

Untersuchung zur Regulation der Expression des
zuckerconditionierten Verhaltens bei *Drosophila melanogaster*

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

vorgelegt von
Franz Andreas Gruber
aus Berchtesgaden

Würzburg 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter : Prof. Dr. Martin Heisenberg

Gutachter: Dr. Nico Blüthgen

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1.	Auswirkung des Futterentzugs auf Genexpression, Physiologie und Verhalten bei <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.2.	Physiologische Korrelate zum Futterentzug	9
1.2.1.	Das Blut als physiologisches Korrelat zum Futterentzug	9
1.2.1.1.	Blutnährstoffkonzentrationen	9
1.2.1.2.	Blutosmolarität	11
1.2.2.	Der Verdauungstrakt als physiologisches Korrelat zum Futterentzug	12
1.2.3.	Ein hypothetisches Modell für die Regulation von Metabolismus und Fressverhalten bei Fliegen	13
1.3.	Das zuckerconditionierte Verhalten	14
1.3.1.	Begriffsbestimmungen zum Lernen und Gedächtnis	14
1.3.2.	Olfaktorische Konditionierung bei <i>Drosophila</i>	14
1.3.3.	Der Einfluss des Futterentzugs auf die Expression des zuckerconditionierten Verhaltens	17
1.4.	Zielsetzung für die Doktorarbeit	19
2.	Material und Methoden	20
2.1.	Genotypen der verwendeten Fliegen	20
2.2.	Fliegenaufzucht	21

2.3.	Futterentzug	21
2.4.	Konditionierter Stimulus (CS)	21
2.5.	Unkonditionierter Stimulus (US)	21
2.6.	Duftkonditionierung	22
2.7.	Manipulation des Fütterungszustands im Lernexperiment	22
2.8.	Thermostimulierung AKH-produzierender Zellen	24
2.9.	Überlebensexperimente	25
2.10.	Test auf Zuckerpräferenz	26
2.11.	Quantifizierung der aufgenommenen Futtermengen	26
2.12.	Elektrophysiologie	27
2.13.	Statistik	27
3.	Ergebnisse	28
3.1.	Bedeutung des Fütterungszustands für Aufbau und Expression des zuckerkonditionierten Gedächtnisses	28
3.1.1.	Wie selektiv ist der Einfluss des Futterentzugs für das zuckerkonditionierte Verhalten ?	28
3.1.2.	Ist der Futterentzug notwendig für den Aufbau des zuckerkonditionierten Gedächtnisses im Training und/oder für dessen Expression im Test ?	29
3.1.3.	Abhängigkeit der Zuckerpräferenz vom Futterentzug	32
3.1.4.	Einfluss kurzer Fütterungen auf die Gedächtnisexpression und das Überleben	32
3.1.5.	Verwendung reiner Zucker zur Manipulation des Fütterungszustands	34
3.2.	Suche nach fütterungsassoziierten Faktoren, die das	

zuckerconditionierte Verhalten unterdrücken	36
3.2.1. Inhibieren die „ernährende“ Eigenschaft des Futters und der Anstieg der Glukosekonzentration im Körper die Expression des zuckerconditionierten Gedächtnisses ?	36
3.2.1.1. Fütterung von Trehalose und Validoxylamin A	37
3.2.1.2. Fütterung von D-Arabinose	39
3.2.2. D-Arabinose und andere Zucker als unconditionierte Stimuli	41
3.2.3. Die aufgenommene Futtermenge als mögliches verhaltensinhibitorisches Signal	42
3.2.4. Wird das zuckerconditionierte Verhalten durch den süßen Geschmack und/oder die Osmolarität des Futters unterdrückt ?	43
3.2.4.1. Ein Versuch die Wirkung des süßen Geschmacks ohne eine Futteraufnahme zu überprüfen	43
3.2.4.2. Unterdrückung der zuckerconditionierten Gedächtnisexpression durch die Osmolarität des aufgenommenen Futters	44
3.3. Thermostimulation AKHerger Zellen	47
4. Diskussion	50
4.1. Einfluss des Futterentzugs auf das zuckerconditionierte Lernen und Gedächtnis	50
4.2. Wie wurde die Expression des zuckerconditionierten Gedächtnisses unterdrückt ?	51
4.2.1. Osmolarität des aufgenommenen Futters	51
4.2.2. Thermostimulation AKH-produzierender Zellen	51
4.2.2.1. Regulation AKH-produzierender Neurone	51
4.2.2.2. Wie unterdrückt die Thermostimulation AKH-produzierender Neurone die Expression des zuckerconditionierten Verhaltens ?	52

