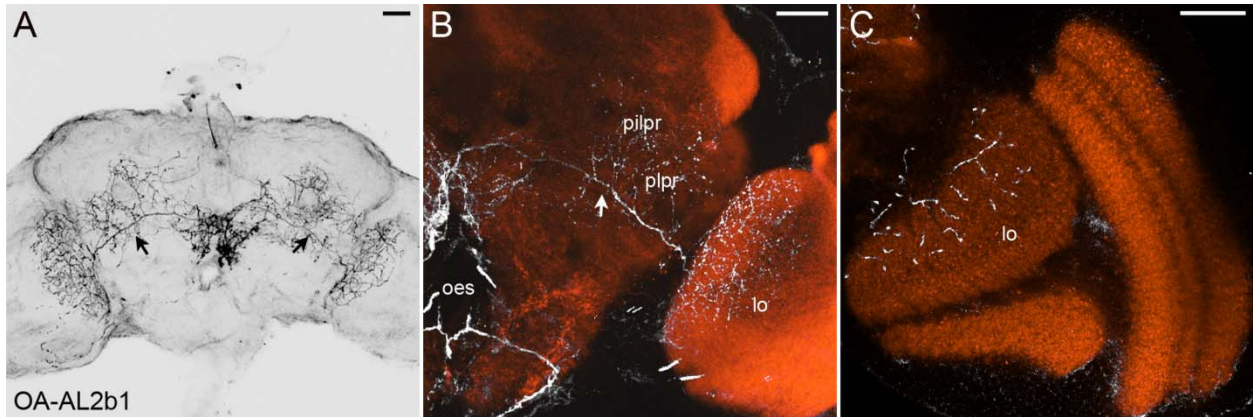
#### 4.4 Neurone des Clusters VL (OA-VL)

In beiden Hemisphären markiert *tdc2-GAL4* zwei Oktopamin-immunoreaktive Zellkörper zwischen den Antennalloben und dem ventro-lateralen Protocerebrum. Die Einzelzellfärbungen erbrachten zwei Zelltypen in diesem Cluster (OA-VL1 und OA-VL2; Abb.13). Beide senden einen primären Fortsatz in das Subösophageale Ganglion, wo er die Mittellinie kreuzt (Abb.13B, E und F). Bilaterale Verzweigungen dieser Zelltypen durchdringen den Antennalnerv, und das Subösophageale Ganglion (Abb.13B, E und F, siehe Pfeile). Auf der ipsilateralen Seite innervieren OA-VL Neurone das inferior laterale und ventro-laterale Protocerebrum.





**Abbildung 11.** Einzelzellfärbung der OA-AL2i Neurone. Jede Reihe illustriert einen bestimmten Zelltyp. Die linke Spalte stellt Projektionen von Konfokal-Aufnahmen dar, welche das Gesamtprojektionsmuster eines jeden Zelltyps zeigen. Die rechts gelegenen Spalten veranschaulichen charakteristische Verzweigungen der Neurone (markiert mit mCD8::GFP, weiß) im Neuropil (orange). Alle OA-AL2i Neurone bilden dendritische Verzweigungen in der posterioren Slope (spsl; ipsl), d.h. um den Ösophagus herum (oes; siehe A, B, E, F, J, M, und N). Aus diesen Verzweigungen heraus entsteht jeweils ein einzelnes Axon, dass nach Lateral, zum ipsilateralen Optischen Lobus, projiziert (siehe Pfeile in B, F, J, und N). C: Im Zentralhirn innerviert OA-AL2i1 zusätzlich die Protocerebralbrücke (pb). D: Im Optischen Lobus verzweigt OA-AL2i1 in der Lobula (lo), der Lobula Platte (lop), der inneren- (i me) und der äußeren Medulla (o me). G: Verzweigungen von OA-AL2i2 erstrecken sich bis ins ipsilaterale ventro-mediale Protocerebrum (vmp; siehe Pfeil). H: OA-AL2i2 innerviert im Optischen Lobus die innere Medulla (i me) und die Lobula (lo). K: Verzweigungen von OA-AL2i3 erstrecken sich bis ins ipsilaterale ventro-mediale Protocerebrum (vmp; siehe Pfeil). L: Im Optischen Lobus verzweigt OA-AL2i3 in der äußeren Medulla (o me). O: Wie alle anderen OA-AL2i Neurone auch, formt OA-AL2i4 varikose Endigungen in der ipsilateralen inferior posterioren Slope (ipsl, siehe Pfeil). P: OA-AL2i4 innerviert im Optischen Lobus die innere Medulla (i me). Messbalken = 25µm.



**Abbildung 12.** Einzelzellfärbung des Zelltyps OA-AL2b1. Die Felder und das Farbschema sind wie in in Abbildung 11 organisiert. **A:** OA-AL2b1 innerviert beide Optische Loben (siehe Pfeile). **B:** Sekundäre Fortsätze senden auf ihrem Weg zu den Optischen Loben (siehe Pfeile) Kollaterale in das posterior laterale Protocerebrum (plpr) und das posterior inferior laterale Protocerebrum (pilpr). **C:** Innervation von OA-AL2b1 in der Lobula (lo). Messbalken = 25µm.

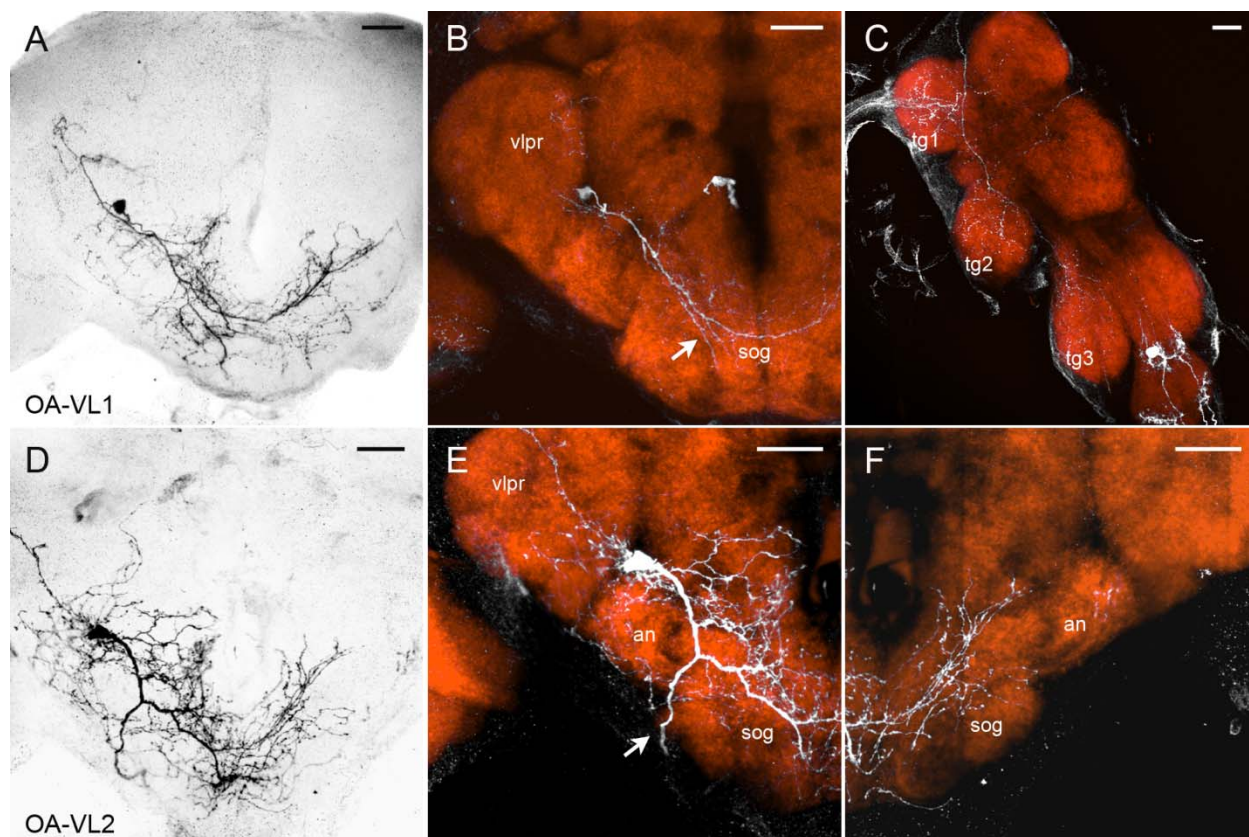
Jeder Zelltyp formt einen sekundären Fortsatz, der medial vom Antennalnerv abzweigt (Abb.13B und E, siehe Pfeile). Seine Projektionsbahn unterscheidet sich in beiden Zelltypen. Im Fall von OA-VL1 projiziert der Fortsatz durch das Subösophageale Ganglion hindurch in die Konnektive (Abb.13B) und verzweigt sich jeweils ipsilateral in den drei Thorakalganglien (Abb.13C). Der Fortsatz von OA-VL2 projiziert auch in die Konnektive, jedoch entlang des lateralen Randes des Subösophagealen Ganglions (Abb.12E, siehe Pfeil).

Unter allen Präparaten trat wiederholt nur die eine oder die andere Variante dieses Merkmals auf und das in vergleichbaren Häufigkeiten (d.h. 26 bzw. 21 Proben für OA-VL1 und OA-VL2; Tab.8). Dies spricht dafür, dass OA-VL1 und OA-VL2 verschiedene Zelltypen sind und nicht morphologische Varianten einer einzigen Zelle.

#### 4.5 Neurone aus Cluster ASM (OA-ASM)

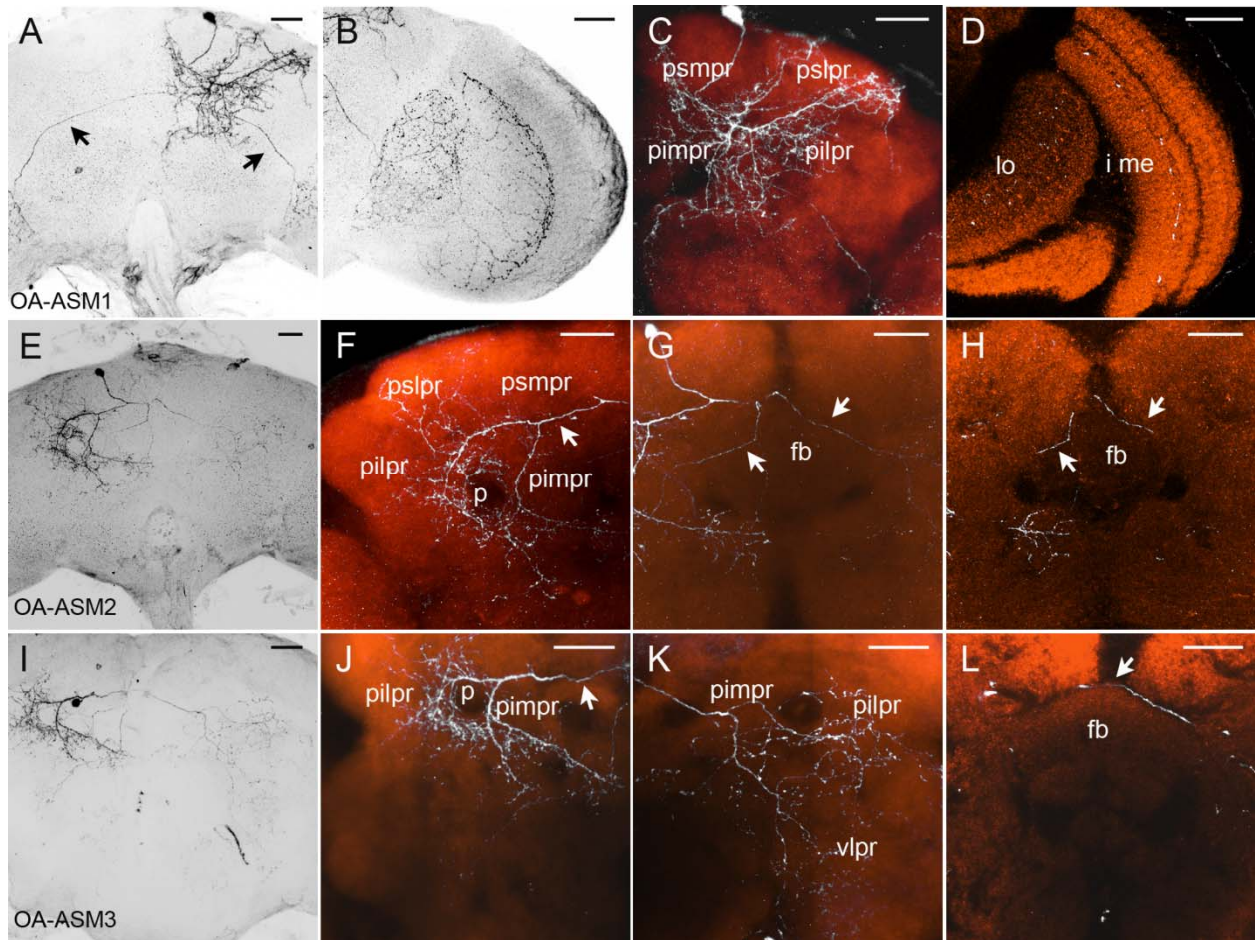
Im anterior superior medialen Protocerebrum markiert *tdc2-GAL4* ungefähr 8 Zellkörper pro Hemisphäre (Busch et al. 2009; Busch [Diplomarbeit 2006]). Jedoch sind nicht alle GAL4 positiven Neurone in diesem Bereich Oktopamin-immunoreaktiv (Busch et al. 2009; Selcho [Diplomarbeit 2006]). Deshalb bleiben die Transmittereigenschaften individueller ASM-Neurone unklar. Die sich wiederholenden Projektionsmustern ließen eine Kategorisierung der ASM-Neurone in 3 Typen zu (OA-ASM1-3; Abb.14; Tab.8). Die Einzelzellfärbungen waren oft sehr schwach, so dass es schwierig war feinen Verzweigungen zu folgen. Deshalb ist es denkbar, dass innerhalb der drei Zelltypen eine weitere Kategorisierung möglich ist.





**Abbildung 13.** Einzelzellfärbung von VL Neuronen. Die Felder und das Farbschema sind wie in Abbildung 11 organisiert. **B:** OA-VL1 sendet einen Neurit ins SOG (sog), wo er die Mittellinie überquert. OA-VL1 verzweigt im ventro-lateralen Protocerebrum (vlpr) und im SOG (sog). Ein einzelner Fortsatz von OA-VL1 (siehe Pfeil) projiziert durch das posteriore SOG in die cervikalen Konnektive. **C:** OA-VL1 innerviert die ipsilateralen Thorakalganglien 1-3 (tg1-3). **E, F:** Der primäre Neurit von OA-VL2 kreuzt im SOG (sog) die Mittellinie. OA-VL2 verzweigt sich im ventro-lateralen Protocerebrum (vlpr), im Antennalnerv (an) und im SOG (sog). Ein einzelner Fortsatz von OA-VL2 (siehe Pfeil) projiziert entlang des lateralen Randes des SOG (sog) in die cervikalen Konnektive. Messbalken = 25µm.

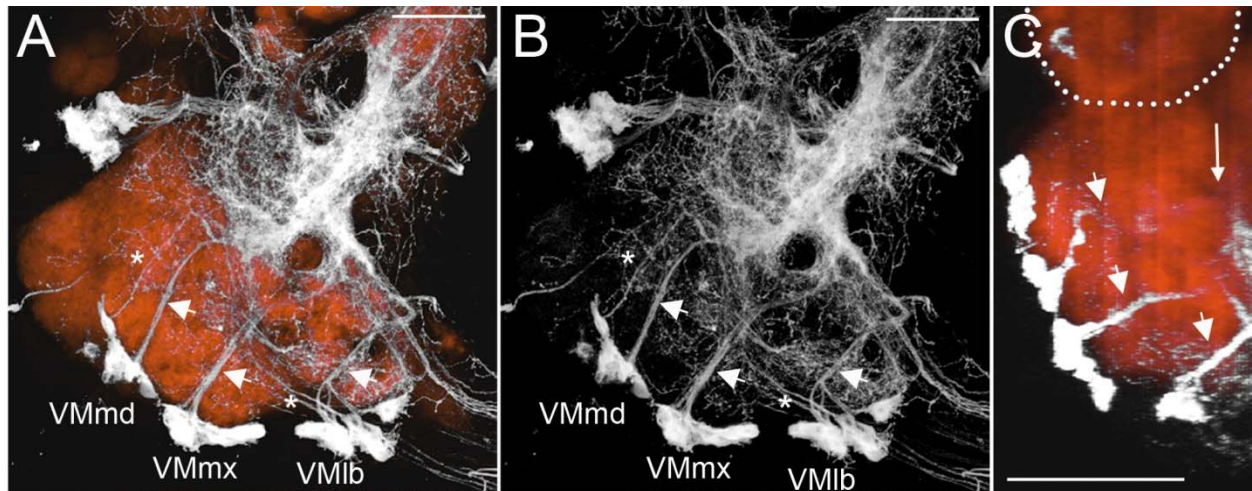
Alle Zelltypen senden einen Neurit ins posteriore Protocerebrum, wo sie charakteristische Innervationsmuster aufweisen: OA-ASM1 zeigt komplexe Verzweigungen in der ipsilateralen Hemisphäre, d.h. im ganzen posterioren Protocerebrum und im anterior lateralen Protocerebrum (Abb.14C). Aus den posterioren Verzweigungen entspringt ein Fortsatz, der sich dorso-lateral des Ösophagus teilt. Ein daraus entstehender Ast innerviert den ipsilateralen Optischen Lobus. Der andere kreuzt die Mittellinie dorsal des Fächerförmigen Körpers und innerviert den kontralateralen Optischen Lobus (Abb.14A). In den Optischen Loben innerviert OA-ASM1 die innere Medulla und die Lobula (Abb.14D). Der primäre Neurit von OA-ASM2 teilt sich dorso-lateral des Fächerförmigen Körpers (Abb.14E und G). Ein Fortsatz projiziert lateral und verzweigt sich im ipsilateralen posterioren Protocerebrum, d.h. um den Pedunkulus herum (Abb.14F). Der andere Fortsatz teilt sich erneut dorsal des Fächerförmigen



**Abbildung 14.** Einzelzellfärbung von OA-ASM Neuronen. Die Felder und das Farbschema sind wie in Abbildung 11 organisiert. **A, B:** Aus posterioren Verzweigungen von OA-ASM1 entstehen zwei Neurite (siehe Pfeil in A), die zum ipsilateralen bzw. kontralateralen Optischen Lobus projizieren. **C:** OA-ASM1 verzweigt stark in den ipsilateralen posterioren Protocerebra (psmpr, psldr, pimpr, pilpr). **D:** Im Optischen Lobus innerviert OA-ASM1 die innere Medulla (i me) und die Lobula (lo). **F:** OA-ASM2 teilt sich dorso-lateral des Fächerförmigen Körpers. Ein Fortsatz projiziert nach Lateral. Er verzweigt sich in den ipsilateralen posterioren Protocerebra (psmpr, psldr, pimpr, pilpr), d.h. um den Pedunkulus (p) herum. **G, H:** Der andere Fortsatz teilt sich ein weiteres mal. Daraus entstehen zwei Fortsätze (siehe Pfeile), die entlang der Mittellinie nach Posterior projizieren, und dann nach Lateral schwenken. **J:** OA-ASM3 teilt sich dorso-lateral des Fächerförmigen Körpers. Ein Fortsatz (siehe Pfeil) läuft nach Lateral in das inferiore Protocerebrum (pimpr, pilpr). **J, K:** OA-ASM3 verzweigt in den posterioren Protocerebra (J, pimpr, pilpr), und im ventro-lateralen Protocerebrum (K, vlpr). Besonders die ipsilateralen Protocerebra, d.h. die Regionen um den Pedunkulus, sind dicht innerviert (J). **L:** OA-ASM3 kreuzt die Mittellinie dorsal des Fächerförmigen Körpers (siehe Pfeil). Messbalken = 25µm.

Körpers (Abb.14; siehe Pfeile). Die daraus entstehenden Äste verlaufen etwas lateral der Mittellinie ins posteriore Protocerebrum. Der mediale Ast kreuzt die Mittellinie dorsal des Fächerförmigen Körpers (Abb.14G und H, siehe Pfeile). Beide Äste verzweigen in den inferior und ventro-lateralen Protocerebra. Auch der primäre Neurit von OA-ASM3 (Abb.14I-L) teilt sich dorso-lateral des Fächerförmigen Körpers (Abb.14I). Ein Fortsatz projiziert lateral in das superiore Protocerebrum (Abb.14). Der andere Fortsatz überquert die Mittellinie dorsal des Fächerförmigen Körpers (Abb.14L, siehe Pfeil). Diese Fortsätze sind die Quelle für komplizierte





**Abbildung 15.** Segmentale Organisation des Clusters VM in *tdc2-GAL4*. A und B zeigen Konfokal-Aufnahmen von sagittalen Vibratomschnitten des Kopfes. C stellt eine sagittale Projektion von Whole Mount Präparaten dar. Neuronale Fortsätze wurden mit mCD8::GFP (weiß) und das Neuropil mit anti-Synapsin (orange) markiert. Cluster VM befindet sich an der ventralen Mittellinie des Subösophagealen Ganglions. Es besteht aus drei Subclustern, die entlang der antero-posterioren Achse angeordnet sind (VMmd, VMmx und VMlb). Die Pfeilköpfe markieren die Bündel primärer Neurite, die jeweils von den drei Subclustern ausgehen. Fortsätze von gepaarten Mittellinienneuronen (Sterne in A und B) projizieren nicht entlang dieser Bündel. Die gepunktete Linie bzw. der Pfeil in C markieren Landmarken, d.h. die Antennalloben und einen transversalen Trakt im Subösophagealen Ganglion. Die Projektionsbahn der primären Neurite lässt sich durch Orientierung an diesen Landmarken nachvollziehen (Vgl. Einzelzellfärbungen in Abb. 21-23). Messbalken = 25µm.

Verzweigungen im posterioren und ventro-lateralen Protocerebrum sowie im Subösophagealen Ganglion (Abb.14J und K). Besonders im ipsilateralen Protocerebrum zeigt OA-ASM3 dichte Verzweigungen, die den Pedunkulus umgeben. OA-ASM2 und OA-ASM3 unterscheiden sich nur in der Projektionsbahn des Neurits, der die Mittellinie kreuzt.

## 4.6 Das VM Cluster

### 4.6.1 Zelluläre Zusammensetzung des VM Clusters

*TDC2-GAL4* markiert 27 Zellen in Cluster VM, das sich an der ventralen Mittellinie des Subösophagealen Ganglions befindet (Buschet al. 2009; Busch [Diplomarbeit 2006]). Entlang der antero-posterioren Achse kann VM weiter in drei Subcluster unterteilt werden, die wahrscheinlich die drei Neuromere (Mandibular, Maxillar und Labial) im Gnathal-Segment repräsentieren (Abb.15). Jedes Subcluster, d.h. VMmd, VMmx und VMlb, sendet ein Bündel von primären Neuriten durch jeweils einen Medialen Trakt zum ventralen Rand des Ösophagus. Diese drei Bündel kann man deutlich voneinander unterscheiden, während die Zellkörper der



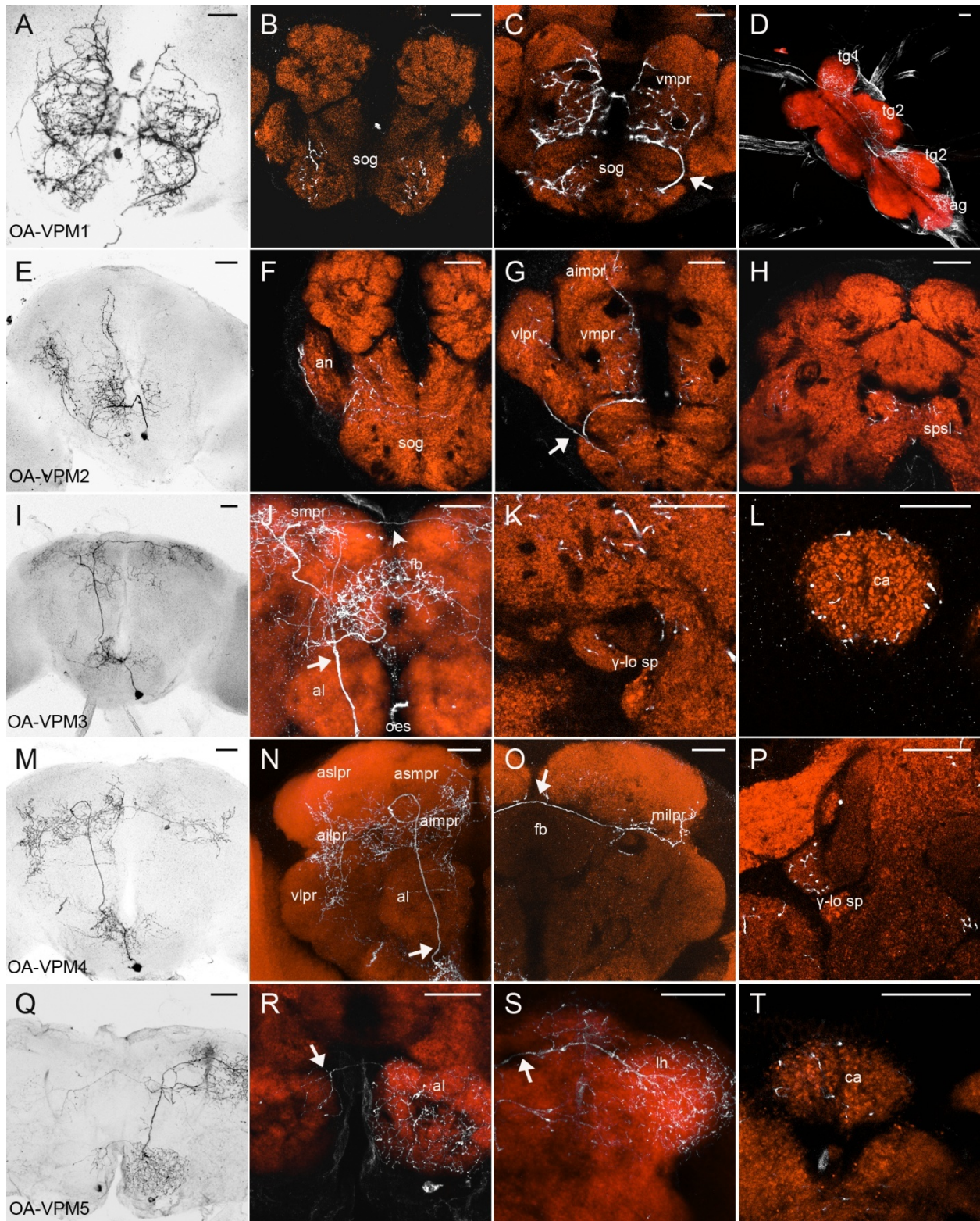


Abbildung 16



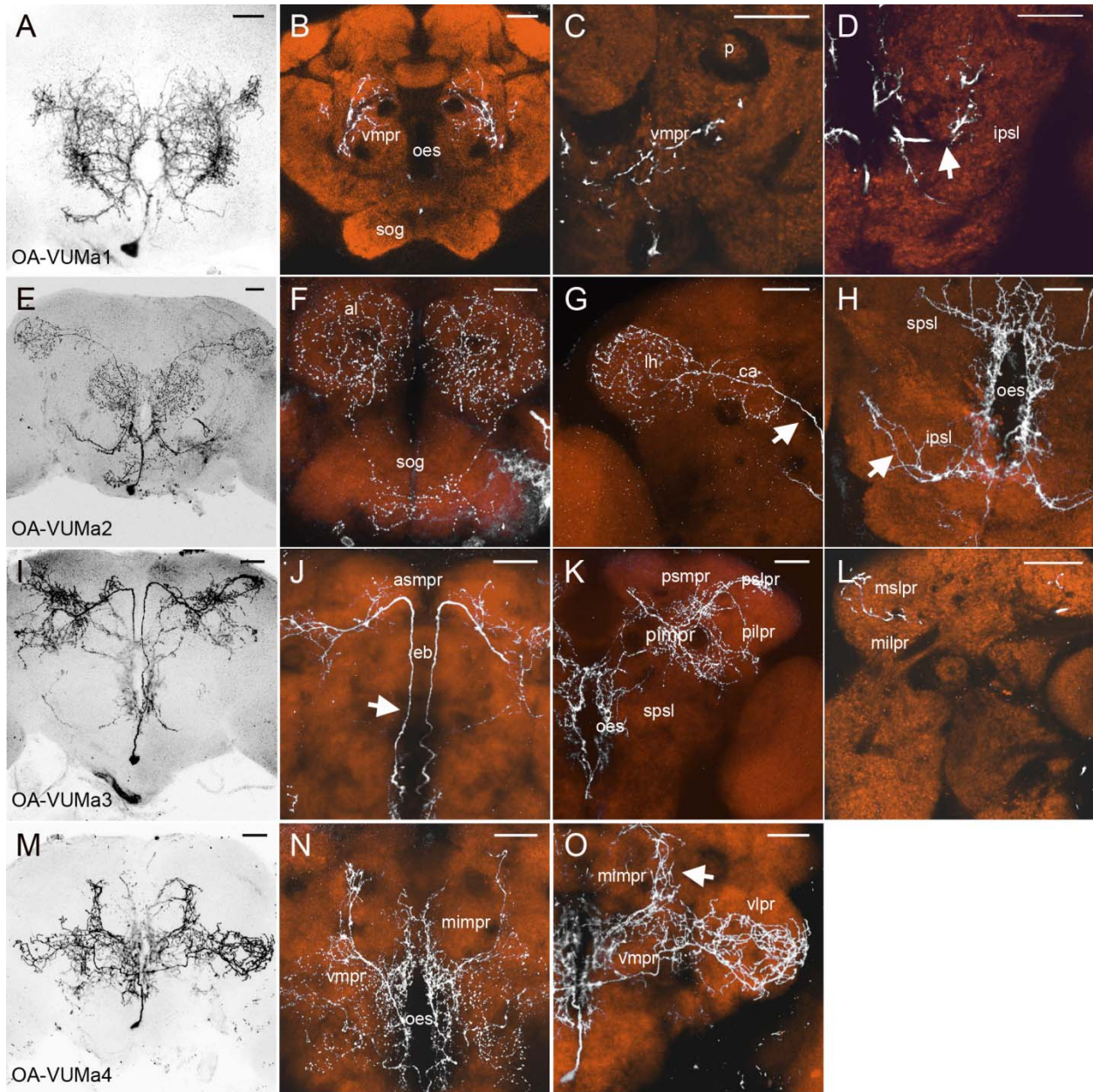
**Abbildung 16.** Einzelzellofarbungen der OA-VPM Neurone. Die Felder und das Farbschema sind wie in Abbildung 11 organisiert. **A-D:** Innervation von OA-VPM1 im Zentralhirn (A-C) und dem Thorakal-abdominal Ganglion (D). **B:** OA-VPM1 formt varikose Endigungen im SOG (sog). **C:** Varikose Endigungen von OA-VPM1 im ventro-medialen Protocerebrum (vmpr). Vom ventro-lateralen Ösophagus projiziert ein dickes Axon in die ipsilaterale Hemisphäre (siehe Pfeil) und läuft weiter in die cervikalen Konnektive. **D:** Innervation von OA-VPM1 im Thorakal-abdominal Ganglion. OA-VPM1 verzweigt in den thorakalen Ganglien 1-3 (tg1-3) und den abdominalen Ganglien (ag). **E-H:** Innervation von OA-VPM2. **F:** Verzweigungen im kontralateralen Antennalnerv (an) und im SOG (sog). **G:** Kontralaterale Innervationen im ventro-lateralen Protocerebrum (vlpr), ventro-medialen Protocerebrum (vmpr) und anterior inferior medialen Protocerebrum (aimpr). Der primäre Neurit von OA-VPM2 teilt sich ventral des ventro-lateralen Protocerebrums (siehe Pfeil). **F, H:** Ipsilaterale Verzweigungen im SOG (sog) und in der posterioren Slope (spsl). **I-L:** Innervationen von OA-VPM3. **J:** Ein auffälliger Neurit von OA-VPM3 (siehe Pfeil) projiziert vom anterior ventro-lateralen Ösophagus (oes), entlang des posterioren Randes der Antennalloben (al), zum anterior superior medialen Protocerebrum (asmpr). Er kreuzt die Mittellinie im mittleren superior medialen Protocerebrum (smpr; siehe Pfeil). OA-VPM3 zeigt varikose Verzweigungen im superioren Protocerebrum und dem Fächerförmigen Körper (fb). **K:** Innervation im kontralateralen Sporn des  $\gamma$ -lobe ( $\gamma$ -lo sp). **L:** Verzweigungen im kontralateralen Calyx (ca). **M-P:** Innervation von OA-VPM4. **N:** Ein dicker Neurit (siehe Pfeil) projiziert entlang des posterioren Randes der Antennalloben (al) zum anterior superior medialen Protocerebrum (asmpr). Er formt varikose Verzweigungen im kontralateralen superior (asmpr, aslpr), inferior (aimpr, ailpr) und ventro-lateralen Protocerebrum (vlpr). **O:** Der Neurit kreuzt die Mittellinie dorsal des Fächerförmigen Körpers (fb, siehe Pfeil) und innerviert das ipsilaterale inferior laterale Protocerebrum (milpr), wo er varikose Endigungen ausbildet. **P:** Dichte Innervationen im kontralateralen Sporn des  $\gamma$ -Lobus ( $\gamma$ -lo sp). **Q-T:** Innervation von OA-VPM5. **R:** Aus Innervationen im Antennallobus (al) der einen Hemisphäre entspringt ein Fortsatz, der die Mittellinie kreuzt. Er verzweigt sich im gegenüberliegenden Antennallobus (siehe Pfeil). **S, T:** OA-VPM5 projiziert durch den inneren antenno-cerebralen Trakt (siehe Pfeil) zum Lateralen Horn (lh) und zum Calyx (ca) der Pilzkörper. Messbalken = 25 $\mu$ m.

drei Subcluster nicht immer klar getrennt sind (Busch et al. 2009; Busch [Diplomarbeit 2006]; Abb.15). Die Neurone in Cluster VM können in zwei Gruppen geteilt werden, basierend auf der Projektionsbahn ihres primären Neuriten: OA-VPM („Ventral-Paired-Median“; Abb.16) Neurone und OA-VUM („Ventral-Unpaired-Median“; Abb.17-19) Neurone.

Die Zellkörper der OA-VPM Neurone befinden sich etwas lateral von der Mittellinie Ihre primären Neurite projizieren außerhalb des jeweiligen Medialen Trakts zum ventralen Ösophagus (Abb.15A und B). Sie bilden asymmetrische Verzweigungen im Sub- und Supraösophagealen Ganglion aus (Abb.16).

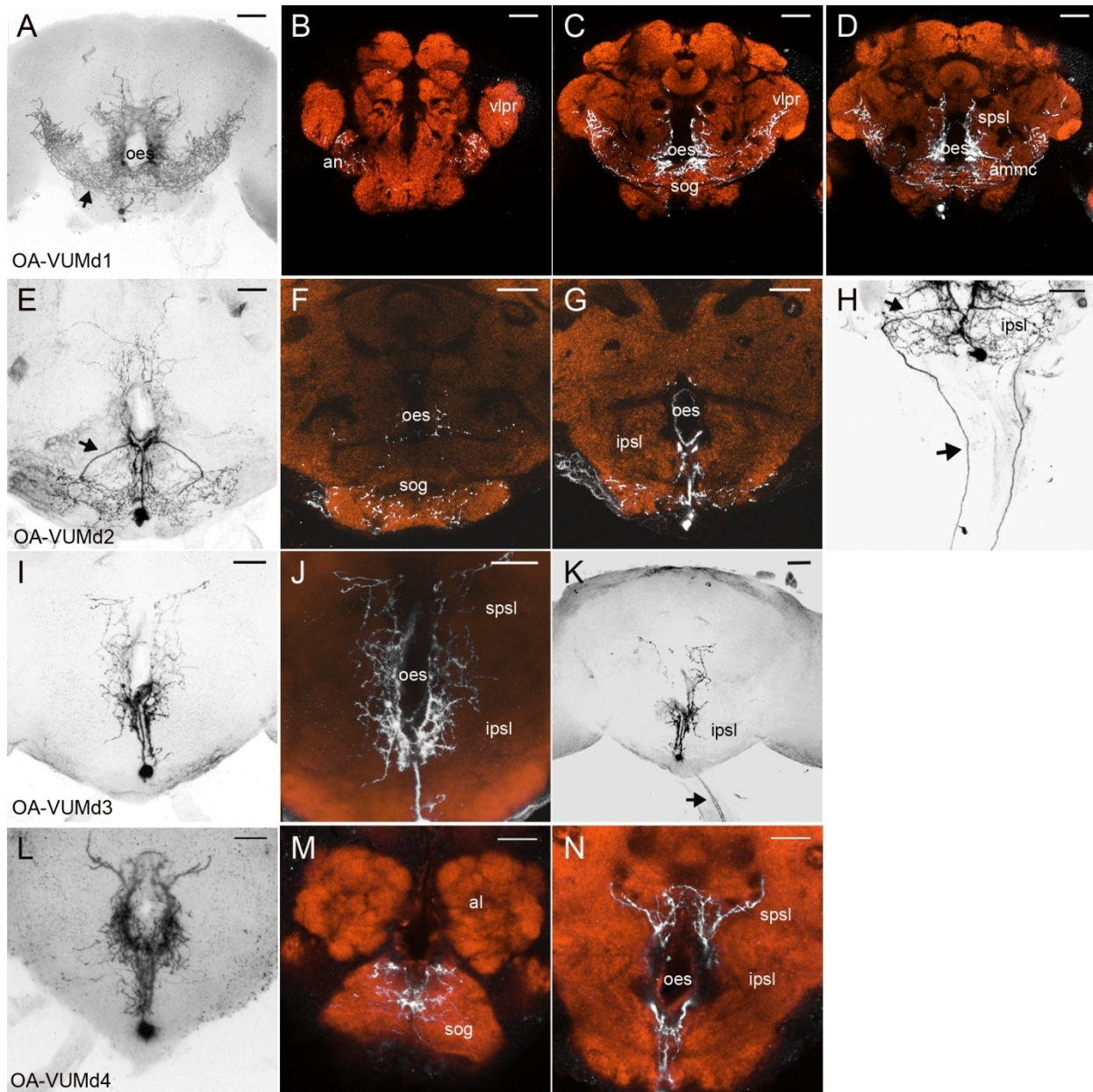
OA-VUM Neurone senden ihren primären Neuriten durch einen der drei Medialen Trakte, die entlang der antero-posterioren Achse angeordnet sind, zum ventralen Ösophagus, (Abb.15). Dort verzweigen sie sich und innervieren das Zentralnervensystem symmetrisch (d.h. je nach Zelltyp das Sub- und Supraösophageale Ganglion, sowie Thorakal- und Abdominalganglien; Abb.17-19). Trotz einiger Ausnahmen ist der Mittellinienneurit das Markenzeichen oktopaminerger VUM Neurone in verschiedenen Insekten Spezies (Bräunig und Pflüger, 2001; Schröter et al. 2007).

Unter den VUM Neuronen gibt es zwei morphologische Kategorien: OA-VUMa und OA-VUMd. OA-VUMa Neurone besitzen aufsteigende Fortsätze, die vom Subösophagealen Ganglion in das Supraösophageale Ganglion projizieren. Sie sind ausschließlich in den Subclustern VMmd und VMmx lokalisiert (Abb.17 und 19). OA-VUMd Neurone formen zusätzlich absteigende Neurite, die durch die cervikalen Konnektive in die Thorakal- bzw.



**Abbildung 17.** Einzelzellfärbung der aufsteigenden OA-VUM Neurone. Die Felder und das Farbschema sind wie in Abbildung 11 organisiert. **A, B** Varikose Verzweigungen von OA-VUMa1 im ventro-medialen Protocerebrum (vmpr) direkt posterior der Antennalloben. **C:** Verzweigungen von OA-VUMa1 erstrecken sich bis zum ventralen Rand des Pedunkulus (p). **D:** Ein Fortsatz von OA-VUMa1 innerviert die inferior posteriore Slope (ipsl, siehe Pfeil). **E, F:** Varikose Endigungen von OA-VUMa2 im Antennallobus (al) und SOG (sog). **E, G:** OA-VUMa2 projiziert durch den inneren antenno-cerebralen Trakt (siehe Pfeile) zum Lateralen Horn (lh) und sendet Kollaterale zum Calyx (ca) der Pilzkörper. **H:** Dendritische Verzweigungen von OA-VUMa2 umgeben den Ösophagus (oes) in der posterioren Slope (ispsl, spsl; siehe Pfeil). **I, J:** OA-VUMa3 sendet ein paralleles Paar von sekundären Neuriten (siehe Pfeil) vom ventralen Ösophagus zum anterior medialen Protocerebrum (asmpr). Es passiert den anterioren Rand des Ellipsoid Körpers (eb). **K:** Varikose Verzweigungen von OA-VUMa3 innervieren das posteriore Protocerebrum (psmpr, pspr, pimpr, pilpr). Dendritische Verzweigungen umgeben den Ösophagus (oes). **I, L:** Ein Zweig von OA-VUMa3 innerviert das laterale Protocerebrum (mlpr, mspr). **M-O:** OA-VUMa4 verzweigt sich im ventro-lateralen Protocerebrum (vlpr) und ventro-medialen Protocerebrum (vmpr), wo es varikose Endigungen ausbildet. Ein charakteristische Zweig innerviert das inferior mediale Protocerebrum (mimpr, siehe Pfeil). Dendritische Verzweigungen von OA-VUMa4 erstrecken sich um den Ösophagus (oes) in der posterioren Slope. Messbalken = 25µm.