4.3.	Lokalisierung der gedächtnisunterdrückenden Signale	53
4.3.1.	AKH-Versuch	53
4.3.2.	Fütterungsversuche	54
4.3.3.	Eine mögliche Osmolaritätsdetektion im Verdauungskanal und/oder im Blut	54
4.4.	Sättigungssignale im Tierreich	56
4.4.1.	Hämolyphosmolarität als inhibitorisches Signal	56
4.4.2.	Verhaltenssuppression durch mutmaßliche Dehnungsrezeptorneurone	57
4.4.3.	Signale der internen Glukose-/Trehalosekonzentrationen und des Ernährungszustands	59
4.4.4.	Die Rolle des Geschmacks	60
4.5.	Uneinheitliche Regulation futterbezogener Verhaltensweisen	60
4.5.1.	Wirkung der Thermostimulierung AKHerger Zellen auf das Verhalten	60
4.5.2.	Wirkung der Fütterung und der Hitzestimulation AKHerger Zellen auf das zuckerconditionierte Verhalten	62
4.6.	Motivationsmodell zum zuckerconditionierten Verhalten	63
5.	Zusammenfassung	66
6.	Summary	68
7.	Literaturverzeichnis	70
8.	Anhang	79
8.1.	Erklärung	79
8.2.	Curriculum vitae	81
8.3.	Publikation	82
8.4.	Danksagung	83

1. Einleitung

1.1. Auswirkung des Futterentzugs auf Genexpression, Physiologie und Verhalten bei *Drosophila melanogaster*

Nahrung hat für das Überleben und damit auch für den Fortpflanzungserfolg eines Tieres eine entscheidende Bedeutung. Daher sind zahlreiche Mechanismen auf der Ebene der Genexpression, der Physiologie und des Verhaltens in hohem Maße durch die natürliche Selektion geformte Anpassungen zur Sicherung der Nahrungsversorgung in einer veränderlichen und oft durch Ressourcenknappheit gekennzeichneten Umwelt. Bei *Drosophila melanogaster* wurde eine Reihe von Reaktionen nachgewiesen, die durch Futterentzug ausgelöst werden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass das Expressionsmuster zahlreicher Gene von der Art und Verfügbarkeit des Futters abhängt (Zinke et al. 2002; Ryuda et al. 2008; Fujikawa et al. 2009). Auf der Ebene der Physiologie wurde nachgewiesen, dass beispielsweise die Lipid- und Zuckerkonzentrationen der Hämolymphe, dem Blut bei *Drosophila* (Leopold and Perrimon 2007), bei Futterentzug sinken (Meunier et al. 2007). Mit sinkendem Zuckerspiegel wird u.a. auch das adipokinetische Hormon (AKH) ausgeschüttet, welches bei Insekten eine vergleichbare Funktion wie das Glukagon bei Säugern hat (Kim and Rulifson 2004; O'Shea and Rayne 1992; Lorenz and Gäde 2009; Jiang and Zhang 2003). Auf einen Zuckerreiz steigt mit dem Futterentzug die Aktivität der Süß-Geschmacksneurone und die Wahrscheinlichkeit mit dem Ausstrecken des Saugrüssels („proboscis extension reflex“: PER) zu reagieren (Abb. 1A, Edgecomb et al. 1994; Meunier et al. 2007). Ebenso nimmt die motorische Aktivität und die Bereitschaft zur Futteraufnahme zu (Lee and Park 2004; Meunier et al. 2007). Von entscheidender Relevanz für diese Doktorarbeit ist, dass auch das zuckerconditionierte Verhalten vom Futterentzug abhängig ist (Abb. 1B, Gruber 2006).

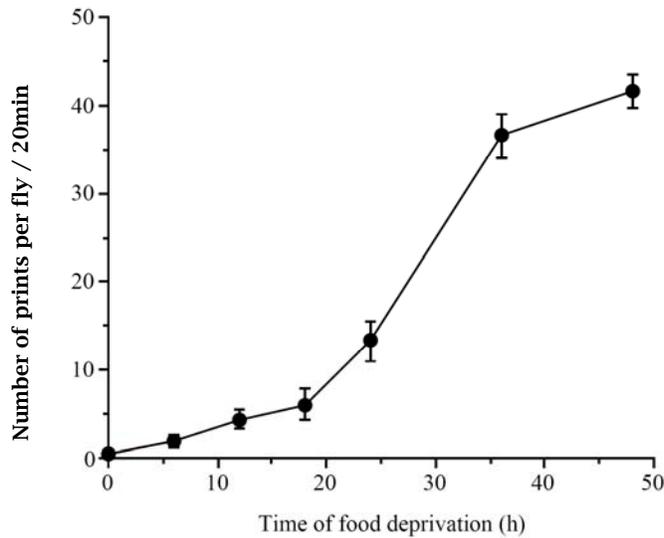
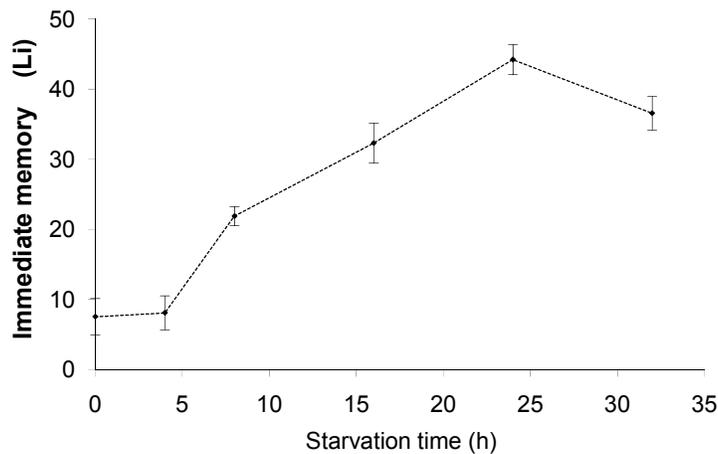
A**B**