**Abbildung 18.** Einzelzellfärbung absteigender OA-VUM Neurone. Die Felder und das Farbschema sind wie in Abbildung 11 organisiert. **A-C:** Ein Neurit von OA-VUMd1 (siehe Pfeil) projiziert vom ventralen Ösophagus (oes) nach Lateral und verzweigt im ventrolateralen Protocerebrum (vlpr) und dem Antennalnerv (an). **C,D:** OA-VUMd1 innerviert das SOG (sog) und das antenno-mechano-sensorische Zentrum (ammc). **E-H:** Die sekundären Neurite von OA-VUMd2 (siehe Pfeil) projizieren vom ventralen Ösophagus (oes) zur lateralen inferior posterioren Slope (ipsl, H). **H:** Die sekundären Neurite treten dann in die Konnektive ein. (siehe Pfeil). **F, G:** Varikose Endigungen von OA-VUMd2 befinden sich im SOG (sog) und in der inferior posterior Slope (ipsl). **I-K:** OA-VUMd3 formt dendritische Verzweigungen in der posterior Slope (J, spsl und ipsl), d.h. um den Ösophagus (oes). **K:** Ein Paar absteigender Neurite entspringt von der Mittellinie des ventralen Ösophagus (siehe Pfeil). **L-N:** OA-VUMd4 formt dendritische Verzweigungen in der posterior Slope, d.h. um den Ösophagus (N, spsl und ipsl), und varikose Endigungen im anterioren SOG (sog). Messbalken = 25µm.

Abdominalganglien projizieren. Sie befinden sich im posterioren Subcluster VM1b (Abb.18). Wie auch die AL2-Neurone zeigen die Zelltypen des Clusters VM eine hohe Stereotypie in

verschiedenen Präparaten (zum Beispiel Abb.10M-U). Im folgenden wird die Morphologie von einzelnen Zelltypen des VM-Clusters beschrieben, beginnend mit OA-VPM Neuronen (siehe auch Busch et al. 2009).

#### 4.6.2 Ventral Paired Median Neurons

OA-VPM Neurone gehören zu Cluster VM, formen aber keine spiegel-symmetrischen Projektionen, wie OA-VUM Neurone. Sie sind gepaarte Neurone mit komplementären Innervationsmustern im Sub- und Supraösophagealen Ganglion. Alle identifizierten OA-VPM Neurone zeigen eine polarisierte Morphologie, d.h. Verzweigungen, die mit dendritischen Dornen dekoriert sind, umgeben in der posterioren Slope den Ösophagus und sind räumlich getrennt von varikosen Nervenendigungen in den jeweiligen Zielregionen. Die primären Neurite aller OA-VPM Neurone (ausgenommen OA-VPM5) projizieren außerhalb der Medialen Trakte zum ventralen Rand des Ösophagus (Abb.15A und B).

Der Zellkörper von OA-VPM1 (Abb. 16A-D) befindet sich am anterioren Rand des Subösophagealen Ganglions, anterior und lateral zu Subcluster VMmd. Sein primärer Neurit projiziert entlang des ventralen Ösophagus und verzweigt sich bilateral im ventro-medialen Protocerebrum (Abb. 16C). Während die Lokalisation des Zellkörpers, die Projektion des primären Neurits und der absteigende sekundäre Neurit eindeutig asymmetrisch sind, erscheinen die Verzweigungen im Sub- und Supraösophagealen Ganglion spiegel-symmetrisch. OA-VPM1 bildet varikose Endigungen im Subösophagealen Ganglion und ventro-medialen Protocerebrum (Abb. 16B und C). Der absteigende sekundäre Neurit entsteht am ventro-lateralen Ösophagus des ipsilateralen Supraösophagealen Ganglions. In seinem Verlauf schwenkt er nach Ventral und innerviert die cervikalen Konnektive (Abb. 16, Pfeil). Er verzweigt sich in allen drei thorakalen und den abdominalen Neuromeren (Abb. 16D). Als repräsentatives Beispiel zeigt Abb.10M-U die Stereotypie von OA-VPM1 in verschiedenen Präparaten.

OA-VPM2 liegt etwas lateral von der ventralen Mittellinie und ist assoziiert mit Subcluster VMmd. Sein primärer Neurit projiziert zum ventralen Ösophagus, wo er die Mittellinie kreuzt (Abb. 16E). Er teilt sich dann ventral des ventro-lateralen Protocerebrums (Abb. 16G). Die daraus entstehenden Fortsätze sind die Quelle für kontralaterale Verzweigungen in den ventro-lateralen, ventro-medialen und anterioren inferior medialen Protocerebra sowie dem Antennalnerv und dem Subösophagealen Ganglion (Abb. 16E-G). In geringem Ausmaß innerviert OA-VPM2 auch das ipsilaterale Subösophageale Ganglion (Abb. 16F).



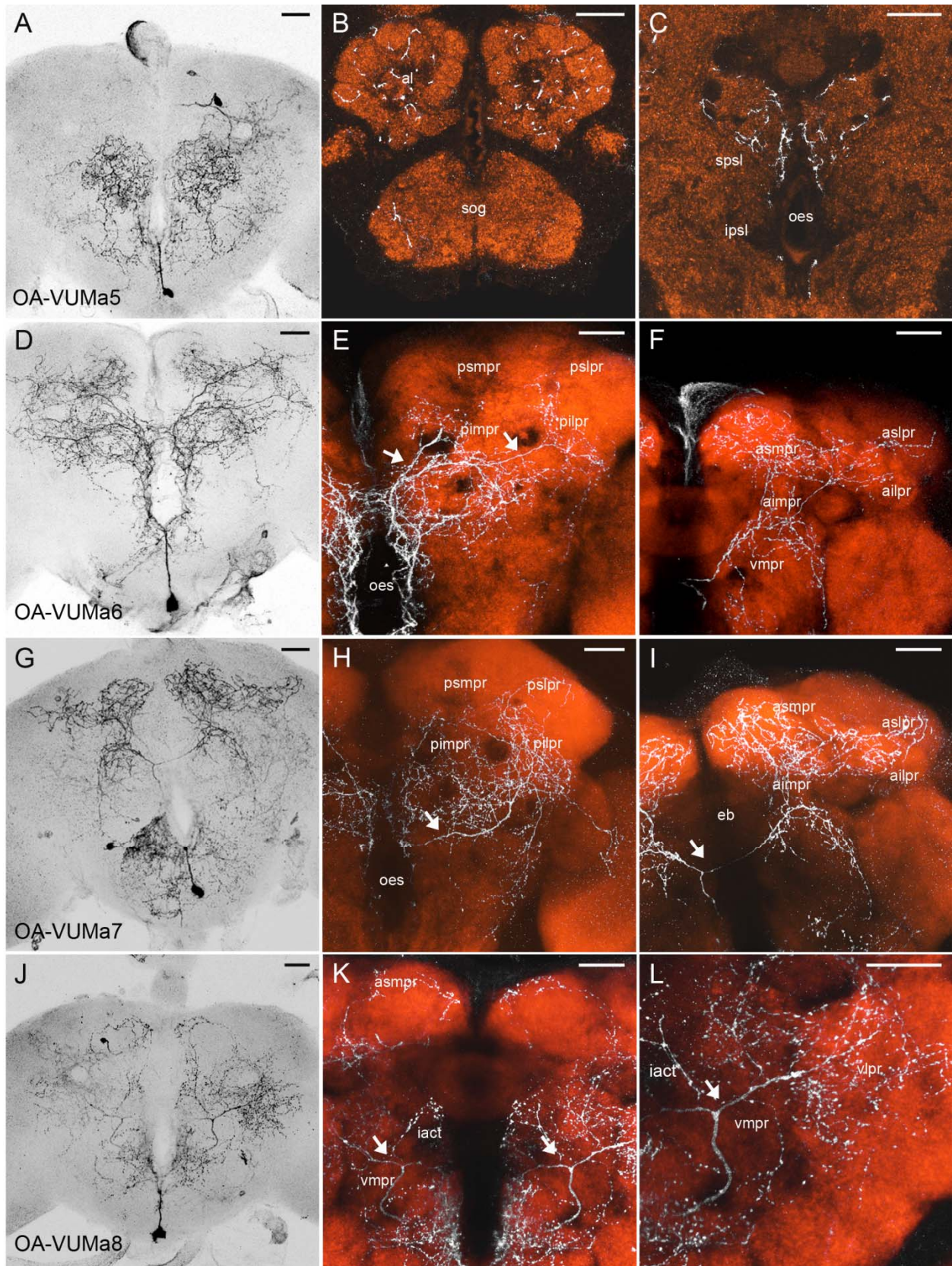


Abbildung 19

**Abbildung 19.** Einzelzellfärbungen von statistisch unterrepräsentierten OA-VUMa Neuronen. Die Felder und das Farbschema sind wie in Abbildung 11 organisiert. **A-C:** Varikose Endigungen von OA-VUMa5 sind im Antennallobus (al) lokalisiert. **C:** OA-VUMa5 formt dendritische Verzweigungen um den Ösophagus (oes) herum. **D-F:** Zwei Fortsätze (siehe Pfeile) von OA-VUMa6 projizieren vom dorsalen Ösophagus zum posterioren Protocerebrum, wo sie verzweigen. **E:** Verzweigungen im inferioren (pimpr, pilpr) und superioren (psmpr, psldr) Protocerebrum. **F:** Innervationen von OA-VUMa6 im anterioren Protocerebrum (d.h. im ventro-medialen [vmpr], inferioren [aimpr, ailpr] und superioren [asmpr, aslpr] Protocerebrum). **G-I:** Projektionsmuster von OA-VUMa7. **H:** Projektion von Konfokal-Aufnahmen der posterioren Region. Ein charakteristischer Neurit (siehe Pfeil) projiziert in das inferior laterale Protocerebrum (pilpr). **I:** Projektion von Konfokal-Aufnahmen der anterioren Region. Ein Fortsatz (siehe Pfeil) teilt sich ventral des Ellipsoid Körpers (eb). Die entstehenden Neurite verzweigen sich anterior im inferioren (aimpr, ailpr) und superioren (asmpr, aslpr) Protocerebrum. **J-L:** Innervation von OA-VUMa8. **K, L:** Neurite von OA-VUMa8 teilen sich (siehe Pfeile) im ventro-medialen Protocerebrum (vmpr), d.h. ventro-lateral vom inneren antenno-cerebralen Trakt (iact). Die entstehenden Neurite verzweigen sich im ventro-lateralen Protocerebrum (vlpr) bzw. im anterioren superior medialen Protocerebrum (asmpr). Messbalken = 25µm.

---

OA-VPM3 (Abb. 16I-L) befindet sich lateral von Subcluster VMmx. Sein primärer Neurit projiziert zum ventralen Ösophagus und überquert dort die Mittellinie. Der Fortsatz passiert dann den posterioren Rand der Antennalloben und projiziert weiter dorsal, zum anterior superior medialen Protocerebrum. Dort schwenkt er in Richtung Posterior und Medial, um erneut die Mittellinie zu kreuzen. Im weiteren Verlauf verzweigt der Fortsatz im ipsilateralen superior medialen und - lateralen Protocerebrum (Abb. 16J). Von dem Hauptneurit entspringen nacheinander kleinere Äste, welche die kontralateralen superior medialen und - lateralen Protocerebra, den Fächerförmigen Körper, die kontralateralen Noduli und die kontralateralen Pilzkörper innervieren. Bei letzteren ist die Innervation auf den Sporn des  $\gamma$ -Lobus und die äußere Region des Calyx beschränkt (Abb. 16J-L).

OA-VPM4 (Abb. 16M-P) befindet sich posterior und lateral von Subcluster VMlb. Ähnlich wie OA-VPM3 sendet OA-VPM4 seinen primären Neurit zum ventralen Ösophagus. Dort überquert er die Mittellinie und projiziert entlang des posterioren Randes der Antennalloben zum anterioren superior medialen Protocerebrum (Abb. 16M und N, siehe Pfeil). Auf diesem Weg teilt OA-VPM4 den Trakt mit OA-VPM3. Der Fortsatz dreht sich dann in Richtung Posterior und Medial, um die Mittellinie dorsal des Fächerförmigen Körpers zu überqueren (Abb. 16O, siehe Pfeil). In der kontralateralen Hirnhemisphäre verzweigt OA-VPM4 in den superior -, inferior - und ventro-lateralen Protocerebra, sowie im Sporn des  $\gamma$ -Lobus (Abb. 16N-P). Zusätzlich projiziert OA-VPM4 ins Subösophageale Ganglion (Abb. 16M und N). In der ipsilateralen Hirnhemisphäre verzweigt OA-VPM4 im inferior lateralen und - medialen Protocerebrum (Abb. 16O).

OA-VPM5 (Abb. 16Q-T) liegt lateral von Subcluster VMlb. Jedoch war, aufgrund der schlechten Neuropilfärbung in diesem Präparat, der Verlauf des primären Neuriten nicht nachvollziehbar. Aufgrund seines asymmetrischen Innervationsmusters (Abb. 16Q) wurde OA-VPM5 den gepaarten Mittellinienneuronen zugeordnet. OA-VPM5 innerviert die Antennalloben

(Abb. 16R) und sendet einen Fortsatz durch den inneren antenno-cerebralen Trakt zum Lateralen Horn (Abb. 16S, siehe Pfeil). Kollaterale innervieren den Calyx der Pilzkörper (Abb. 16T). Die Zielregionen von OA-VPM5 und OA-VUMa2 sind sehr ähnlich (Abb. 17E-H; Fig. 16Q-T). Jedoch ist OA-VPM5 asymmetrisch. Außerdem formt OA-VPM5 spärliche Verzweigungen im kontralateralen Antennallobus (Abb. 16R). Sie entspringen von einem feinen Fortsatz, der die Mittellinie dorsal der Antennalloben kreuzt (Abb. 16R, siehe Pfeil).

#### 4.6.3 Aufsteigende VUM Neurone (OA-VUMa)

Wie oben beschrieben besteht das VM Cluster aus drei Subclustern. Alle OA-VUMa Neurone befinden sich in den Subclustern VMmd und VMmx. Ihre primären Neurite projizieren dorsal durch die Medialen Trakte (Abb.17) und teilen sich am ventralen Rand des Ösophagus. Sie formen dendritische Verzweigungen in der posterioren Slope, welche den Ösophagus umgeben (z.B. Abb. 17H, K, N, und O). Aus diesen Verzweigungen entspringt ein Paar sekundärer Neurite, die varikose Nervenendigungen in den jeweiligen Zielregionen ausbilden.

Symmetrische und komplexe Verzweigungen von OA-VUMa1 (Abb. 17A-D) erstrecken sich durch das gesamte ventro-mediale Protocerebrum (Abb. 17B und C), d.h. bis zum posterioren Rand der Antennalloben und den ventralen Rändern der Pedunkuli (Abb. 17C). OA-VUMa1 formt einen charakteristischen Fortsatz am ventro-lateralen Ösophagus, der die inferior posteriore Slope mit varikosen Nervenendigungen versorgt (Abb. 17D).

OA-VUMa2 (Abb. 17E-H) sendet symmetrische sekundäre Neurite vom ventro-lateralen Ösophagus zum posterioren Rand der Antennalloben, wo sich beide Neurite teilen. Ein Fortsatz innerviert die Antennalloben und projiziert weiter ins anteriore Subösophageale Ganglion (Abb. 17F). Der zweite Fortsatz projiziert durch den inneren antenno-cerebralen Trakt zum Lateralen Horn und sendet Kollaterale in den Calyx der Pilzkörper (Abb. 17G).

Symmetrische sekundäre Neurite von OA-VUMa3 (Abb. 17I-L) projizieren dorsal, entlang des anterioren Randes des Ellipsoid Körpers (Abb. 17J, siehe Pfeil), ins anterior superior mediale Protocerebrum. Dort schwenken sie in Richtung Posterior und Lateral (Abb. 17J). Sie formen dichte Verzweigungen in der superior posterioren Slope und dem posterioren Protocerebrum, wo sie die Pedunkuli umgeben (Abb. 17K). Ein Ast innerviert das laterale Protocerebrum (Abb. 17L).

OA-VUMa4 formt dichte Verzweigungen im ventro-lateralen und ventro-medialen Protocerebrum. Ein charakteristischer Ast innerviert das inferior mediale Protocerebrum zwischen Fächerförmigen Körper und Pedunkulus (Abb. 17N und O, siehe Pfeil).

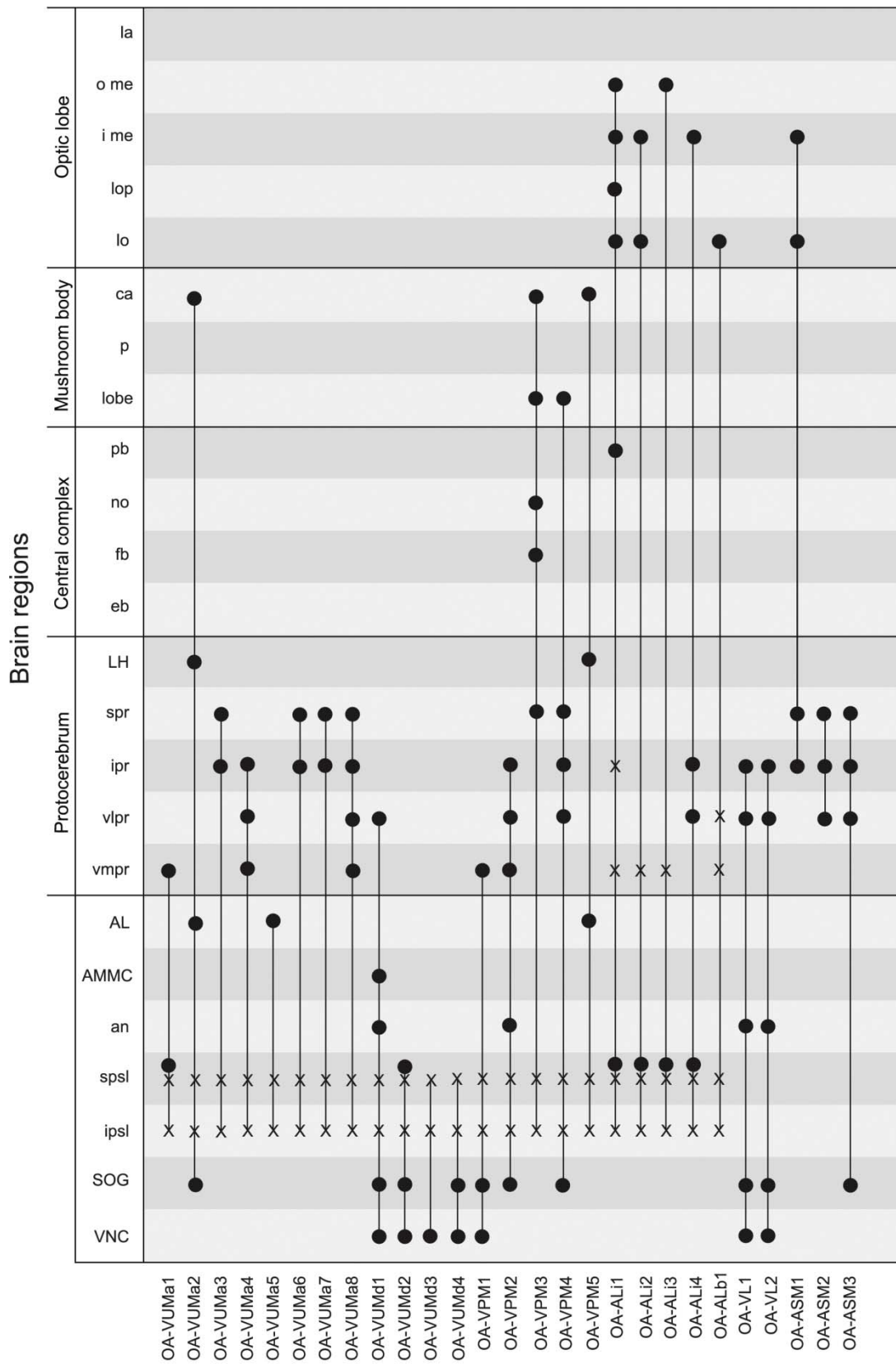


Abbildung 20

Cell type



**Abbildung 20.** Schematische Darstellung der Innervationsmuster aller in dieser Studie identifizierten Zelltypen. Punkte repräsentieren varikose Endigungen in den jeweiligen Neuropilen. Regionen, wo dendritische Verzweigungen gebildet werden sind mit X markiert. Die Zielregionen der jeweiligen Zelltypen sind mit einer Linie verbunden. Jedes Neuropil wird von einer bestimmten Gruppe von Zellen innerviert. Das deutet auf eine modulare Organisation der oktopaminergen Neurone hin. VNC: ventral nerve cord; ipsI: inferior posteriore Slope; spsl: superior posteriore Slope; SOG: Subösophageales Ganglion; an: Antennalnerv; AMMC: antenno-mechanosensorisches Zentrum; AL: Antennallobus; vmpr: ventro-mediales Protocerebrum; vlpr: ventro-laterales Protocerebrum; ipr: inferiores Protocerebrum; spr: superiores Protocerebrum; LH: Laterales Horn; fb: Fächerförmiger Körper; no: Noduli; pb: Protocerebralbrücke; lobe: Loben der Pilzkörper; ca: Calyx; lo: Lobula; lop: Lobula Platte; i me: innere Medulla; o me: äußere Medulla; la: Lamina.