Abb. 1: Abhängigkeit futterbezogener Verhaltensweisen vom Futterentzug. A: Proboscis-Abdrücke: Die Anzahl der Saugrüsselabdrücke auf einem Saccharose(0.5M)-Gelatin-Untergrund innerhalb von 20min hing von der Dauer des vorhergehenden Futterentzugs ab (Edgecomb et al. 1994). **B:** Zuckerkonditioniertes olfaktorisches Kurzzeitgedächtnis. Zunehmende Zeitspannen ohne Futter (0h, 4h, 8h, 16h, 24h und 32h) bis zur Konditionierung bewirkten einen Anstieg des konditionierten Verhaltens im Zeitintervall von 4h-24h. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte der Lernindizes (Li) von 21-37 Experimenten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM: „standard error of the mean“) an (Gruber 2006).

1.2. Physiologische Korrelate zum Futterentzug

Wichtige physiologische Korrelate zum Futterentzug sind die Zusammensetzung des Bluts und die Füllung des Verdauungstrakts. Beide spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Verhaltensweisen, die der Futtersuche und -aufnahme dienen, welche in dieser Doktorarbeit auch als futterbezogenes Verhalten bezeichnet werden. Die Frage ob Signale vom Blut bzw. vom Verdauungstrakt auch an der Regulation des zuckerconditionierten Verhaltens bei *Drosophila* beteiligt sind (siehe 1.4.), spielt für diese Doktorarbeit eine zentrale Rolle.

1.2.1. Das Blut als physiologisches Korrelat zum Futterentzug

1.2.1.1. Blutnährstoffkonzentrationen

Die Nährstoffkonzentrationen des Bluts korrelieren mit dem Fütterungszustand und können regulierende Funktionen für Stoffwechsel und Verhalten haben. Beispielsweise sind Zucker, wie Glukose oder Trehalose, einige Aminosäuren, Lipide und Sterole nicht nur wichtige Nährstoffe, sondern auch Signalmoleküle, die den Metabolismus und zum Teil auch das Fressverhalten bei Säugern oder Insekten regulieren (Marty et al. 2007; Havel 2001; Amakawa 2001; Behmer et al. 1999; Abisgold and Simpson 1988; Simpson and Raubenheimer 1993). Ein bekanntes Beispiel, wie Fressverhalten und Stoffwechsel von der Konzentration eines Nährstoffs reguliert werden, ist die Wirkung des Blutglukosespiegels bei Säugern (Abb. 2). Konzentrationsschwankungen zirkulierender Glukose beeinflussen vor allem die Aktivität insulin- und glukagonproduzierender Zellen des Pankreas und der Neurone des Hypothalamus, welche eine zentrale Rolle bei der Regulation von Metabolismus und Fressverhalten einnehmen (Marty et al. 2007; Havel 2001). Diese Zellen nehmen die Glukose abhängig von der extrazellulären Konzentration des Moleküls über Glukosetransporter auf, was, nach der Metabolisierung des Zuckers, zu einer Änderung des ATP-ADP-Verhältnisses führt. Der intrazelluläre Energiezustand ist über ATP-sensitive Kanäle mit der Spannung der Plasmamembran und damit mit der Aktivität der Zelle verknüpft (Marty et al. 2007). So bewirkt die Futteraufnahme, dass im Blut die Glukosekonzentration ansteigt, welche als Signal zur Hemmung der Fressbereitschaft und zur Absenkung des Glukosespiegels im Blut fungiert.