---

#### 4.6.4 Absteigende VUM Neurone (OA-VUMd)

Die Einzelzellanalyse erbrachte drei VUM Neurontypen mit absteigenden und aufsteigenden Fortsätzen (Abb. 18A-K). Ein vierter Zelltyp, OA-VUMd4, wurde wiederholt und ausschließlich bei der morphologischen Analyse von Mittellinienklonen identifiziert (Tab. 8 und 10; Abb. 18 L-O). Anhand der Projektionsbahn ihres Primären Neuriten kann man erkennen, daß alle absteigenden OA-VUMd Neurone zu Subcluster VM1b gehören. Ähnlich wie OA-VUMa Neurone bilden OA-VUMd Neurone am ventro-lateralen Ösophagus ein Paar sekundärer Neurite. Diese projizieren jedoch durch die cervikalen Konnektive (Abb. 18H und K, siehe Pfeile) und verzweigen sich wohl in den Thorakal- bzw. Abdominalganglien. Außerdem zeigen auch OA-VUMd Neurone eine stark polarisierte Morphologie: dendritische Verzweigungen umgeben den Ösophagus in der posterioren Slope und sind deutlich von den varikosen Nervenendigungen in den jeweiligen Zielregionen getrennt.

In einer frontalen Ansicht zeigt OA-VUMd1 ein fächerförmiges Projektionsmuster im Gehirn (Abb. 18A). In beiden Hemisphären projiziert ein Fortsatz nach Lateral (Abb. 18A, siehe Pfeil) und verzweigt im ventro-lateralen Protocerebrum (Abb. 18C), Antennalnerv (Abb. 18B) und Subösophagealen Ganglion (Abb. 18C). Zusätzlich innerviert OA-VUMd1 wahrscheinlich das antenno-mechano-sensorische Zentrum (AMMC; Abb. 18D).

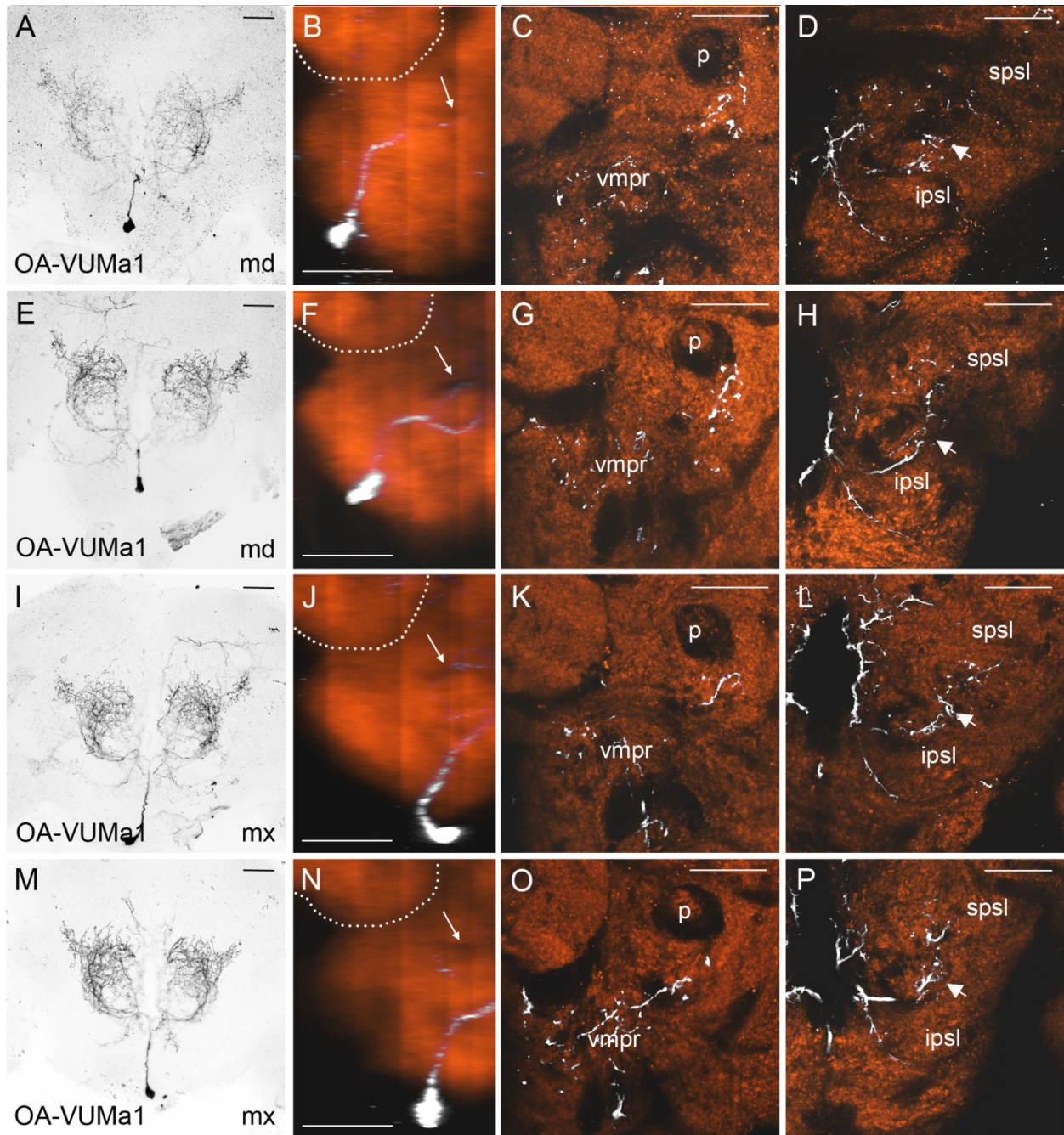
Die sekundären Neurite von OA-VUMd2 projizieren vom ventralen Ösophagus zu der lateralen inferior posterioren Slope, wo sie ventral in die cervikalen Konnektive schwenken (Abb. 18H, siehe Pfeil). OA-VUMd2 bildet varikose Endigungen im posterioren Subösophagealen Ganglion (Abb. 18F) und in der inferior posterioren Slope (Abb. 18G). In keinem Präparat war OA-VUMd2 alleine gefärbt, weshalb das beschriebene Projektionsmuster möglicherweise unvollständig ist.

Zelltyp	VMmd	VMmx	VMlb
OA-VUMa1	17	17	
OA-VUMa2	11	11	
OA-VUMa3	6	8	
OA-VUMa4	7	5	
OA-VUMa5	2	1	
OA-VUMa6	1	2	
OA-VUMa7	1		
OA-VUMa8		1	
OA-VUMd1			6
OA-VUMd2			4
OA-VUMd3			5
OA-VUMd4			
OA-VPM1	26		
OA-VPM2	2		
OA-VPM3		12	
OA-VPM4			3
OA-VPM5			1

**Tabelle 9.** Trefferhäufigkeit der Zelltypen aus Cluster VM in einem bestimmten Subcluster, d.h. VMmd, VMmx oder VMlb. (n = 1060)

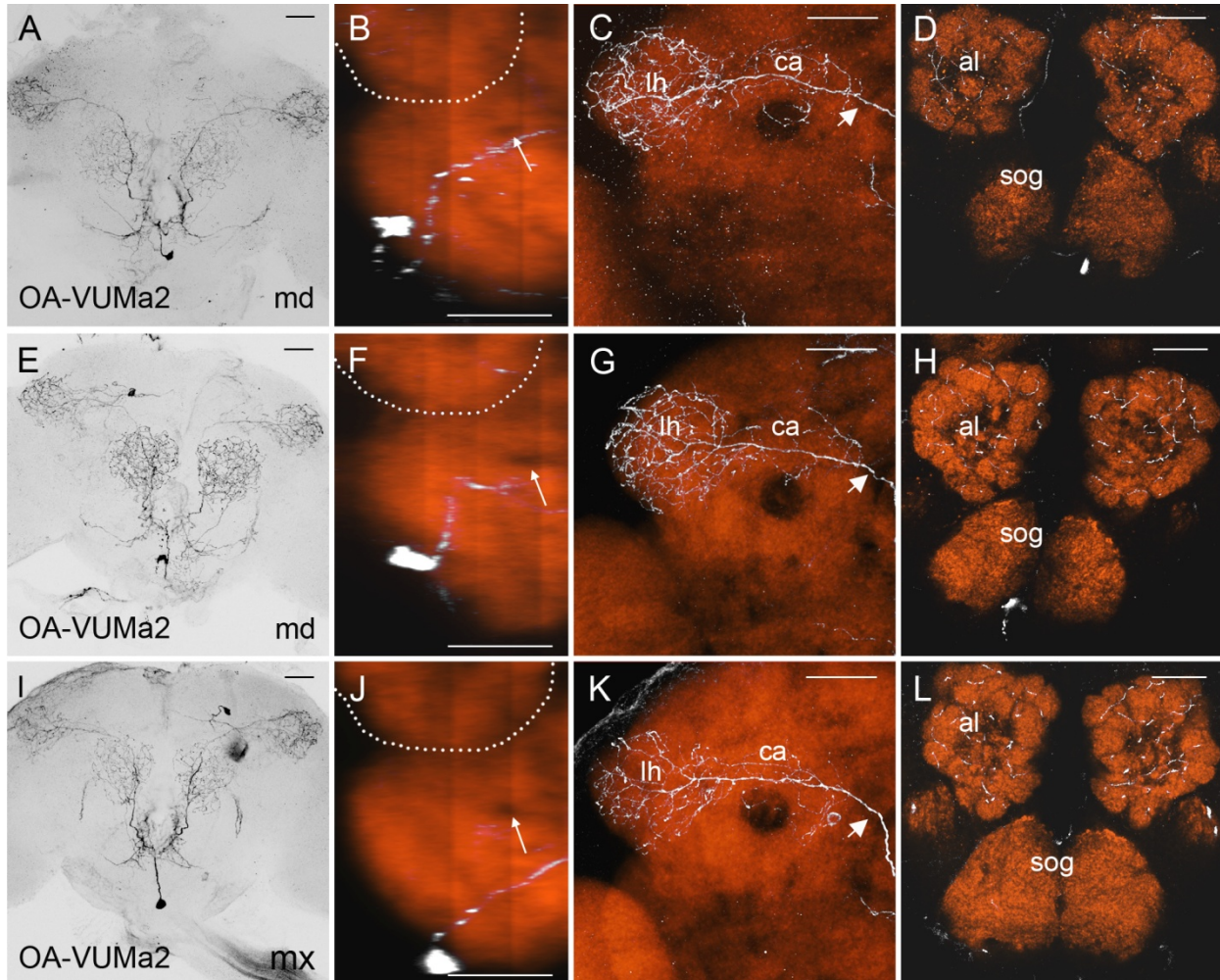
Die sekundären Neurite von OA-VUMd3 projizieren direkt vom ventralen Ösophagus in die cervikalen Konnektive. Wie auch alle anderen OA-VUM Neurone bildet OA-VUMd3 dendritische Dornen in der posterioren Slope, aber innerviert scheinbar keine anderen Bereiche im Sub- oder Supraösophagealen Ganglion (Abb. 18I und J). Vermutlich formt OA-VUMd3 varikose Nervenendigungen in den Thorakal- bzw. Abdominalganglien.

OA-VUMd4 (Abb. 18L-O) bildet, neben den dendritischen Verzweigungen in der posterioren Slope (Abb. 18 N), varikose Nervenendigungen im anterioren Subösophagealen Ganglion (Abb. 18 M).



**Abbildung 21.** Einzelzellfärbungen von OA-VUMa1. Stereotype Projektionsmuster des segmental duplizierten Zelltyps OA-VUMa1 in vier verschiedenen Präparaten (A-D, E-H, I-L und M-P). Die linke Spalte zeigt Projektionen von Konfokal-Aufnahmen der gesamten Zellen (markiert mit mCD8::GFP). Die weiter rechts gelegenen Spalten stellen charakteristische Projektionen von OA-VUMa1 (mCD8::GFP, in weiß) im Neuropil (orange) dar. Spalte 2 zeigt die Projektionsbahn des primären Neuriten im Subösophagealen Ganglion in einer sagittalen Ansicht. Die gepunktete Linie bzw. der Pfeil markieren Landmarken, d.h. die Antennalloben und einen transversalen Trakt im Subösophagealen Ganglion. Durch Orientierung an den Landmarken erkennt man, daß in den oberen beiden Reihen (A-D und E-H) OA-VUMa1 im mandibularen Subcluster VMmd gefärbt ist. Die unteren beiden Reihen (I-L und M-P) zeigen OA-VUMa1 im maxillaren Subcluster VMmx (Vgl. Abb. 15C). Jedes Präparat von OA-VUMa1 zeigt ähnliche Innervationsmuster im ventro-medialen Protocerebrum (vmpr in C, G, K und O) bzw. in der inferior und superior posterioren Slope (ipsl und spsl in D, H, L und P). Messbalken = 25 µm.

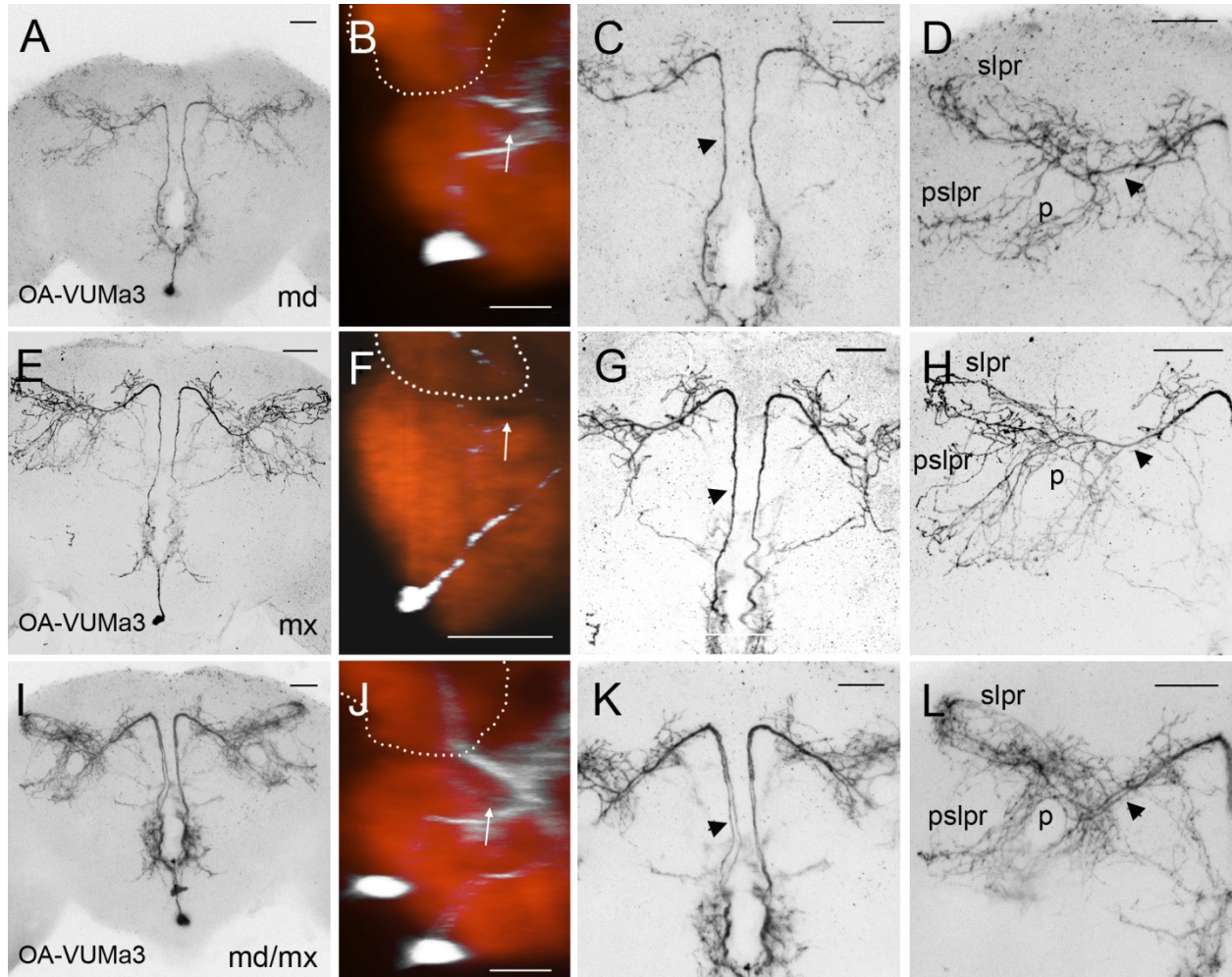




**Abbildung 22.** Einzelzellfärbungen von OA-VUMa2. Stereotype Projektionsmuster des segmental duplizierten Zelltyps OA-VUMa2 in drei verschiedenen Präparaten (A-D, E-H und I-L). Die linke Spalte zeigt Projektionen von Konfokal-Aufnahmen der gesamten Zellen (markiert mit mCD8::GFP). Die weiter rechts gelegenen Spalten stellen charakteristische Projektionen von OA-VUMa2 (mCD8::GFP, in weiß) im Neuropil (orange) dar. Spalte 2 (B, F und J) zeigt die Projektionsbahn des primären Neuriten im Subösophagealen Ganglion in einer sagittalen Ansicht. Die gepunktete Linie bzw. der Pfeil markieren Landmarken, d.h. die Antennalloben und einen transversalen Trakt im Subösophagealen Ganglion. Durch Orientierung an den Landmarken erkennt man, daß in den oberen beiden Reihen (A-D und E-H) OA-VUMa2 des mandibularen Subclusters VMmd gefärbt ist. Die untere Reihe (I-L) zeigt OA-VUMa2 im maxillaren Subcluster VMmx (Vgl. Abb. 15C). In jedem Präparat projiziert OA-VUMa2 durch den inneren antenno-cerebralen Trakt zum Calyx und Lateralen Horn (iact, ca und lh in C, G und K). In allen präparaten zeigt OA-VUMa2 stereotype Verzweigungen in den Antennalloben (al in D, H und L). Messbalken = 25 µm.

#### 4.6.5 Weitere Neurone des VM Clusters

Nach der Einzelzellanalyse konnten vier weitere Zelltypen in Cluster VM identifiziert werden (VUMa5-VUMa8; Abb.19). Jeder dieser Zelltypen formt charakteristische Neurite, deren Projektionsmuster sich von den bisher beschriebenen unterscheiden. Ihre Kategorisierung war zunächst unklar, weil sie mit einer geringen Häufigkeit gefärbt wurden (n=2-5; Tab.8). Jedoch war jeder der vier Zelltypen auch nach der morphologischen Analyse der Mittellinienklone

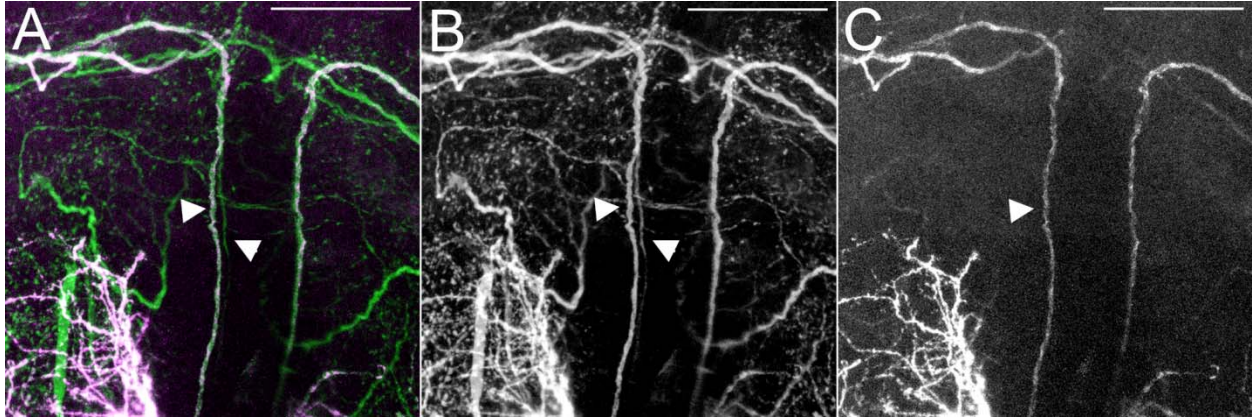


**Abbildung 23.** Einzelzellfärbungen von OA-VUMa3. Stereotype Projektionsmuster des segmental duplizierten Zelltyps OA-VUMa3 in drei verschiedenen Präparaten (A-D, E-H und I-L). Die linke Spalte zeigt Projektionen von Konfokal-Aufnahmen der gesamten Zellen (markiert mit mCD8::GFP). Die weiter rechts gelegenen Spalten stellen charakteristische Projektionen von OA-VUMa3 (mCD8::GFP, in weiß) im Neuropil (orange) dar. Spalte 2 (B, F und J) zeigt die Projektionsbahn des primären Neuriten im Subösophagealen Ganglion in einer sagittalen Ansicht. Die gepunktete Linie bzw. der Pfeil markieren Landmarken, d.h. die Antennalloben und einen transversalen Trakt im Subösophagealen Ganglion. Durch Orientierung an den Landmarken erkennt man, daß in den oberen beiden Reihen OA-VUMa3 im mandibularen (A-D) bzw. maxillaren Subcluster (E-H) gefärbt ist. Die untere Reihe (I-L) zeigt die duplizierten OA-VUMa3 Neurone gleichzeitig gefärbt. Die Neurone projizieren durch den mandibularen bzw. maxillaren medialen Trakt (J, Vgl. Abb. 15C). Die Sekundären Neurite projizieren dicht gebündelt in das posteriore Protocerebrum (K und L; siehe Pfeil). Dort überlappen ihre Verzweigungen nahezu vollständig (L vgl. mit D und H). Messbalken = 25 µm.

wiederholt identifizierbar (Tab. 10). Dies deutet daraufhin, dass sie eigenständige Zelltypen repräsentieren. Und nicht morphologische Varianten eines Zelltyps.

Symmetrische sekundäre Neurite von OA-VUMa5 projizieren vom ventro-lateralen Ösophagus zu den Antennalloben, wo sie sich verzweigen (Abb. 19B). Sie erreichen die Antennalloben über denselben Trakt wie die sekundären Neurite von OA-VUMa2. Ähnlich wie im Fall von OA-VUMd2, wurde OA-VUMa5 in keiner Probe allein gefärbt, weswegen die Beschreibung des Projektionsmusters unvollständig sein könnte.





**Abbildung 24.** Einzelzellfärbung von OA-VUMa3 mit  $\alpha$ -CD8 (A, magenta bzw. C). Gleichzeitig wurden alle GAL4 positiven Neurone mit GFP gefärbt (A, grün bzw. B). *Tdc2-GAL4* färbt zwei Paar sekundäre Neurite des Typs OA-VUMa3, die dicht gebündelt vom ventralen Ösophagus nach dorsal projizieren (Pfeile in A und B). Die Einzelzellfärbung, d.h.  $\alpha$ -CD8, markiert nur ein Paar dieser Neurite (A und B). Daher müssen die Paare sekundärer Neurite zu unterschiedlichen Zellen gehören. Messbalken = 25  $\mu$ m.

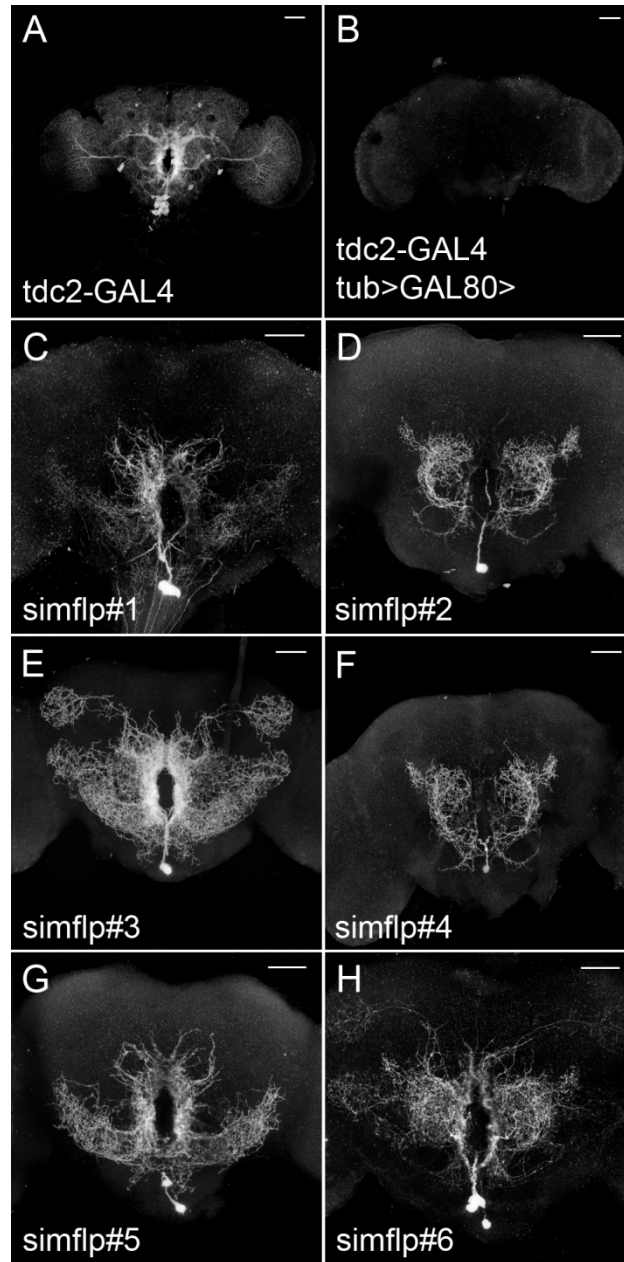
In beiden Hemisphären sendet OA-VUMa6 ein Paar von sekundären Neuriten vom dorsalen Ösophagus lateral in die inferioren und superioren Protocerebra, wo sie sich extensiv verzweigen (Abb. 19E, siehe Pfeile)

OA-VUMa7 sendet einen sekundären Neurit entlang des ventralen Ösophagus in Richtung Anterior. Er teilt sich ventral des Ellipsoidkörpers und innerviert beide Hemisphären (Abb. 19I, siehe Pfeil). Dieser ungepaarte Neurit ist eine besondere Eigenschaft dieses Neurons. Ansonsten teilt OA-VUMa7 alle morphologischen Kriterien von OA-VUM Neuronen (Abb. 19G und H). Symmetrische Verzweigungen von OA-VUMa7 sind in den anterioren Bereichen der medialen und lateralen Protocerebra lokalisiert (Abb. 19H, siehe Pfeil).

OA-VUMa8 formt ein Paar von sekundären Neuriten, dass vom ventro-lateralen Ösophagus in Richtung Anterior projiziert. Die Neurite teilen sich im ventro-medialen Protocerebrum, d.h. ventral zum inneren antenno-cerebralen Trakt (Abb. 19K und L, siehe Pfeile). Komplexe Verzweigungen von OA-VUMa8 durchdringen das ventro-laterale Protocerebrum bzw. die superior medialen Protocerebra.

#### 4.6.6 Segmentale Duplikation der OA-VUMa Neurone

Insgesamt wurden im VM Cluster 5 OA-VPM, 8 OA-VUMa und 4 OA-VUMd Zelltypen identifiziert. Geht man davon aus, dass OA-VPM Neurone gepaart sind, dann würden sie nur zu 22 der 27 Zellen beisteuern. Dieser Unterschied ist durch die zelluläre Zusammensetzung der Subcluster VMmd und VMmx erklärbar.



**Abbildung 25.** Einzelzellfärbung von Mittellinienklonen im adulten Gehirn. Neuronale Fortsätze wurden mit mCD8::GFP markiert (weiß). **A:** *tdc2-GAL4* markiert Neurone mit komplexen Verzweigungen im Gehirn. **B:** GAL80 blockt GAL4 Aktivität in allen GAL4 positiven Neuronen. **C-H:** Mit Flp unter Kontrolle von *3.7sim* wird GAL80 spezifisch in individuellen Mittellinienklonen „ausgeschnitten“. In C-H wurden verschiedene Insertionen von *3.7sim-flp* (#1-6) verwendet. Mit diesem System werden ausschließlich OA-VUM Neurone aus Cluster VM gefärbt. Messbalken = 25  $\mu$ m.

Durch Bestimmung der Projektionsbahn ihres primären Neurits, war es möglich individuelle Zellen einem der drei Subcluster zuzuordnen (Tab. 9). Dabei wurden OA-VUMa Neurone mit identischen Projektionsmustern in den Subclustern VMmd und VMmx identifiziert (Abb. 21, 22 und 23). Alle acht OA-VUMa Typen (Tab. 9) konnten beiden Subclustern

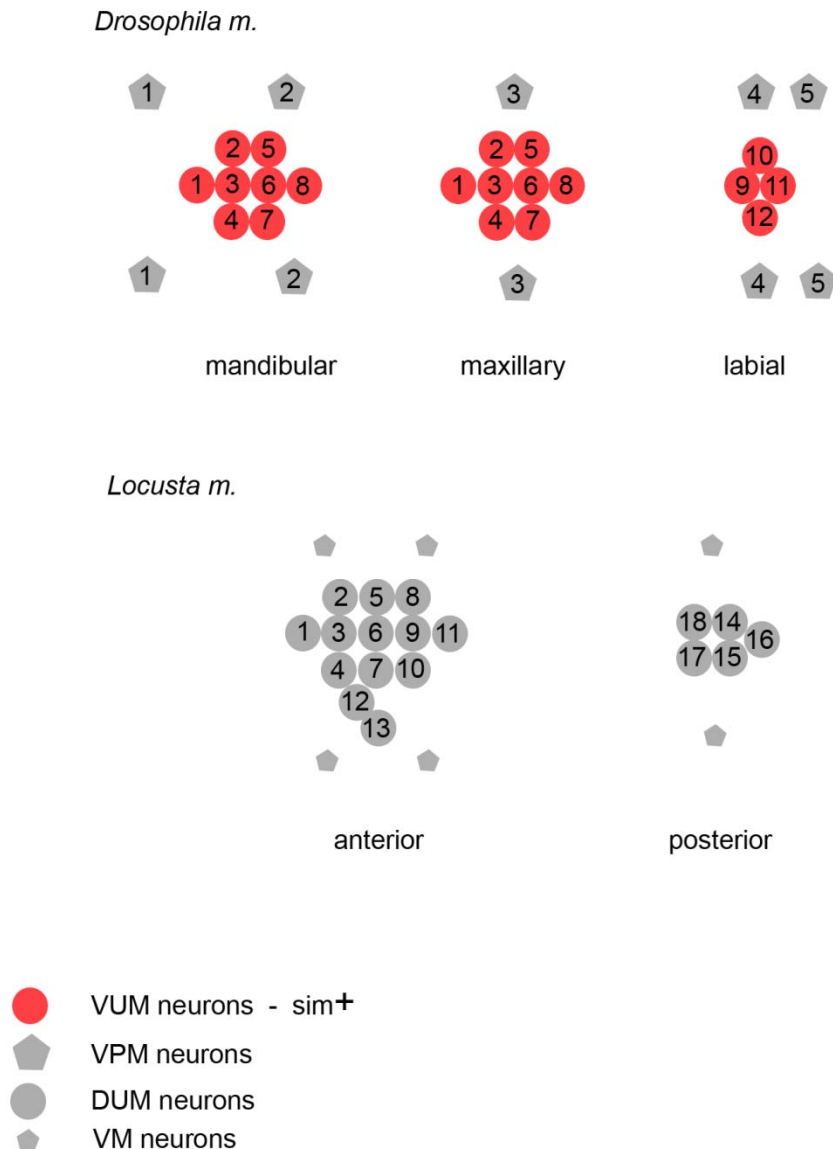
Zelltyp	3.7sim-flp#1 (n=75)	3.7sim-flp#2 (n=86)	3.7sim-flp#3 (n=76)	3.7sim-flp#4 (n=77)	3.7sim-flp#6 (n=91)	Summe (n=420)
OA-VUMa1	-	6	9	20	11	47
OA-VUMa2	1	4	10	16	6	38
OA-VUMa3	1	3	5	12	5	26
OA-VUMa4	1	4	9	16	6	37
OA-VUMa5	-	-	-	1	-	1
OA-VUMa6	1	2	2	8	8	21
OA-VUMa7	-	2	1	1	1	5
OA-VUMa8	-	4	1	7	7	19
OA-VUMd1	3	3	3	5	3	20
OA-VUMd2	-	7	5	11	14	40
OA-VUMd3	-	2	3	8	6	21
OA-VUMd4	-	3	5	1	2	11
OA-VPM1	-	-	-	-	-	-
OA-VPM2	-	-	-	-	-	-
OA-VPM3	-	-	-	-	-	-
OA-VPM4	-	-	-	-	-	-
OA-VPM5	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 10.** Trefferhäufigkeit der Zelltypen aus Cluster VM in einem Mittellinien-spezifischen Flp-out-System.

zugeordnet werden. Im Fall von OA-VUMa7 und OA-VUMa8 machte dies erst die morphologische Analyse der Mittellinienklone deutlich, da sie innerhalb der Einzelzellfärbung zu selten gefärbt waren (Tab.8).

Abbildung 23 I-L zeigt ein Präparat, wo zwei Zellen des Typs OA-VUMa3 gleichzeitig im mandibularen und maxillaren Subcluster gefärbt wurden. Die primären Neurite der markierten Zellen befinden sich, klar getrennt voneinander, im mandibularen bzw. maxillaren medialen Trakt (Abb. 23J). Man kann zwei Paare sekundärer Neurite erkennen, die dicht gebündelt in das posteriore Protocerebrum projizieren (Abb. 23K und L). Abbildung 24 verdeutlicht, dass die





**Abbildung 26.** Schematische Darstellung der segmentalen Organisation subösophagealer Mittellinienneurone in *Locusta* und *Drosophila*. Punkte repräsentieren ungepaarte VUM bzw. DUM Neurone. Gepaarte Neurone werden durch Fünfecken symbolisiert. Jede Nummer entspricht einem Zelltyp mit einem bestimmten Projektionsmuster. In *Drosophila* gibt es gepaarte und ungepaarte Mittellinienneurone. Sie unterteilen sich in drei Subcluster, welche die drei Gnathalsegmente repräsentieren, d.h. Mandibular, Maxillar und Labial. Alle aufsteigenden OA-VUMa Neurone sind im mandibularen und maxillaren Neuromer dupliziert. In *Locusta* bilden ungepaarte DUM Neurone ein posteriores und ein anteriores Cluster. Ihr segmentaler Ursprung ist unklar. Außerdem zeigt *Locusta* keine Duplikation von Zelltypen des anterioren Clusters. In *Drosophila* stammen OA-VUM Neurone von der embryonalen Mittellinie ab (rot, sim positiv). OA-VPM Neurone gehen nicht aus der embryonalen Mittellinie hervor und gehören deshalb zu einem anderen Zellstammbaum. Auch in *Locusta* findet man gepaarte Mittellinienneurone (VM), jedoch mit einem relativ kleinen Zellkörper. Da ihre Morphologie bisher nicht beschrieben wurde, ist es unklar, ob sie äquivalent zu OA-VPM Neuronen in *Drosophila* sind.

beiden Paare zu verschiedenen Zellen gehören. Hier markiert GFP Verzweigungen aller GAL4 positiver Neurone. Auch in dieser Färbung sind nur zwei Paare sekundärer Neurite zu erkennen (Abb. 24 A und B). Zusätzlich wurde, mit Hilfe der FLP-Out Methode, mCD8::GFP in individuellen Neuronen von *tdc2-GAL4* exprimiert und spezifisch mit einem CD8-Antikörper detektiert. In einzelnen Präparaten überlappt das CD8-Signal mit nur einem der beiden Paare sekundärer Neurite (Abb. 24A und C). In *tdc2-GAL4* scheint es also nur zwei OA-VUMa3 Neurone zu geben, die an einem charakteristischen Paar sekundärer Neurite erkennbar sind. Dabei befindet sich die eine Zelle im mandibularen und die andere im maxillaren Subcluster. Basierend auf den statistischen und anatomischen Analysen erscheint es wahrscheinlich, dass alle OA-VUMa Neurone eine ähnliche Organisation aufweisen.

#### 4.6.7 Stereotypie der segmental duplizierten Neurone

Einzelzellfärbung, Neuropilfärbung sowie die Whole-Mount-Präparation des *Drosophila* Hirns erlauben einen hochauflösenden Vergleich von Projektionsmustern und Morphologie. Abbildung 21, 22 und 23 stellen die stereotypen Projektionsmuster von OA-VUMa1, OA-VUMa2 bzw. OA-VUMa3 in den mandibularen und maxillaren Neuromeren dar. In jedem Beispiel innervieren die segmental duplizierten Neurone dieselben Regionen im Gehirn und zeigen dort ähnliche Verzweigungsmuster. Dabei nutzen sie dieselben Fasertrakte, um ihre Zielgebiete zu erreichen (Abb. 22C, G und K; Pfeil). Sie unterscheiden sich allein durch die Projektionsbahn ihres primären Neuriten (Abb. 21B, F, J, N und 22B, F, J). Besonders deutlich wird die Stereotypie am Beispiel von OA-VUMa3 (Abb. 23). Hier kann man erkennen, dass die segmental duplizierten Neurone dicht gebündelt in ihre Zielregionen projizieren, wo ihre Verzweigungen nahezu vollständig überlappen (Abb. 23 C, D, G, H, K und L).

In allen drei Beispielen zeigen die duplizierten Neurone eine ähnlich polarisierte Morphologie. Obwohl die Duplikate in verschiedenen Neuromeren lokalisiert sind, scheinen sie in denselben Regionen synaptische Information zu erhalten bzw. das modulatorische Signal an dieselben Zielregionen weiterzuleiten.

#### 4.6.8 OA-VUM und OA-VPM Neurone gehören zu verschiedenen Zellstammbäumen

In der Heuschrecke und in *Drosophila* wurde gezeigt, dass alle ungepaarten oktopaminergen Mittellinienneurone aus der embryonalen Mittellinie hervorgehen (Thompson

und Siegler 1991b; Goodman und Spitzer 1979; Bossing und Technau 1994). Die morphologische Analyse einzelner Mittellinienklone sollte zeigen, ob OA-VPM Neurone denselben Ursprung haben. Zu diesem Zweck wurden transgene Fliegen (*3.7sim-flp*) generiert, welche die Rekombinase Flp spezifisch in der embryonalen Mittellinie exprimieren (Abb.7 und siehe Methoden). In diesem Konstrukt steht die Transkription der *flp* cDNA unter Kontrolle des Promotors *3.7sim*, der spezifisch in der embryonalen Mitellinie aktiv ist (Nambu et al. 1991). Die Kombination von *3.7sim-flp* mit *tub-FRT-GAL80-FRT* und *tdc2-GAL4* ermöglichte die Expression des Membranmarkers mCD8::GFP in einzelnen oktopaminergen Mittellinienklonen. Um Insertionseffekte auszuschließen, wurden fünf verschiedene Insertionen von *3.7sim-flp* analysiert (Tab. 10; Abb. 24).

In allen 420 Präparaten traten wiederholt alle 12 OA-VUM Neurontypen auf (Tab. 10). Dies deutet darauf hin, dass alle OA-VUM Neurone der drei gnathalen Segmente aus homologen Vorläufern hervorgehen; der embryonalen Mittellinie.

OA-VPM Neurone wurden in keinem der 420 Präparate gefärbt (Tab. 10), während die verschiedenen OA-VUM Neurone mit einer Häufigkeit von 20 bis 49 auftraten (mit Ausnahme von OA-VUMa5 und OA-VUMa7), d.h. in 4,8 bis 11,6% aller Präparate. Basierend auf diesem statistischen Argument erscheint es unwahrscheinlich, dass OA-VPM Neurone mit dem Expressionsmuster von *3.7sim-flp* überlappen. Da *3.7sim* in der gesamten embryonalen Mittellinie aktiv ist (Nambu et al. 1991), ist davon auszugehen, dass OA-VPM Neurone nicht von diesen Stammzellen abstammen. Demzufolge ist es sehr wahrscheinlich, dass sie aus einem der 30 lateralen Neuroblasten des neuronalen Ektoderms hervorgehen.

## **5. Diskussion**

Mit Hilfe genetischer Werkzeuge beschreibt diese Studie oktopaminerge Neurone im Gehirn von *Drosophila*. Die Anwendung der Flp-Out Technik (Wong et al., 2002) ermöglichte die Visualisierung einzelner Zellen. Basierend auf der systematischen Kategorisierung morphologischer Zelltypen wurde ein Katalog von 28 verschiedenen oktopaminegen Neuronen angefertigt. Diese systematische Analyse zeigt eine allgemeine zelluläre Architektur oktopaminergener Neurone: jede Zelle erhält synaptischen Input in einer bestimmten Hirnregion, der posterioren Slope, und übermittelt das Signal an verschiedene Neuropile im Zentralnervensystem. Die Neurone unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre Zielregionen.

Das oktopaminerge Mittelliniencluster des Subösophagealen Ganglions besteht aus gepaarten und ungepaarten Mittellinienneuronen. Diese Studie beschreibt ihre segmentale Organisation auf Einzelzellebene und vergleicht ihre embryonalen Anlagen. Letzteres ermöglichte die morphologische Analyse von einzelnen oktopaminergen Mittellinienklonen. OA-VPM und OA-VUM Neurone bilden zusammen drei Subcluster im Subösophagealen Ganglion, die wahrscheinlich die drei gnathalen Neuromere repräsentieren. Alle VUM Neurone stammen von der embryonalen Mittellinie ab. In den mandibularen und maxillaren Neuromeren formen sie morphologisch identische Zelltypen, mit stereotypen Innervationsmustern. VPM Neurone gehen nicht aus der embryonalen Mittellinie hervor und sind nicht segmental dupliziert.