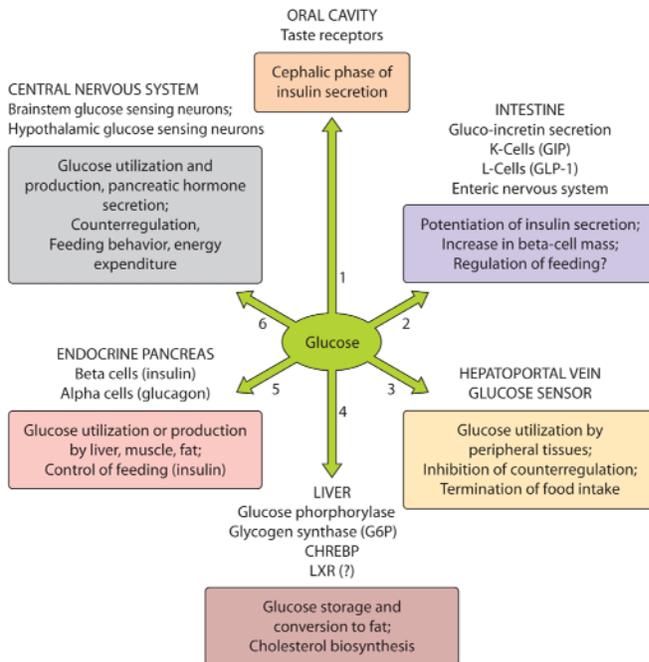


Abb. 2: Komplexe Signalfunktionen der Glukose für die Regulation des Kohlenhydrat- und Fettmetabolismus‘ und des Fressverhaltens bei Säugetieren (Marty et al. 2007).

Glukosedektoren wurden auch bei Insekten nachgewiesen, wie z.B. endokrine Zellen bei *Drosophila*, die einen ATP-sensitiven Kalium-Kanal exprimieren. Diese Neurone, die einen Teil der paarigen Corpora cardiaca bilden, schütten in Abhängigkeit von der extrazellulären Trehalose-/Glukosekonzentration das AKH aus (Kim and Rulifson 2004; Lee and Park 2004). AKH, der Gegenspieler zu den „*Drosophila* insulin like peptides“ (dilp’s), bewirkt die Mobilisierung von im Fettkörper gespeicherten Zuckern und Lipiden und deren Konzentrationsanstieg in der Hämolymphe (Ikeya et al. 2002; Rulifson et al. 2002; Broughton et al. 2005; Lee and Park 2004). Das AKH-Signal scheint auch auf Verhaltensebene Hyperaktivität zu induzieren, welche bei Fliegen, die länger nichts gefressen haben, auftritt und offenbar die Chance, auf Futter zu treffen, erhöht (Lee and Park 2004; Isabel et al. 2005; Lorenz and Gäde 2009). Auch der u.a. im Fettkörper exprimierte Rezeptor „Bride of sevenless“ (BOSS) wurde als Glukosesensor identifiziert. BOSS ist an der Regulation des Zucker- und Lipidstoffwechsels beteiligt und scheint mit dem Insulinsignalweg verknüpft zu sein (Kohyama-Koganeya et al. 2008). Bei *Bombyx mori* wurde postuliert, dass die Ausschüttung des insulinähnlichen Bombyxins vom Glukosespiegel der Hämolymphe abhängt (Masumura et al. 2000). Aufgrund der bei Säugern und Insekten ähnlichen Funktion der Glukose als Signalmolekül zur Regulation der Aktivität endokriner Zellen und des Stoffwechsels, könnte vermutet werden, dass der Zucker, ähnlich wie bei Säugetieren, auch bei Insekten eine Rolle bei der Regulierung futterbezogener Verhaltensweisen spielt.

1.2.1.2. Blutosmolarität

Injektionen von Trehalose, NaCl, Glycin und anderen Substanzen[#] (#siehe Abb. 3) ins Blut vor einer Fütterung führten zur Reduktion der Futtermenge bei Nymphen der Art *Locusta migratoria* (Bernays and Chapman 1974). Die verwendeten Substanzen sind chemisch unterschiedlich und ihr inhibitorischer Effekt war konzentrationsabhängig. Deshalb wurde geschlossen, dass die unterdrückende Eigenschaft aller Substanzen darin besteht, dass sie einen Anstieg der Blutosmolarität bewirken. Neben der regulierenden Funktion einzelner Nährstoffe, kann offenbar auch die Osmolarität der Hämolymphe, die aus der Kombination aller gelösten Moleküle resultiert, als verhaltensmodulierendes Signal zu fungieren (Bernays and Chapman 1974; Abisgold and Simpson 1987; Simpson and Bernays 1983; Simpson and Raubenheimer 1993).

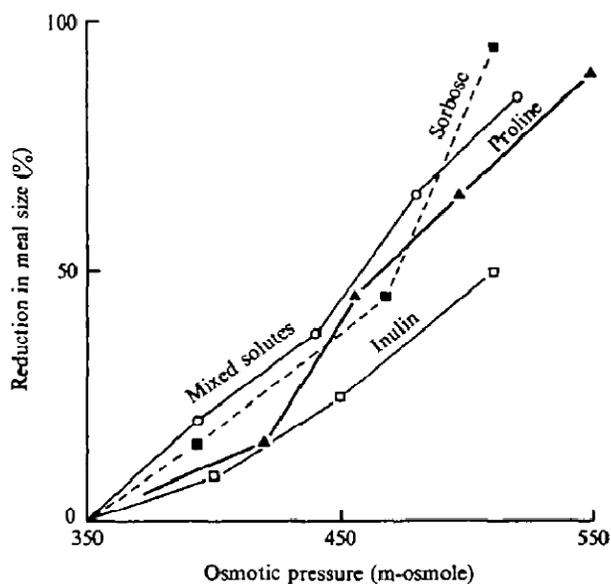


Abb. 3: Beziehung zwischen der Hämolympheosmolarität und der aufgenommenen Futtermenge. Die Reduktion der aufgenommenen Futtermenge korreliert mit dem osmotischen Druck der Hämolymphe, der durch Injektionen chemisch unterschiedlicher Substanzen 20min vor der Testfütterung verursacht wurde (Bernays and Chapman 1974).

1.2.2. Der Verdauungstrakt als physiologisches Korrelat zum Futterentzug

Ein anderes physiologisches Korrelat zum Futterentzug ist die Füllung des Verdauungstrakts. Bei Säugetieren führt die Füllung des Magens oberhalb des Pylorus unabhängig vom Nährwert des Futters zum Absinken der Fressbereitschaft. Informationen über die Magendehnung werden von Mechanorezeptoren über den Vagalnerv ans Gehirn geleitet (Powley and Phillips 2004; Cummings and Overduin 2007). Auch bei Insekten spielen Dehnungsrezeptoren, deren Aktivität von Zustandsänderungen des Verdauungskanal abhängt, eine wichtige Rolle für die Kurzzeitregulation des Fressverhaltens (Bernays 1985). Beispielsweise wurde eine inverse Korrelation zwischen dem Kropfgewicht, welches den Füllungsgrad mit Futter widerspiegelt, und der Fressbereitschaft bei *Schistocerca gregaria*, *Locusta migratoria* und *Phormia regina* gefunden (Roessingh and Simpson 1984; Bernays 1985; Edegecomb et al. 1987; Sudlow et al. 1987). Eine künstliche Füllung des Hinter- und Mitteldarms mit Agar oder Paraffin bei *Schistocerca gregaria* und *Locusta migratoria* führte zur Reduktion einer anschließenden Futteraufnahme. Dieser Effekt wurde durch Kappen des ventralen Nervenstrangs („ventral nerve cord“: VNC) aufgehoben (Roessingh and Simpson 1984; Simpson 1983). Die Durchtrennung bestimmter mit dem Verdauungssystem assoziierter Nerven kann eine drastisch erhöhte Futteraufnahme (Hyperphagie) auslösen. So führten bei *Locusta migratoria* Durchtrennungen der Pharynxnerven im Bereich des Kropfs und des Vorderdarms zu gesteigertem Fressverhalten (Bernays and Chapman 1973). Bei *Phormia regina* verursachte das Kappen des VNC, des medianen Abdominalnervs („median abdominal nerv“: MAN) und des rekurrenten Nervs („recurrent nerv“: RN) Hyperphagie (Dethier and Gelperin 1967; Gelperin 1971b; Bernays 1985). Als mutmaßliche Dehnungsrezeptoren bei *Phormia* wurden Neurone identifiziert, die vom RN abzweigen und mit der anterioren Region des Vorderdarms verknüpft sind. Die Spikeaktivität dieser Zellen korrelierte mit der experimentell kontrollierten Peristaltik oder Ausdehnung des Vorderdarms (Gelperin 1967). Auch im Bereich des bei Fliegen im Abdomen gelegenen Kropfs wurden Zellen als mutmaßliche Dehnungsrezeptorneurone identifiziert. Diese liegen an Verzweigungen des MAN, welcher ein Netzwerk über dem Kropf bildet. Kontraktion und Ausdehnung des Kropfs veränderten die Spikefrequenz der Zellen und die Spikeaktivität hing vom Kropfvolumen ab (Gelperin 1971b).