### **5.1 Identifizierung individueller oktopaminergener Neurone**

Mit der Mosaikfärbung von *tdc2-GAL4* war es mir möglich die meisten der individuellen GAL4 exprimierenden Neurone zufällig anzufärben. Basierend auf einer Doppelfärbung der GAL4 Linie mit einem Oktopamin-Antikörper (Selcho [Diplomarbeit 2006]; Busch et al. 2009), nehme ich an, dass die 28 identifizierten Zelltypen in Cluster VM, AL2, VL und ASM oktopaminerg sind. Ihre Projektionsmuster entsprechen zum größten Teil einem früheren Bericht über die zelluläre Verteilung von Oktopamin (vgl. Cluster ASM nächster Abschnitt; Sinakevitch und Strausfeld, 2006). Jedoch markiert *tdc2-GAL4* nicht alle oktopaminergen Neurone im Gehirn (Selcho [Diplomarbeit 2006]; Busch et al. 2009). Neurone, die diese Studie nicht beschreibt, spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Modulation verschiedener Verhaltensweisen (z.B. im Ellipsoidkörper). Deshalb ist es wichtig den hier angefertigten Katalog zu vervollständigen, z.B. durch die Verwendung geeigneter GAL4-Linien.

Unter den 17 identifizierten Zelltypen in Cluster VM befinden sich 12 OA-VUM Neurone (8 OA-VUMa und 4 OA-VUMd Neurone) und 5 OA-VPM Neurone. Geht man davon aus, dass OA-VPM Neurone gepaart und alle 8 OA-VUMa Neuronentypen dupliziert sind, dann würden sie zu mindestens 30 Zellen in Cluster VM beisteuern. Jedoch wurden in *tdc2-GAL4* nur 27 Zellen in Cluster VM gezählt (Busch [Diplomarbeit 2006]; Busch et al. 2009). Diese Diskrepanz hat möglicherweise einen technischen Hintergrund. Die Whole-Mount-Präparate wurden am konfokalen Mikroskop ausschließlich von Posterior nach Anterior gescannt (Busch [Diplomarbeit 2006]). Dabei befanden sich die posterioren Zellen tief im Gewebe, was erfahrungsgemäß Auswirkungen auf die Qualität der Konfokalaufnahmen in dieser Region hat. Dadurch blieben möglicherweise einige posteriore Zellen des Clusters VM unentdeckt. Trotz dieser Diskrepanz gehe ich davon aus nahezu alle Neuronentypen in Cluster VM beschrieben zu haben.

## 5.2 Transmittereigenschaften von Cluster ASM

Es muss sich erst noch erweisen, ob Cluster ASM wirklich oktopaminerg ist (Selcho [Diplomarbeit 2006]; Busch et al. 2009), da es in keinem anderen Bericht als oktopaminerg beschrieben wurde (Kreissl et al. 1994; Monastirioti et al. 1995; Sinakevitch und Strausfeld 2006). Obwohl die Kreuzreaktivität des Oktopamin-Antikörpers mit Tyramin kontrolliert wurde (Busch et al. 2009), sind diese Neurone möglicherweise tyraminerg und produzieren kein Oktopamin.

Für die Existenz solcher Neurone sprechen Tyraminfärbungen des larvalen Gehirns in *Drosophila*, deren Muster sich von einer Oktopaminfärbung unterscheidet (Monastirioti et al. 1995; Nagaya et al. 2002). Außerdem konnten nach Doppelfärbungen in *Locusta* und *Drosophila* Tyramin-immunoreaktive Zellen identifiziert werden, die nicht mit dem Oktopamin-Signal überlappen (Busch et al. 2009; Kononenko et al. 2009). In *Locusta* innervieren sie das ventrale Nervensystem und das Gehirn, einschließlich des Zentralkörpers und der Protocerebralbrücke (Kononenko et al. 2009). Neben der Immunhistochemie weisen auch physiologische Experimente auf die eigenständige Funktion Tyramins als Neuromodulator hin. Zum Beispiel ist die *Drosophila* Mutante *honoka*, die eine reduzierte Expression des Tyramin-Rezeptors aufweist, etwas hyperaktiv und zeigt Defekte in der Olfaktorik (Kutsuake et al. 2000). Oktopamin und Tyramin haben gegensätzliche Effekte auf die Muskelkontraktion. Oktopamin verstärkt diese, wogegen Tyramin sie inhibiert (Kutsuake et al. 2000; Nagaya Y. et al. 2002). In *Manduca* konnte eine charakteristische Wirkung Tyramins auf zentrale Flug-Muster-

Generatoren im ventralen Nervensystem gezeigt werden, die sich deutlich von den Oktopamin-Effekten unterscheiden (Vierk et al. 2009).

### 5.3 Morphologische Polarität oktopaminerger Neurone

Die Verteilung der prä- und postsynaptischen Markerproteine impliziert, dass die Mehrzahl oktopaminerger Neurone hoch polarisiert ist, d.h. ihre synaptischen Eingangs- und Ausgangsregionen sind deutlich voneinander getrennt (Abb. 8 und 9). Varikose Endigungen, die über das gesamte Hirn verteilt sind, kolokalisieren mit dem präsynaptischen Marker Syt-HA. Im Gegensatz dazu akkumuliert der postsynaptische Marker Rdl-HA in der posterioren Slope, wo Neurone der Cluster VM und AL2 Verzweigungen formen, die mit dünnen dendritischen Dornen dekoriert sind (Abb. 9). In dieser Region ist die Oktopaminfärbung schwach im Vergleich zu den präsynaptischen Regionen (Monastirioti et al. 1995; Sinakevitch und Strausfeld 2006). Diese polarisierte Architektur deutet darauf hin, dass diese Neurone darauf ausgelegt sind Information in der posterioren Slope zu sammeln und verschiedene Ziele im Gehirn mit dem modulatorischen Signal zu versorgen. Die afferenten Neurone, die präsynaptisch zu den oktopaminergeren Neuronen sind, müssen noch identifiziert werden. Auf diese Weise eröffnet die charakteristische Polarität vielleicht die Möglichkeit die gesamten Neuronalen Netzwerke zu indentifizieren, die oktopaminerger Neuromodulation zu Grunde liegen.

### 5.4 Eine Eingangsregion oktopaminerger Neurone

Die Mehrzahl der oktopaminergeren Zelltypen formt dendritische Verzweigungen in der posterioren Slope. Dabei zeigen die Neurone aus den Clustern AL2 und VM strukturelle Unterschiede. Letztere verzweigen sich bilateral symmetrisch um den Oesophagus und integrieren so Information aus beiden Hirnhemisphären. OA-AL2 Neurone erhalten wohl hauptsächlich Eingangssignale in der ipsilateralen Hirnhemisphäre, da dort ihre dendritischen Verzweigungen konzentriert auftreten.

Betrachtet man die dendritischen Verzweigungen der Neurone aus Cluster AL2 bzw. VM untereinander, so fällt besonders die Ähnlichkeit ihrer Innervationsmuster in der posterioren Slope auf. Sie scheinen dort vollständig zu überlappen, was darauf hindeutet, dass sie ähnliche oder gar dieselbe Information erhalten. Andererseits wäre es auch trotz der starken

Überlappung möglich, dass die verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Eingangssignale erhalten. Dazu müssten sie sich auf Synapsenebene unterschiedlich verschalten oder verschiedene Rezeptoren exprimieren.

Außerdem war es mit der Einzelzellanalyse nicht möglich die räumliche Beziehung zwischen den dendritischen Verzweigungen verschiedener oktopaminerger Neurone zu untersuchen. Möglicherweise könnte man auf diese Weise eine Ordnung bzw. eine Struktur innerhalb der Eingangsregion erkennen.

Der sensorische Eingang der verschiedenen oktopaminerger Neurone könnte durch eine systematische Analyse ihrer Antwortsignale auf verschiedene Stimuli untersucht werden. Dies erscheint machbar, da mit *tdc2-GAL4* das richtige Werkzeug für die Identifikation der oktopaminerger Zellen im Neuropil vorhanden ist. Zudem liefert diese Studie die anatomische Grundlage für eine solch aufwendige Analyse.

## 5.5 Kombinatorische Organisation oktopaminerger Neurone

Die Einzelzell-Morphologie der oktopaminerger Neurone zeigt, dass jeder Zelltyp stereotyp eine bestimmte Kombination von Zielregionen innerviert (Abb. 10 und 20). So innervieren verschiedene Zelltypen die Pilzkörper und die Optischen Loben. Dort verzweigen sie sich in bestimmten Unterbereichen, die sich wiederum von Zelle zu Zelle unterscheiden (Abb. 20). Zum Beispiel innerviert OA-VPM3 den Fächerförmigen Körper und die Noduli, während ein anderer Zelltyp, OA-AL2i1, in die Protocerebralbrücke projiziert. Die sechs Typen absteigender Neurone zeigen ebenso individuelle Projektionsmuster (Abb. 20). Das deutet stark darauf hin, dass oktopaminerge Neurone kombinatorisch organisiert sind: Jedes individuelle Neuron scheint Komponente eines spezifischen Neuronalen Schaltkreises zu sein. Dabei könnte jeder Zelltyp eine Art "Modul" darstellen, das selektiv bestimmte Funktionen in den jeweiligen Zielregionen moduliert (Abb. 20).

Trotz ihrer individuellen Projektionsmuster überlappen verschiedene Zelltypen in bestimmten Zielregionen. Beispielsweise wird der Calyx von drei und die Antennalloben von zwei verschiedenen Zelltypen innerviert (Abb.20). Ob sie dort individuelle modulatorische Effekte vermitteln bleibt Spekulation, da die Wirkungsweise Oktopamins innerhalb des Nervensystems ungeklärt ist. Oktopamin könnte, wie an der neuromuskulären Verbindung, als Neuromodulator wirken (Hoyle et al. 1980; Watson 1984;). Dies bedeutet es wird räumlich getrennt von der aktiven Zone ausgeschüttet und diffundiert dann durch den extrazellulären Raum zu den Zielzellen. Auf diese Weise könnten die modulatorischen Signale verschiedener

oktopaminerger Neurone auf dieselben Ziele wirken. Im Gegensatz dazu steht eine Wirkung Oktopamins als Neurotransmitter, d.h. es wird an der aktiven Zone ausgeschüttet und diffundiert dann durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran. Mit Hilfe dieser Wirkungsweise Oktopamins und einer unterschiedlichen Verschaltung auf Synapsenebene, könnten die verschiedenen oktopaminerger Zelltypen unterschiedliche modulatorische Effekte in denselben Zielregionen vermitteln. Jedoch wurde die Wirkung Oktopamins als Neurotransmitter bisher nur im Lichtorgan der Feuerfliege beschrieben (Nathanson 1979; Nathanson 1985) und erscheint deshalb unwahrscheinlich.

Oktopamin moduliert verschiedene neuronale Prozesse im Gehirn von *Drosophila*, die spezifischen Hirnregionen zugeordnet werden können. Anhand dieser Karte individueller oktopaminerger Neurone ist es möglich Kandidaten-Neurone zu bestimmen, welche das modulatorische Signal zu den jeweiligen Hirnregionen übermitteln könnten. Dies wäre ein erster Ansatz zur Identifikation der oktopaminerger Neurone, welche die verschiedenen Funktionen Oktopamins vermitteln. Beispielsweise nimmt man an, dass Oktopamin das Belohnungssignal im appetitiven olfaktorischen Lernen überträgt (Schroll et al. 2006; Schwärzel et al. 2003). Anhand ihrer Projektionsmuster konnte ich fünf Kandidaten-Neurone für die Übertragung des Belohnungssignals identifizieren, d.h. OA-VUMa2, OA-VUMa5, OA-VPM3, OA-VPM4 und OA-VPM5 (Abb.20.). Sie innervieren das primäre und sekundäre olfaktorische Zentrum, oder die Pilzkörper. Letztere Region ist vor allem für seine Rolle im assoziativen olfaktorischen Lernen bekannt.

Interessanterweise ähnelt OA-VUMa2 morphologisch dem Neuron VUMmx1 der Honigbiene (Hammer 1993). Beide Neurone innervieren äquivalente Regionen im Gehirn, d.h. die Antennalloben, das laterale Protocerebrum und die Calyces der Pilzkörper. Aktivierung von VUMmx1 kann das Zuckerbelohnungssignal im appetitiven olfaktorischen Lernen ersetzen (Hammer 1993). Nun gilt es die Rolle von OA-VUMa2 und der anderen vier Kandidaten-Neurone in der Prozessierung des Belohnungssignals in *Drosophila* zu studieren. Dazu wäre es hilfreich Zugang zu einzelnen Kandidaten-Neuronen zu erhalten, z.B. durch die Verwendung geeigneter Enhancer-trap Linien.



## 5.6 Vergleichende und funktionelle Aspekte auf Einzelzellebene

Die allgemeine Organisation und Funktion des Hirns ist unter verschiedenen Insektenpezies konserviert. Interessanterweise findet man einige anatomische Merkmale oktopaminerger Neurone auch in anderen Spezies.

Ein anatomisches Merkmal oktopaminerger Neurone in *Drosophila* sind die dichten dendritischen Verzweigungen in der posterioren Slope (Abb. 9 und 20). Einzelzellstudien in der Honigbiene und der Heuschrecke zeigten, dass verschiedene VUM bzw. DUM Neurone des Subösophagealen Ganglions in einer äquivalenten Region verzweigen (Bräunig 1991; Bräunig und Burrows 2004; Schröter et al. 2007). Der postsynaptische Charakter dieser Verzweigungen wurde aber weniger deutlich, was auch an dem Fehlen transgener Marker liegt. Außerdem sind die Verzweigungen in *Drosophila* besonders extensiv. Das liegt möglicherweise an der Fusion von Supra- und Subösophagealem Ganglion, wodurch die Neuomere stark verdichtet werden.

Subösophageale VUM/DUM Neurone anderer Insekten modulieren verschiedene sensorische Afferenzen durch die Innervation sensorischer Nerven (Bräunig 1991; Bräunig und Pflüger 2001; Schröter et al. 2007). In *Drosophila* innervieren Neurone der Cluster VM und AL2 die Zielregionen von sensorischen Neuronen, einschließlich der optischen Loben, des antenno-mechano-sensorischen Zentrums, der Antennalloben und des Subösophagealen Ganglions. Deshalb erscheint es möglich, dass Oktopamin primäre sensorische Information moduliert. In dieser Studie beschreibe ich keine efferenten oktopaminerger Neurone, was wahrscheinlich einen technischen Grund hat. Bei meiner Whole-Mount Präparation schneide ich normalerweise die sensorischen Nerven nahe am Hirn ab, weshalb einzelne efferente Fasern nicht detektierbar sind.

Die Neurone aus Cluster AL2 innervieren die Medulla, Lobula und Lobula Platte, aber nicht die Lamina (Fig. 6 und 7). OA-AL2 Neurone formen dabei ipsilaterale bzw. bilaterale Projektionen im Gehirn (OA-AL2i und OA-AL2b). Ihre strukturelle Ähnlichkeit mit PM4 und PM5 Neuronen in *Locusta* ist besonders auffällig (Stern 1999; Stern et al. 1995). Diese Neurone sind in die Dishabituation der Antwort des visuellen Interneurons DCMD involviert. Aufgrund ihrer homologen Architektur scheint es möglich, dass OA-AL2i Neurone in *Drosophila* die visuelle Information auf ähnliche Weise modulieren. Es sollte von Wichtigkeit sein, zu klären, ob OA-AL2 Neurone direkte synaptische Kontakte mit sensorischen Neuronen ausbilden. Da OA-AL2 Neurone die Lamina nicht innervieren und diese frei von Oktopamin-Immunoreaktivität ist, kommen in den Optischen Loben nur die inneren Photorezeptoren (R7 und R8) als direkte sensorische Ziele in Frage (Sinakevitch und Strausfeld 2006).

In meiner Studie beschreibe ich 7 verschiedene Typen absteigender oktopaminerger Neurone: vier VUM Neurone (OA-VUMd), ein OA-VPM Neuron, und zwei OA-VL Neurone. Bis auf OA-VUMd3, weisen alle Zelltypen aufsteigende Projektionen im Hirn und absteigende sekundäre Neurite auf, welche die cervikalen Konnektive innervieren (Abb. 13, 16 und 18). Die absteigenden oktopaminerger Neurone regulieren möglicherweise zentrale Mustergeneratoren in den Thorakalganglien, da dort Oktopamin-Applikation bestimmte motorische Verhaltensweisen, wie Lokomotion oder Putzen, auslöst (Yellman et al. 1997).

### 5.7 Segmentale Organisation der oktopaminerger Mittellinienneurone

Die oktopaminerger Mittellinienneurone des Subösophagealen Ganglions bilden drei Subcluster, die entlang der antero-posterioren Achse angeordnet sind. Sie repräsentieren wahrscheinlich die drei Neuomere des Gnathalsegments, d.h. das mandibulare, maxillare und labiale Neuomer. Alle absteigenden VUM Neurone gehören zum posterioren Subcluster VMlb (Abb. 15 und 25; Tab. 9). Dieses Merkmal findet man ähnlich in *Locusta*, wo äquivalente absteigende DUM Neurone auch im posterioren Cluster lokalisiert sind (Abb. 25; Bräunig und Burrows 2004).

Am Beispiel von OA-VUMa3 konnte ich zeigen, dass es jeweils eine Zelle dieses Typs im mandibularen und maxillaren Subcluster gibt (Abb. 23 und 24). Sie zeigen hoch stereotype Verzweigungen in ihren Zielregionen. In Anbetracht der statistischen und anatomischen Analysen (Tab.9; Abb. 21 und 23) ist es wahrscheinlich, dass das gesamte Set aufsteigender OA-VUMa Neurone im mandibularen und maxillaren Neuomer dupliziert ist.

Eine ähnliche Organisation zeigen bestimmte seriell homologe Interneurone in den Thorakalganglien von *Schistocera* (Pearson et al. 1985). Die Neurone 714, 531 und 529 gehen aus homologen Vorläufern der Segmente T2, T3 bzw. A1 hervor. Sie projizieren durch dieselben Fasertrakte in eine bestimmte Region im Gehirn, das laterale Protocerebrum (Boyan und Altman 1985A; Prier und Boyan 2000). Interessanterweise erhalten sie unterschiedlichen chordotonalen Input: Neuron 714 erhält Input von homologen chordotonalen Organen der Segmente T2, T3 und A1-A9, die sich zu Propriozeptoren der Flügel (in T2 und T3) der Körperwand (in A2-A9) bzw. einem Tympanalorgan (in A1) spezialisiert haben. Neuron 531 wird nur durch Stimulation des Tympanalorgans in Segment A1 aktiviert und scheint ausschließlich in das auditorische System eingebettet zu sein. Alle drei Interneurone, d.h. 714, 531 und 529, innervieren die Terminalregionen chordotonaler Afferenzen, überlappen untereinander aber nicht vollständig.

Trotzdem die dendritischen Verzweigungen der duplizierten VUMa Neurone vollständig überlappen, könnten auch sie unterschiedliche Eingangssignale erhalten (siehe Absatz 5.3). Zieht man außerdem eine neuromodulatorische Wirkung Oktopamins in Betracht (siehe Absatz 5.4), so erscheint eine Konvergenz ihrer modulatorischen Information in den jeweiligen Zielregionen möglich. Intersegmental konvergierende Neurone könnten ein einfaches Netzwerkdesign darstellen, indem verschiedene Stimuli dieselben modulatorischen Effekte vermitteln.

Hinter der Bildung der stereotypen Projektionsmuster muß ein gewisser energetischer Aufwand für den Organismus stehen, der auf den ersten Blick nur bei einer funktionellen Bedeutung der Duplikation sinnvoll ist. Bei einer Redundanz der duplizierten Neurone stellt sich die Frage nach dem Vorteil von zwei funktionell identischen Sets modulatorischer Neurone. Möglicherweise dient das redundante System dazu Defekte in der Übertragung des modulatorischen Signals ausgleichen zu können. Bei der Störung bzw. dem Ausfall einer Komponente könnte die andere den Dienst übernehmen.

In Anlehnung an die Genduplikation, könnte eine zufällige Verdopplung segmental homologer Zellcluster bzw. Zellstammbäume einen Mechanismus der Evolution neuronaler Netzwerke darstellen. Zunächst ohne funktionelle Bedeutung, könnten sich die duplizierten Cluster getrennt weiterentwickeln und so das Spektrum der ursprünglichen neuronalen Aktivität erweitern. In diesem Zusammenhang ist ein Vergleich der segmentalen Organisation oktopaminerger Mittellinienneurone verschiedener Spezies interessant. In der Honigbiene wurde ein einziges, segmental dupliziertes VUM Neuron, aber nicht ein ganzes Cluster, beschrieben (VUMmx1; Schröter et al. 2007). *Locusta* entwickelt wahrscheinlich keine duplizierten Zelltypen, da hier die Zahl Oktopamin-immunoreaktiver Zellen mit der Anzahl der Zelltypen im anterioren Cluster übereinstimmt (Bräunig 1991; Abb. 25). Eine segmentale Duplikation des gesamten Sets aufsteigender Mittellinienneurone scheint einzigartig für *Drosophila* zu sein. Möglicherweise geht die unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung des oktopaminergeren Mittellinienclusters in verschiedenen Spezies auf eine Duplikation der Zelltypen im mandibularen und maxillaren Segment zurück.