1.2.3. Ein hypothetisches Modell für die Regulation von Metabolismus und Fressverhalten bei Fliegen

Blut und Verdauungstrakt haben bei daraufhin untersuchten Insekten- und Säugetierarten wichtige Funktionen für die Regulation der Fressbereitschaft und des Stoffwechsels. Aufgrund zahlreicher Daten von verschiedenen Insektenarten, insbesondere von *Phormia regina*, wurde ein Modell vorgeschlagen, welches die Regulation des Metabolismus' und der Futteraufnahme bei Schmeißfliegen beschreiben soll (Gelperin 1971a). Dabei wird postuliert, dass die Fressbereitschaft aus stimulierenden gustatorischen Reizen und inhibierenden Signalen der Dehnungsrezeptoren des Verdauungstrakts resultiere. Nach dem Modell hat außerdem der Nährstoffgehalt des Bluts, wahrscheinlich signalisiert durch die Osmolarität, eine modulierende Wirkung auf die Fressbereitschaft. Mit geringen Modifikationen wurde dieses Modell später auf *Drosophila* übertragen (Gelperin 1971a; Buch and Pankratz 2009; Abb. 4; 27).

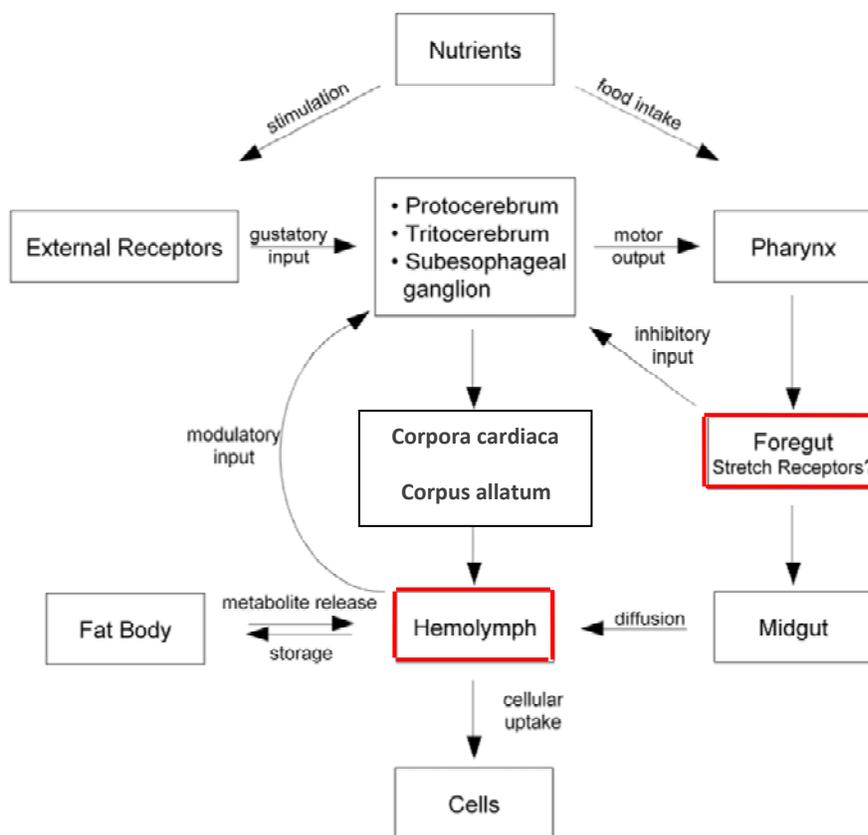


Abb. 4: Hypothetisches Schema für die Regulation des Stoffwechsels und des Fressverhaltens bei *Drosophila*. Ursprünglich von Gelperin (1971a) für *Phormia regina* entwickeltes Diagramm und für *Drosophila* von Buch und Pankratz (2009) leicht abgewandelt.

1.3. Das zuckerconditionierte Verhalten

Der Futterentzug beeinflusst Verhaltensweisen wie motorische Aktivität, Futterpräferenzen, PER-Frequenz, Futteraufnahme und zuckerconditioniertes Verhalten. In dieser Arbeit konzentrierte ich mich auf die Untersuchung des zuckerconditionierten Verhaltens, welches den Vorteil bietet, dass im Test keine verhaltensmodulierenden unconditionierten Futterreize auftreten. Die Gedächtnisexpression könnte deshalb unmittelbarer die „innere“ futterbezogene Verhaltensbereitschaft der Fliegen widerspiegeln.

1.3.1. Begriffsbestimmungen zum Lernen und Gedächtnis

Lernen kann als Verhaltensänderung eines Tieres aufgrund von neu gemachten Erfahrungen definiert werden. Das zeitliche Fortbestehen der Verhaltensänderung wird als Gedächtnis bezeichnet (Davis 2005). Die Fähigkeit, Verknüpfungen zwischen Ereignissen herzustellen, wird assoziatives Lernen genannt, wobei man zwischen operanter und klassischer Konditionierung unterscheiden kann. Bei der operanten Konditionierung wird eine Verknüpfung einer Handlung mit den daraus resultierenden Konsequenzen gebildet. Bei der klassischen Konditionierung wird die Beziehung zwischen zwei externen Reizen gelernt (Dudai 2002). Dabei gilt, dass ein zunächst oft bedeutungsarmer Reiz (CS = konditionierter Stimulus) mit einem verhaltensbedeutsamen, unconditionierten Reiz (US), der einen unconditionierten Reflex (UR) auslöst, zeitlich gepaart wird, so dass schließlich der CS alleine ohne den US eine Verhaltensantwort, nämlich den konditionierten Reflex (CR), auslöst (Heldmaier und Neuweiler 2003). Als CS kann dabei jeder Reiz dienen, der nach der Konditionierung eine den US vorhersagende Bedeutung gewinnt (Davis 2005). Abhängig davon ob der US als Belohnung (z.B. Zucker) oder als Bestrafung (z.B. Elektroschock) wirkt, spricht man von appetitiver oder aversiver Konditionierung.

1.3.2. Olfaktorische Konditionierung bei *Drosophila*

Um die Grundlagen des Lernens und des Gedächtnisses zu erforschen, wird seit etwa 35 Jahren *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus verwendet. Die einfache Haltung, die kurze Generationszeit (ca. 10 Tage bei 25°C), die Verfügbarkeit genetischer Methoden und die Fülle an Informationen über das Fruchtfliegen Genom machen das Insekt zu einem beliebten

Versuchsobjekt. Außerdem ist die Fliege mit der vergleichsweise geringen Anzahl von 200.000 Neuronen besser dazu geeignet die Funktionsweise eines Nervensystems zu verstehen, als es der Mensch mit ca. 10^{10} bis 10^{12} Neuronen sein könnte (Davis 2005; Venken and Bellen 2005; Ashburner 1989; Armstrong et al. 1995; Kandel 2000).

Zur Erforschung von Lernen und Gedächtnis wird bei der Fliege vor allem die olfaktorische Konditionierung durchgeführt. Dabei wird während des Trainings ein CS^+ -Duft entweder mit einem Zucker-US belohnt (appetitive Konditionierung) oder mit einem Elektroschock-US bestraft (aversive Konditionierung) und jeweils ein nicht belohnter bzw. bestrafter CS^- -Duft präsentiert. Abhängig davon wie viele Fliegen sich im anschließenden Test für den CS^+ - bzw. CS^- -Duft entschieden haben, kann dann ein erster Präferenzindex berechnet werden: $P1 = [N_{(CS^+)} - N_{(CS^-)}] / [N_{(CS^+)} + N_{(CS^-)}]$; CS^+ = Duft A; CS^- = Duft B. Unter reziproker Verwendung der gleichen Düfte werden in einem zweiten Experiment naive Fliegen trainiert, getestet und ein zweiter Präferenzindex berechnet: $P2 = [N_{(CS^+)} - N_{(CS^-)}] / [N_{(CS^+)} + N_{(CS^-)}]$; CS^+ = Duft B; CS^- = Duft A. Aus den Mittelwerten beider Präferenzindizes wird schließlich der Lernindex ermittelt: $Li = (P1 + P2) / 2$. Negative Li-Werte, die bis -1 reichen können, geben ein aversives Gedächtnis wider. Positive Li-Werte bis +1 werden beim Zeigen eines appetitive Gedächtnisses berechnet. Die reziproke Verwendung von zwei Düften wird als differenzielle Konditionierung bezeichnet und hat den Vorteil, dass nicht assoziative Lerneffekte wie Habituation und Sensitivierung heraus gerechnet werden (Davis 2005, Kim et al. 2006).

Beim Vergleich zwischen der Konditionierung mit Zucker und Elektroschock zeigt sich, dass das aversive Gedächtnis deutlich schneller degradiert. Für ein aversives Langzeitgedächtnis (LTM) sind viele Konditionierungsdurchgänge nötig. Demgegenüber reicht ein 2min-Training mit Zucker aus, um ein appetitives LTM für Tage zu bilden (Tempel et al. 1983; Krashes et al. 2008). Für den Aufbau und den Abruf des olfaktorischen Gedächtnisses nimmt der Pilzkörper eine zentrale Rolle ein. In dieser bilateralen Gehirnstruktur konvergieren während der olfaktorischen Konditionierung die neuronalen Informationswege des Duft-CS und des US. Es wird postuliert, dass bei einer zeitlichen Paarung des CS und US eine präsynaptische Bahnung in den Neuronen des Pilzkörpers, den Kenyonzellen, stattfindet. Dabei gilt die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase (Rutabaga) als molekularer Koinzidenzdetektor, der über die Aktivierung des cAMP-Signalwegs die präsynaptische Bahnung initiiert. Für den Gedächtnisabruf wird angenommen, dass der Duft-CS ausreicht, um, aufgrund der Verstärkung der Präsynapsen, nachgeschaltete Neurone zur Ausführung einer konditionierten Reaktion (CR) zu aktivieren (Abb. 5, 6, 7; Heisenberg 2003, Davis 2005).