## 5.8 Gepaarte Mittellinienneurone

In verschiedenen Insekten waren nach einer Oktopaminfärbung gepaarte Zellkörper markiert, die sich lateral der ungepaarten Mittellinienneurone befinden (Abb. 25; Sinakevitch et

al. 2005; Stevenson und Spörhase-Eichmann 1995). Die Morphologie dieser gepaarten Mittellinienneurone war bisher unbekannt. Diese Einzelzellanalyse beschreibt zum ersten Mal die Projektionsmuster verschiedener OA-VPM Neurone im Subösophagealen Ganglion (Abb. 16).

Wie auch OA-VUM Neurone, zeigen OA-VPM Neurone extensive Verzweigungen im Gehirn sowie eine polarisierte Morphologie. Einige Hirnregionen, wie der Fächerförmige Körper, die Noduli und die horizontalen Loben der Pilzkörper, werden ausschließlich von VPM Neuronen innerviert. Interessanterweise wurden in *Locusta m.*, wo es keine gepaarten Mittellinienneurone gibt, bilateral symmetrische DUM Neurone mit ähnlichen Projektionsmustern beschrieben. Beispielsweise innerviert das DUM Neuron SA1 den Zentralkomplex, verschiedene Bereiche des Protocerebrums und die Calyces der Pilzkörper (Bräunig 1991). In *Drosophila* innerviert das Neuronenpaar OA-VPM3 äquivalente Regionen, d.h. den Fächerförmigen Körper des Zentralkomplexes, das Protocerebrum und auch die Calyces (Abb. 16I-L). Basierend auf der äquivalenten Anatomie der oktopaminergen Neurone beider Spezies, scheint es möglich, dass sie ähnliche Funktionen ausüben.

## 5.9 Ursprung oktopaminerger Mittellinienneurone

Die embryonale Mittellinie besteht aus 7 Medialen Vorläufern und einem Medialen Neuroblasten (Klämbt et al. 1991; Bate 1976). Ich nutzte das Konstrukt *3.7sim-flp*, um die Morphologie von einzelnen Mittellinienklonen zu analysieren. In den angefertigten Präparaten wurden alle Typen subösophagealer OA-VUM Neurone wiederholt gefärbt (Tab. 10), was dafür spricht, dass alle OA-VUM Neurone von der embryonalen Mittellinie abstammen (Nambu et al. 1991; Abb. 25). Da *sim* in der gesamten Mittellinie exprimiert wird, ist es nicht möglich potentielle Vorläufer weiter einzuschränken.

Die Zellstammbäume für VUM Neurone in *Drosophila* bzw. DUM Neurone in *Locusta* wurden in den Thorakalganglien beschrieben (Thompson und Siegler 1991b; Goodman und Spitzer 1979; Bossing und Technau 1994). Während VUM Neurone von einem Set Medialer Vorläufer abstammen, gehen DUM Neurone aus dem Medialen Neuroblasten hervor. Eine einfache Übertragung dieser Ergebnisse auf das Subösophageale Ganglion ist jedoch schwierig, da z.B. in *Locusta* bestimmte Mediale Vorläufer fehlen bzw. ein zusätzlicher anteriorer Neuroblast im maxillaren Segment vorhanden ist (Doe und Goodman 1985a). Deshalb beschränke ich mich auf die Annahme, dass VUM und DUM Neurone von der Mittellinie als

ganzes abstammen. Somit würden sie in beiden Spezies aus einem einander homologen Set embryonaler Stammzellen hervorgehen.

Unter den Mittellinienklonen fanden wir in 420 Präparaten kein OA-VPM Neuron (Tab. 10). Frühere Arbeiten zeigen, dass die Expression von Reportergenen schon während des Blastulastadiums in allen Mittellinienvorläufern detektierbar ist, wenn sie unter der Kontrolle von *3.7sim* stehen (Nambu et al. 1991). Außerdem ist es in meinem System nicht kritisch wie früh FLP aktiv ist. Das Ausschneiden von GAL80 ist unabhängig von mitotischer Rekombination und kann daher auch nach der Teilung der Stammzellen erfolgen. Somit ist es unwahrscheinlich, dass ich frühe oktopaminerge Nachkommen der embryonalen Mittellinie verfehlt habe. Ich gehe deshalb davon aus, daß OA-VPM Neurone nicht aus der Mittellinie hervorgehen. Obwohl OA-VPM und OA-VUM Neurone ein Cluster oktopaminerger Mittellinienneurone im Subösophagealen Ganglion formen, scheinen sie verschiedene Ursprünge zu haben (Abb. 25).

## 5.10 Evolution oktopaminerger Mittellinienneurone

Verschiedene Insekten wie Honigbienen, Schaben und *Drosophila* weisen ungepaarte und gepaarte Mittellinienneurone im Subösophagealen Ganglion auf (Sinakevitch et al. 2005; Sinakevitch und Strausfeld 2006). Ungepaarte oktopaminerge Mittellinienneurone wurden nur in Insekten beschrieben. Im Hummer, der wie in Insekten zu den Hexapoda gehört, zeigen alle oktopaminergen Mittellinienneurone des Subösophagealen Ganglions eine gepaarte Konfiguration. Ähnlich wie in Insekten scheinen sie das Hirn zu innervieren und sich dort in verschiedenen Neuropilen zu verzweigen (Schneider et al. 1993). Da gepaarte Neurone in Crustacea und Insekten gefunden wurden, könnte dieses Merkmal auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen. Solange keine ungepaarten oktopaminergen Mittellinienneurone außerhalb der Insekten beschrieben werden, kann man annehmen, dass sie sich erst in Insekten entwickelt und dort die gepaarten Neurone ersetzt haben. Dabei könnte sich das Entwicklungsprogramm in Insekten verändert haben. Anstelle von gepaarten Neuronen, die von bilateral homologen Neuroblasten abstammen, bildeten sie aus der embryonalen Mittellinie ungepaarte oktopaminerge Neurone.

Besonders interessant ist die Morphologie von OA-VUMa2 und OA-VPM5 in *Drosophila* (Abb. 17E-H und 16Q-T). Beide Neurone innervieren die Antennalloben und senden einen Fortsatz durch den inneren antenno-cerebralen Trakt zu den Calyces und dem lateralen Horn. Ihre Morphologie ist größtenteils identisch. Jedoch zeigt OA-VUMa2 ein symmetrisches und OA-VPM5 ein asymmetrisches Innervationsmuster. Dies ist möglicherweise ein Beispiel für den

Übergang von gepaarten zu ungepaarten Neuronen auf Einzelzellebene. Die Situation in *Drosophila* repräsentiert vielleicht eine Art Zwischenlösung innerhalb der Insekten.

Unsere ausführliche Einzelzellanalyse hat eine beträchtliche Ähnlichkeit der allgemeinen Organisation oktopaminerger Neurone in *Drosophila* und anderen Spezies gezeigt. Die konservierte Architektur verdeutlicht den wichtigen Zusammenhang von Struktur und Funktion. Außerdem gibt die Analyse einen Eindruck darüber, wie praktikabel *Drosophila melanogaster* als genetisch zugängliches Modellsystem für das Studium von Funktion, Entwicklung und Evolution oktopaminerger Neurone sein kann.



## **6. Literaturverzeichnis**

- Adamo SA, Linn CE, Hoy RR.** 1995. The role of neurohormonal octopamine during “fight or flight” behavior in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.* 198:1691–700
- Arikawa K, Washio H, Tanaka Y.** 1984. Dorsal unpaired median neurons of the cockroach metathoracic ganglion. *J. Neurobiol.* 15: 531-536
- Baier A, Wittek B, Brembs B.** 2002. *Drosophila* as a new model organism for the neurobiology of aggression? *J Exp Biol.* 205: 1233-1240.
- Baines RA, Uhler JP, Thompson A, Sweeney ST, Bate M.** 2001. Altered electrical properties in *Drosophila* neurons developing without synaptic transmission. *J Neurosci* 21:1523–1531.
- Bartos M, Honegger HW.** 1992. Complex innervations of three neck muscles by motor and dorsal unpaired median neurons in crickets. *Cell Tiss. Res.* 267: 399-406
- Bate CM.** 1976. Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Loeusta migratoria*. *J. Embryol. exp. Morph.* 35, 107-123.
- Bellah KH, Fitch GK, Kammer AE.** 1984. A central action of octopamine on ventilation frequency in *Corydalus cornutus*. *J. Exp. Zool.* 231:289–92
- Blumenthal EM.** 2003. Regulation of chloride permeability by endogenously produced tyramine in the *Drosophila* Malpighian tubule. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284:718–28
- Bossing T, Technau GM.** 1994. The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. *Development.* 120(7):1895-906.
- Boyan GS, Altman JS.** 1985. The suboesophageal ganglion: a 'missing link' in the auditory pathway of the locust. *J Comp Physiol A.* 156:413-428
- Brand AH, Dormand EL.** 1995. The GAL4 system as a tool for unraveling the mysteries of the *Drosophila* nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5:572–578.
- Brand AH, Perrimon N.** 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118(2):401-15.
- Bräunig P.** 1991. Suboesophageal DUM neurons innervate the principal neuropiles of the locust brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 332:221–240.
- Bräunig P, Burrows M.** 2004. Projection patterns of posterior dorsal unpaired median neurons of the locust suboesophageal ganglion. *J Comp Neurol* 478:164 –175.
- Bräunig P, Pflüger HJ.** 2001. The unpaired median neurons of insects. *Advances in Insect Physiol.* 28: 185-266.

- 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
- Brunn DE.** 1989. Dorsal unpaired median neurons in the mesothoracic ganglion of the stick insect, *Carausius morosus*. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Congress of Neuroethology. 2: 47
- Busch S.** 2006: Anatomische Analyse von tyraminergen Neuronen in *Drosophila m.* (Diplomarbeit); Würzburg: Universität Würzburg
- Busch S, Selcho M, Ito K, Tanimoto H.** 2009. A map of octopaminergic neurons in the *Drosophila* brain. *J. Comp. Neurol.* 513: 643-667
- Certel SJ, Savella MG, Schlegel DC, Kravitz EA.** 2007. Modulation of *Drosophila* male behavioral choice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4706– 4711.
- Cole SH, Carney GE, McClung CA, Willard SS, Taylor BJ, Hirsh J.** 2005. Two functional but non-complementing *Drosophila* tyrosine decarboxylase genes: distinct roles for neural tyramine and octopamine in female fertility. *J Biol Chem* 280:14948 –14955.
- Dacks AM, Christensen TA, Agricola HJ, Wollweber L, Hildebrand JG.** 2005. Octopamine-immunoreactive neurons in the brain and suboesophageal ganglion of the hawkmoth *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* 488:255–268.
- Datta SR, Vasconcelos ML, Ruta V, Luo S, Wong A, Demir E, Flores J, Balonze K, Dickson BJ, Axel R.** 2008. The *Drosophila* pheromone cVA activates a sexually dimorphic neural circuit. *Nature* 452:473– 477.
- Denburg JL, Barker DL.** 1982. Specific reinnervation of cockroach leg muscles by octopaminergic, dorsal unpaired median neurons. *J. Neurobiol.* 13: 551-557
- Doe CQ, Goodman CS.** 1985a. Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Devl Biol.* 111 , 193-205.
- Downer RGH, Orr GL, Gole JWD, Orchard I.** 1984. The role of octopamine and cyclic AMP in regulating hormone release from corpora cardiaca of the American cockroach. *J Insect Physiol* 30:457– 462.
- Duffy JB.** 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis.* 34(1-2):1-15.
- Elia AJ, Gardner DR.** 1990. Some morphological and physiological characteristics of an identifiable dorsal unpaired median neuron in the metathoracic ganglion of cockroach, *Periplaneta Americana* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 95C, 55-62
- Erspamer V, Boretti G.** 1951. Identification and characterization by paper chromatography of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior

salivary glands of Octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates. Arch. Int. Pharmacodyn. 88:296–332

**Evans PD, O’Shea M.** 1977. An octopaminergic neuron modulates neuromuscular transmission in the locust. Nature 270:257–59

**Evans PD.** 1981. Multiple receptor types for octopamine in the locust. J. Physiol. 319:99–122

**Fiala A, Spall T.** 2003. In vivo calcium imaging of brain activity in *Drosophila* by transgenic cameleon expression. Sci STKE.18;2003(174):PL6.

**Goodman CS, Spitzer NC.** 1979. Embryonic development of identified neurons: differentiation from neuroblast to neuron. Nature, Lond. 288: 208-214.

**Goodman CS, Bate M.** 1981. Neuronal development in the grasshopper. Trends Neurosci. July: 163-169.

**Gras H, Hörner M, Runge L, Schürmann FW.** 1990. Prothoracic DUM neurons of the cricket *Gryllus bimaculatus* – responses to natural stimuli and activity in walking behavior. J. comp. Physiol. A 166: 901-914

**Hammer M.** 1993. An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. Nature 366:59 – 63.

**Hoyer SC, Eckart A, Herrel A, Zars T, Fischer SA, Hardie SL, Heisenberg M.** 2008. Octopamine in male aggression of *Drosophila*. Curr Biol 18:159 –167.

**Hoyle G, Barker DL.** 1975. Synthesis of octopamine by insect dorsal unpaired neurons. J. Exp. Zool. 193:433–39

**Hoyle G, Colquhoun W, Williams M.** 1980. Fine Structure of an octopaminergic neuron and its terminals. J. Neurobiol. 11, 103-126

**Jefferis GS, Potter CJ, Chan AM, Marin EC, Rohlifing T, Maurer CR Jr, Luo L.** 2007. Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. Cell 128:1187–1203.

**Jenett A, Schindelin JE, Heisenberg M.** 2006. The Virtual Insect Brain protocol: creating and comparing standardized neuroanatomy. BMC Bioinformatics 7:544.

**Kitamoto T.** 2001. Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. J Neurobiol. (2):81-92.

**Klagges BR, Heimbeck G, Godenschwege TA, Hofbauer A, Pflugfelder GO, Reifegerste R, Reisch D, Schaupp M, Buchner S, Buchner E.** 1996. Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. J Neurosci 16:3154 –3165.

**Klämbt C, Jacobs JR, Goodman CS.** 1991. The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. Cell. Feb 22;64(4):801-15.

- 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* 251:371–379.
- Kononenko NL, Wolfenberg H, Pflüger HJ.** 2009. Tyramine as an independent transmitter and a precursor of octopamine in the locust central nervous system: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol.* Feb 1;512(4):433-52.
- Kreissl S, Eichmüller S, Bicker G, Rapus J, Eckert M.** 1994. Octopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. *J Comp Neurol* 348:583–595.
- Kutsukake M, Komatsu A, Yamamoto D, Ishiwa-Chigusa S.** 2000. A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 245:31–42
- Malamud JG, Miszin AP, Josephson RK.** 1988. The effects of octopamine on contraction kinetics and power output of the locust flight muscle. *J. Comp. Physiol.* 165:827–35
- Monastirioti M, Gorczyca M, Rapus J, Eckert M, White K, Budnik V.** 1995. Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 356:275–287.
- Monastirioti M, Linn CE Jr, White K.** 1996. Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J Neurosci* 16:3900 –3911.
- Monastirioti M.** 2003. Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 264:38 – 49.
- Nagaya Y, Kutsukake M, Chigusa SI, Komatsu A.** 2002. A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. *Neurosci. Lett.* 329:324–28
- Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA, Crews ST.** 1991. The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67(6): 1157--1167
- Nathanson JA.** 1979. Octopamine receptors, adenosine 3-, 5-monophosphate and neural control of firefly flashing. *Science* 203:65–68
- Nathanson JA.** 1985. Phenyliminoimidazolidines. Characterization of a class of potent agonists of octopamine-sensitive adenylate cyclase and their use in understanding the pharmacology of octopamine receptors. *Mol. Pharmacol.* 28:254–68
- Orchard I, Carlisle JA, Loughton BG, Gole JWD, Downer RGH.** 1982. In vitro studies on the effects of octopamine on locust fat body. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48:7–13

- Otsuna H, Ito K.** 2006. Systematic analysis of the visual projection neurons of *Drosophila melanogaster*. I. Lobula-specific pathways. *J Comp Neurol* 497:928–958.
- Pearson KG, Boyan GS, Bastiani M, Goodman.** 1985. Heterogeneous Properties of Segmentally Homologous Interneurons in the Ventral Nerve Cord of Locusts. *J Comp Neurol*. 233:133-145
- Pirotta V.** 1988. Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. In: Rodriguez RL, Denhardt DT (eds) *Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses*. Butterworth, Boston: 437–456
- Pollack AJ, Ritzmann RE, Westin J.** 1988. Activation of DUM cell interneurons by ventral giant interneurons in the cockroach, *Periplaneta Americana*. *J. Neurobiol.* 19: 489-497
- Pophof B.** 2002. Octopamine enhances moth olfactory responses to pheromones, but not those to general odorants. *J. Comp. Physiol. A* 188:659–62
- Prier KR, Beckman OH, Tublitz NJ.** 1994. Modulating a modulator: biogenic amines at subthreshold levels potentiate peptidemediated cardioexcitation of the heart of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 197:377–91
- Prier KR, Boyan GS.** 2000. Synaptic input from serial chordotonal organs onto segmentally homologous interneurons in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *J Insect Physiol.* 46(3):297-312
- Ramirez J-M, Orchard IAN.** 1990. Octopaminergic modulation of the forewing stretch receptor in the locust *Locusta migratoria*. *J Exp Biol* 149:255–279.
- Robinson GE, Heuser LM, LeConte Y, Lenquette F, Hollingworth RM.** 1999. Neurochemicals aid bee nestmate recognition. *Nature* 399:534–35
- Robinson IM, Ranjan R, Schwarz TL.** 2002. Synaptotagmins I and IV promote transmitter release independently of Ca<sup>2+</sup> binding in the C(2)A domain. *Nature* 418:336–340.
- Röder T.** 1999. Octopamine in invertebrates. *Prog. Neurobiol.* 59:1–31
- Röder T.** 2003. Metabotropic histamine receptors: nothing for invertebrates? *Eur. J. Pharmacol.* 466:85–90
- Röder T.** 2005. Tyramine and Octopamine: Ruling Behavior and Metabolism. *Annu. Rev. Entomol.* 2005. 50:447–77
- Sanchez-Soriano N, Bottenberg W, Fiala A, Haessler U, Kerassoviti A, Knust E, Lohr R, Prokop A.** 2005. Are dendrites in *Drosophila* homologous to vertebrate dendrites? *Dev Biol* 288:126–138.

- Schneider H, Trimmer BA, Rapus J, Eckert M, Valentine DE, Kravitz EA.** 1993. Mapping of octopamine-immunoreactive neurons in the central nervous system of the lobster. *J Comp Neurol.* 1993 Mar 1;329(1):129-42
- Scholz H, Ramond J, Singh CM, Heberlein U.** 2000. Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron* 28:261–271.
- Schroll C, Riemensperger T, Bucher D, Ehmer J, Vo" ller 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* 16:1741–1747.
- Schröter U, Malun D, Menzel R.** 2007. Innervation pattern of suboesophageal ventral unpaired median neurones in the honeybee brain. *Cell Tissue Res* 327:647– 667.
- Schulz DJ, Robinson GE.** 1999. Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *J. Comp. Physiol. A* 187:53–61
- Schulz DJ, Robinson GE.** 2001. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age related changes in the mushroom bodies. *J. Comp. Physiol. A* 184:481–88
- 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: 10495–10502.
- Selcho M.** 2006: Histochemische Analyse einzelner Neurone in *Drosophila melanogaster*. (Diplomarbeit); Würzburg: Universität Würzburg
- Sinakevitch I, Niwa M, Strausfeld NJ.** 2005. Octopamine-like immunoreactivity in the honey bee and cockroach: comparable organization in the brain and suboesophageal ganglion. *J Comp Neurol* 488:233–254.
- Sinakevitch I, Strausfeld NJ.** 2006. Comparison of octopamine-like immunoreactivity in the brains of the fruit fly and blow fly. *J Comp Neurol* 494:460 – 475.
- Sombati S, Hoyle G.** 1984. Central nervous sensitization and dishabituation of reflex action in an insect by the natural neuromodulator octopamine. *J. Neurobiol.* 15:455–80
- Sombati S, Hoyle G.** 1984. Generation of specific behaviors in a locust by local release into neuropil of the natural neuromodulator octopamine. *J Neurobiol.* 15: 481-506.
- Spörhase-Eichmann U, Vullings HGB, Buijs RM, Hörner M, Schürmann FW.** 1992. Octopamine-immunoreactive neurons in the central nervous system of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Cell Tiss. Res.* 268, 287-304.
- Stern M, Thompson KSJ, Zhou P, Watson DG, Midgley JM, Gewecke M, Bacon JP.** 1995. Octopaminergic neurons in the locust brain: morphological, biochemical and



electrophysiological characterisation of potential modulators of the visual system. *J Comp Physiol [A]* 177:611–625.

**Stern M.** 1999. Octopamine in the locust brain: cellular distribution and functional significance in an arousal mechanism. *Microsc Res Tech*45:135–141.

**Stevenson PA, Spörhase-Eichmann U.** 1995. Localization of octopaminergic neurones in insects. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 110:203–215.

**Sweeney ST, Broadie K, Keane J, Niemann H, O’Kane CJ.** 1995. Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14:341–351.

**Tanaka Y, Washio H.** 1988. Morphological and physiological properties of the dorsal unpaired median neurons of the cockroach metathoracic ganglion. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 91: 37-41

**Thomson KJ, Siegler MVS.** 1991b. Anatomy and physiology of spiking local and intersegmental interneurons in the median neuroblast lineage of the grasshopper. *J. comp. Neurol.* 305: 659-675.

**Thompson KJ, Siegler MVS.** 1993. Development of segment specificity in identified lineages of the Grasshopper CNS. *J. Neuroscience.* 13(8): 3309-3318

**Vergoz V, Roussel E, Sandoz JC, Giurfa M.** 2007. Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PLoS ONE* 2:e288.

**Vierk R, Pflüger HJ, Duch C.** 2009. Differential effects of octopamine and tyramine on the central pattern generator for *Manduca* flight. *J Comp Physiol A.*

**Wang Z, Hayakawa Y, Downer RGH.** 1990. Factors influencing the cyclic AMP and diacylglycerol levels in fat body of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 20:325–30

**Watson, A.H.D.** 1984. The dorsal unpaired median neurons of the locust methathoracic ganglion: neuronal structure and diversity, and synapse distribution. *J. Neurocytol.* 13, 303-327

**Wilson RI, Turner GC, Laurent G.** 2004. Transformation of olfactory representations in the *Drosophila* antennal lobe. *Science.* 303(5656):366-70.

**Wong AM, Wang JW, Axel R.** 2002. Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell* 109:229 –241.

**Yellman C, Tao H, He B, Hirsh J.** 1997. Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4131–36

**Zhou C, Rao Y, Rao Y.** A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nat Neurosci.* 2008 Sep;11(9):1059-67

## **7. Zusammenfassung**

Das biogene Amin Oktopamin moduliert verschiedene Verhaltensweisen in Invertebraten. In verschiedenen Insektenpezies, wie Heuschrecken, Grillen oder Schaben, ist die Funktion und die Architektur des peripheren oktopaminergen Systems auf Einzelzellebene bekannt. Um die zelluläre Grundlage für die verschiedenen Funktionen von Oktopamin im Zentralnervensystem zu verstehen, ist eine detaillierte Analyse der Architektur des zentralen oktopaminergen Systems notwendig. Innerhalb meiner Doktorarbeit fertigte eine anatomische Karte individueller oktopaminergener Neurone des adulten Hirns von *Drosophila* an. Ich nutzte die Flp-out Technik, um einzelne oktopaminerge Neurone anzufärben. Anhand ihrer Projektionsmuster konnte ich 28 verschiedene Zelltypen in vier Oktopamin-immunoreaktiven Zellclustern identifizieren. Ihre Morphologie sowie die Verteilung genetischer Marker zeigte, dass die meisten Zelltypen mehrere Neuropile innervieren und dabei eine klare Trennung von Prä- und Postsynaptischen Regionen aufweisen. Die Mehrheit der Zelltypen bildet dendritische Verzweigungen in einer bestimmten Region, der posterioren Slope. Jedoch innerviert jeder Zelltyp stereotyp eine bestimmte Kombination von Zielregionen im Gehirn. Das deutet stark darauf hin, dass oktopaminerge Neurone kombinatorisch organisiert sind: Jedes individuelle Neuron scheint Komponente eines spezifischen neuronalen Schaltkreises zu sein. Dabei könnte jeder Zelltyp eine Art "Modul" darstellen, das selektiv bestimmte Funktionen in den jeweiligen Zielregionen moduliert.

Das oktopaminerge Mittelliniencluster des Subösophagealen Ganglions zeigt eine besondere zelluläre Organisation. Es besteht aus gepaarten und ungepaarten Neuronen, die des Zentralgehirn mit extensiven Verzweigungen versorgen. Um die Ordnung hinter dieser komplexen Organisation zu verstehen, wurden die segmentale Organisation der Mittellinienneurone auf Einzelzellebene analysiert und ihre embryonalen Anlagen verglichen. Letzteres ermöglichte die morphologische Analyse von einzelnen oktopaminergen Mittellinienklonen. OA-VPM und OA-VUM Neurone bilden zusammen drei Subcluster im Subösophagealen Ganglion, die wahrscheinlich die drei gnathalen Neuromere repräsentieren. Alle OA-VUM Neurone stammen von der embryonalen Mittellinie ab. In den mandibularen und maxillaren Neuromeren formen sie morphologisch identische Zelltypen, mit stereotypen Innervationsmustern. OA-VPM Neurone gehen nicht aus der embryonalen Mittellinie hervor und sind nicht segmental dupliziert. Diese Arbeit vermittelt nicht nur einen Eindruck über die Architektur individueller oktopaminergener Neurone, sondern auch über die Organisation des oktopaminergen Systems auf Einzelzellebene.

## **8. Summary**

The biogenic amine octopamine modulates diverse behaviors in invertebrates. In different insect species, such as locusts, crickets, or cockroaches, the function and organization of the peripheral octopaminergic system is understood at single cell level. To understand the basis for the diverse octopamine functions within the central nervous system, a detailed morphological analysis of central octopaminergic neurons is necessary. In my Ph.D. I generated an anatomical map of individual octopaminergic neurons in the *Drosophila* brain. I utilized the Flp-out technique, to label individual octopaminergic neurons. By their projection pattern I categorized 28 different cell types in four octopamine-immunoreactive cell clusters. Their morphology and the distribution of genetic markers indicates that most of the cell types innervate multiple neuropiles and exhibit a clear separation of dendritic and presynaptic regions: The majority of cell types forms spiny ramifications in one particular brain region, the posterior slope. However, each cell type stereotypically innervates a distinct set of target regions throughout the brain. This suggests that octopaminergic neurons are organized in a combinatorial way. Each individual neuron seems to be a component of a specific neuronal circuitry. This way each cell type could represent a module, which selectively modulates neuronal processes in its respective target regions.

The octopaminergic midline cluster of the suboesophageal ganglion shows a special cellular organization. It consists of paired and unpaired neurons, which supply the central brain with extensive ramifications. To understand the rule behind this complex organization, the segmental organization and developmental origin of midline neurons was analyzed at single cell level. The latter was achieved by analyzing the morphology of individual octopaminergic midline clones. OA-VPM and OA-VUM neurons form three subclusters in the suboesophageal ganglion, which most likely represent the three gnathal neuromeres. All OA-VUM neurons derive from the embryonic midline. In the mandibular and maxillary neuromere they form morphologically identical cell types with stereotypic innervation patterns. OA-VPM neurons do not derive from the embryonic midline and are not segmentally duplicated.

This study not only gives an impression of the architecture of individual octopaminergic neurons, but also about the organization of the octopaminergic system at single cell level.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

### 9.1 Nomenklatur der Hirnregionen (Otsuna et al. 2006)

Subösophageales Ganglion (SOG)

Antennalloben (al)

Ösophagus (oes)

antenna-mechano-sensorisches Zentrum (AMMC)

innerer antenno-cerebraler Trakt (iact)

#### Protocerebrum

lh	laterals Horn	a-	anterior
-lpr	laterales Protocerebrum	m-	mittel
-mpr	mediales Protocerebrum	p-	posterior
-psl	posteriore Slope	s-	superior
		i-	inferior
		v-	ventral

#### Optische Loben(OL)

la	Lamina
me	Medulla
lo	Lobula
lop	Lobula Platte

Pilzkörper (MB)

ca	Calyx
p	Pedunkulus
m lo	medialer Lobus
v lo	vertikaler Lobus
γ lo sp	Sporn des γ-Lobus

Zentralkomplex (CC)

fb	Fächerförmiger Körper
eb	Ellipsoidkörper
no	Noduli
pb	Protocerebralbrücke

**9.2 Abkürzungen im Text**

DCMD	Descending Contralateral Movement Detector
DUM	Dorsal Unpaired Median
Flp	Flipase
FRT	Flip Recognition Target
GFP	Green Fluorescent Protein
HA	Hämagglutinin Epitop
hs	Hitzeschock-Promotor
MNB	Medialer Neuroblast
MP	Mediale Vorläuferzellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Rdl	Untereinheit des GABA Rezeptors
sim	single minded

Syt	Synaptotagmin
TDC	Tyrosin-Decarboxylase
T $\beta$ H	Tyramin- $\beta$ -Hydroxylase
tub	Tubulin-Promotor
UAS	Upstream Activating Sequence
VPM	Ventral Paired Median
VUM	Ventral Unpaired Median
w	white
WT	Wildtyp
y	yellow



## **10. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Sebastian Busch

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtstag: 18.02.1981

Geburtsort: Bad Salzungen

### **Schulischer Werdegang:**

1987-1997 Staatl. Regelschule in Dorndorf

1997-2000 J.G. Seume Gymnasium in Vacha

### **Zivildienst:**

2000-2001 Paul-Geheeb Schule in Bad Salzungen

### **Studium:**

2001-2006 Diplom-Studiengang Biologie an der Bayerischen-Julius-Maximilians  
Universität, Würzburg

2005-2006 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie

Titel: "Anatomische Analyse tyraminerger Neurone in *Drosophila melanogaster*"

Abschluß: Dipl.-Biol. Univ. (1,0)

### **Doktorarbeit:**

2006-2008 Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie, Bayerische-Julius-Maximilians Universität,  
Würzburg

2008-2009 Max-Planck-Institut für Neurobiology, Martinsried

### **Laborbesuche:**

2006 Department of Physiology and Biophysics, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia,  
Canada

**Stipendien:**

Doktoranden-Stipendium, Böhringer-Ingelheim-Fonds

Würzburg, den 04.03.2009

Sebastian Busch

## **11. Publikationsliste**

Busch S, Selcho M, Ito K, Tanimoto H. 2009. A Map of Octopaminergic Neurons in the *Drosophila* Brain. *J. Comp. Neurol.* 513: 643-667

Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H. 2008. The Mushroom Body of Adult *Drosophila* Characterized by GAL4 Drivers. *J. Neurogenet.* Jan 12:1-17

## **12. Danksagung**

Für ihre Kommentare zum Manuskript bedanke ich mich bei Ron, Prof. Heisenberg und Karoline.

Außerdem danke ich Ron für die lange und erfolgreiche Zusammenarbeit, die sich in dieser Arbeit widerspiegelt. Ohne seinen Rat und seine Unterstützung wäre Sie in der Form nicht möglich gewesen.

Prof. Heisenberg ermöglichte mir an seinem Lehrstuhl zu arbeiten und unterstützte mein Projekt wo er konnte. Vielen Dank!

Ich danke Prof. Rössler für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Praktische Hilfe, d.h. beim Präparieren und Mikroskopieren, erhielt ich von Conny, Barbara und Florian. Bei kleinen Problemen im Laboralltag konnte ich immer auf Susanne und Barbara zählen.

Der Böhringer Ingelheim Fond unterstützte mich und mein Projekt finanziell. Ich war besonders überrascht über ihre unbürokratische Art und die angenehme Atmosphäre auf den Seminaren und Work Shops.

Der Erfolg meiner Arbeit wird am Ende an der Publikation gemessen. Mareike`s Arbeit und Kommentare hatten einen großen Anteil daran.

Ian danke ich für die herzliche Aufnahme. Ich war beeindruckt von der zielstrebigem, aber angenehmen Atmosphäre in seinem Labor.

Vielen dank an Eric für seine Hilfe und Vertrauen. Und an Michael! Ich hab viel gelacht und viel gelernt.

Bei meinen Eltern fand ich immer etwas Abstand und konnte abschalten, wenn es mal nötig war.

Karoline, zusammen sind wir viel besser als allein! Wir sind halt ein cooles Team! Ich hoffe die Zeit des SMS Schreibens ist erstmal vorbei. ;o)

## 13. Anhang

### 13.1. Kreuzungsschemen

Verschiedene Fliegenstämme, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, mussten erst generiert werden. Im folgenden sind die entsprechenden Kreuzungsschemen aufgeführt. Die dazu verwendete Nomenklatur basiert auf den Flybase Richtlinien, welche unter [http://flybase.org/static\\_pages/docs/nomenclature/nomenclature3.html](http://flybase.org/static_pages/docs/nomenclature/nomenclature3.html) zu finden sind. Alle Kreuzungen wurden auf Standard-Drosophila Medium bei 25°C und unter einem konstanten Tag-Nacht-Zyklus (14/10 Stunden) aufgezogen.

#### 13.1.1 Etablierung stabiler Stämme der *P{3.7sim-flp}* Insertionen

*w<sup>\*</sup>; Sp/CyO ; P{sim-flp}1/TM2*

1.

♀ *w<sup>\*</sup>; Sp/CyO ; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup>* X ♂ *w<sup>1118</sup>; P{sim-flp}1*

↓

F1 ♂ *w<sup>\*</sup>; Sp/+ ; P{sim-flp}1/TM2*

2.

♀ *w<sup>\*</sup>; Sp/CyO ; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup>* X ♂ *w<sup>\*</sup>; Sp/+ ; P{sim-flp}1/TM2*

↓

F2 *w<sup>\*</sup>; Sp/CyO ; P{sim-flp}1/TM2*

$w^*$ ; Sp/CyO ; P{sim-flp}2/TM2

1.

♀  $w^*$ ; Sp/CyO ; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup> **X** ♂  $w^{1118}$ ; P{sim-flp}2

↓

F1 ♂  $w^*$ ; Sp/+ ; P{sim-flp}2/TM2

2.

♀  $w^*$ ; Sp/CyO ; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup> **X** ♂  $w^*$ ; Sp/+ ; P{sim-flp}2/TM2

↓

F2  $w^*$ ; Sp/CyO ; P{sim-flp}2/TM2 $w^*$ ; P{sim-flp}3/CyO

1.

♀  $w^*$ ; Sp/CyO ; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup> **X** ♂  $w^{1118}$ ; P{sim-flp}3

↓

F1 ♂  $w^*$ ; P{sim-flp}3/Sp ; TM2/+

2.

♀  $w^*$ ; Sp/CyO ; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup> **X** ♂  $w^*$ ; P{sim-flp}3/Sp ; TM2/+

↓

F2  $w^*$ ; P{sim-flp}3/CyO; TM2/+

$w^*$ ;  $P\{sim-flp\}4/CyO$ 

1.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  **X** ♂  $w^{1118}$ ;  $P\{sim-flp\}4$ 

↓

F1 ♂  $w^*$ ;  $P\{sim-flp\}4/Sp$ ;  $TM2/+$ 

2.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  **X** ♂  $w^*$ ;  $P\{sim-flp\}4/Sp$ ;  $TM2/+$ 

↓

F2  $w^*$ ;  $P\{sim-flp\}4/CyO$ ;  $TM2/+$  $w^*$ ;  $P\{sim-flp\}5/CyO$ 

1.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  **X** ♂  $w^{1118}$ ;  $P\{sim-flp\}5$ 

↓

F1 ♂  $w^*$ ;  $P\{sim-flp\}5/Sp$ ;  $TM2/+$ 

2.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  **X** ♂  $w^*$ ;  $P\{sim-flp\}5/Sp$ ;  $TM2/+$ 

↓

F2  $w^*$ ;  $P\{sim-flp\}5/CyO$ ;  $TM2/+$  †



$w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $P\{sim-flp\}6/TM2$

1.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  X ♂  $w^{1118}$ ;  $P\{sim-flp\}6$

↓

F1 ♂  $w^*$ ;  $Sp/+$ ;  $P\{sim-flp\}6/TM2$

2.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  X ♂  $w^*$ ;  $Sp/+$ ;  $P\{sim-flp\}6/TM2$

↓

F2  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $P\{sim-flp\}6/TM2$

### 13.1.2 Etablierte Fliegenstämme

13.1.2.1  $w^*$ ;  $P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/cyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

1.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  X ♂  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1$ ;  $P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/cyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

↓

♂  $w^*/Y$ ;  $P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

2.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  X ♂  $w^*$ ;  $P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/cyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

↓

$w^*$ ;  $P\{tub-FRT-GAL80-FRT\}/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

**13.1.2.2**  $w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$

**1.**

$\text{♀ } y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; P\{Tdc2-GAL4.C\}2/CyO$  **X**  $\text{♂ } w^*; Sp/CyO ; TM2/TM6b, Tb^1$

↓

$\text{♀ } y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4/w^*; Sp/CyO; TM2/+$

**2.**

$y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4/w^*; Sp/CyO; TM2/+$  **X**  $\text{♂ } y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; Sp/CyO; TM6b, Tb^1 /+$

↓

$\text{♀ } y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4/ w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; Sp/CyO; TM6b, Tb^1 /+$

and

$\text{♂ } w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$

**3.**

$\text{♀ } y^* w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4/ w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; Sp/CyO; TM6b, Tb^1 /+$

**X**

$\text{♂ } w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$

↓

**$w^* P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$**

**13.1.2.3** w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4; P{Tdc2-GAL4.C}2, P{tub-FRT-GAL80-FRT}/CyO;  
TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup>

**1.**

♀ w\*; P{Tdc2-GAL4.C}2/CyO X ♂ w\*; P{tub-FRT-GAL80-FRT}/CyO; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup>

↓

♀ w\*; P{Tdc2-GAL4.C}2/P{tub-FRT-GAL80-FRT}; TM2/+

**2.**

♀ w\*; P{Tdc2-GAL4.C}2/P{tub-FRT-GAL80-FRT}; TM2/+ X ♂ w\*; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup>

↓

♂ w\*; P{Tdc2-GAL4.C}2, P{tub-FRT-GAL80-FRT}; TM2/+

**3.**

♀ w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup> X ♂ w\*; P{Tdc2-GAL4.C}2, P{tub-FRT-GAL80-FRT}/  
CyO; TM2/+

↓

♂ w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4; P{Tdc2-GAL4.C}2, P{tub-FRT-GAL80-FRT}/ CyO; TM2/+

**4.**

♀ w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup>

X

♂ w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4; P{Tdc2-GAL4.C}2, P{tub-FRT-GAL80-FRT}/ CyO; TM2/+

↓

w\* P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4; P{Tdc2-GAL4.C}2, P{tub-FRT-GAL80-FRT}/CyO; TM2/TM6b, Tb<sup>1</sup>

13.1.2.4  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$

1.

♀  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1; P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$  **X** ♂  $w^*; Sp/CyO; TM2/TM6b,$   
 $Tb^1$

↓

♂  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$

2.

♀  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1; P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$  **X** ♂  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1; Sp/CyO;$   
 $TM2/TM6b, Tb^1$

↓

**$y^* w^* P\{hsp70-flp\}1; Sp/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$**

13.1.2.5  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1$

1.

♀  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1; P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$  **X** ♂ WT CantonS

↓

♀  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1/+; CyO/+; TM2/+$  and ♂  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1/+; CyO/+; TM2/+$

2.

♀  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1/+; CyO/+; TM2/+$  **X** ♂  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1/+; CyO/+; TM2/+$

↓

**$y^* w^* P\{hsp70-flp\}1$**

13.1.2.6  $w^*$ ;  $P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

1.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  **X** ♂  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1$ ;  $P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

↓

♂  $w^*$ ; ;  $P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

2.

♀  $w^*$ ;  $Sp/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$  **X** ♂  $w^*$ ; ;  $P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

↓

**$w^*$ ;  $P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$**

13.1.2.7  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1$ ;  $P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$ ;  $P\{UAS-EGFP\}34/TM6b$ ,  $Tb^1$

1.

♀  $y^* w^* P\{hsp70-flp\}1$ ;  $P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8-GFP\}/CyO$ ;  $TM2/TM6b$ ,  $Tb^1$

**X**

♂  $w^{1118}$ ;  $P\{UAS-EGFP\}34/TM3$ ,  $Sb^1$

↓

♂  **$y^* w^* P\{hsp70-flp\}1$ ;  $CyO/+$ ;  $P\{UAS-EGFP\}34/TM6b$ ,  $Tb^1$**

2.

 $\text{♀ } y^* w^* P\{hsp70\text{-flp}\}1; P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8\text{-GFP}\}/CyO; TM2/TM6b, Tb^1$ **X** $\text{♂ } y^* w^* P\{hsp70\text{-flp}\}1; CyO/+; P\{UAS\text{-EGFP}\}34/TM6b, Tb^1$ 

↓

 $y^* w^* P\{hsp70\text{-flp}\}1; P\{UAS(FRT.CD2.y+)CD8\text{-GFP}\}/CyO; P\{UAS\text{-EGFP}\}34/TM6b, Tb^1$