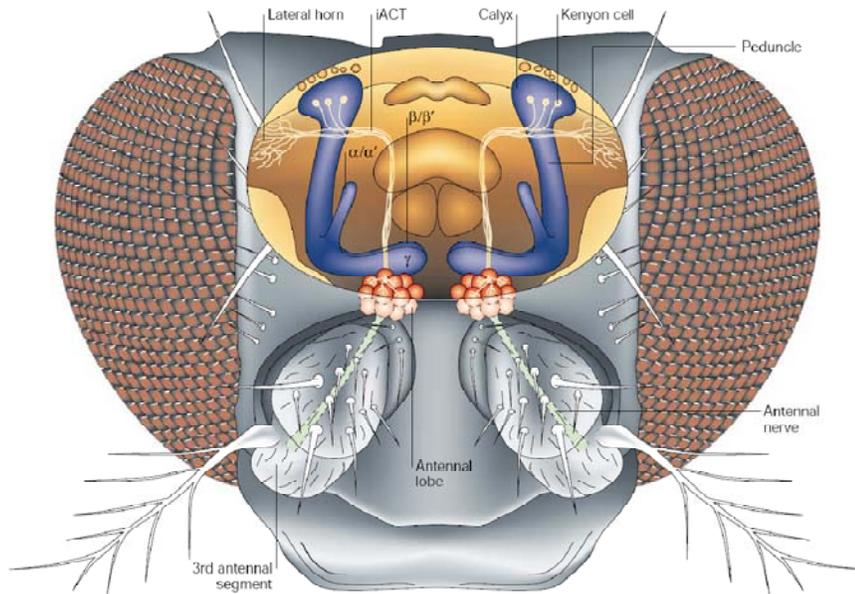


Abb. 5: Olfaktorischer Signalweg. Duftinformationen werden von den Antennen und Maxillarpalpen (nicht gezeigt) an die ca. 40 Glomeruli der Antennalloben weitergeleitet. Diese sind über Projektionsneurone (iACT: „inner antennocerebral tract“) mit den Gehirnstrukturen des lateralen Horns und dem Kalyx, dem Eingang des Pilzkörpers (blau), verbunden. Mit α/α' , β/β' and γ sind die 3 Untersysteme des Pilzkörpers angegeben. Vereinfacht nach Heisenberg (2003).

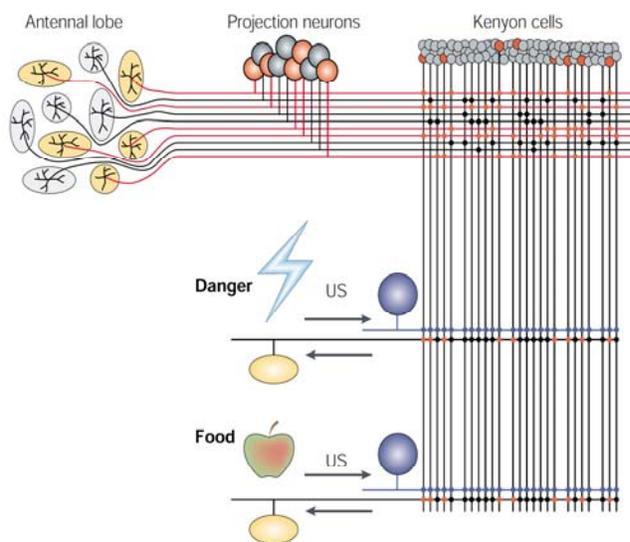


Abb. 6: Modell zum olfaktorischen Gedächtnis. Aufgrund des spezifischen Erregungsmusters der olfaktorischen Afferenzen, Glomeruli und Projektionsneurone wird eine für einen bestimmten Duft spezifische Gruppe von Kenyonzellen aktiviert. Die Zellen des Pilzkörpers bilden Synapsen mit modulatorischen Eingangsneuronen, die den US (Elektroschock bzw. Futter) signalisieren. Die Kenyonzellen sind über Synapsen mit extrinsischen

Ausgangsneuronen verbunden. Diese Synapsen werden verstärkt, wenn der CS und US gleichzeitig auftreten. Nach Heisenberg (2003).

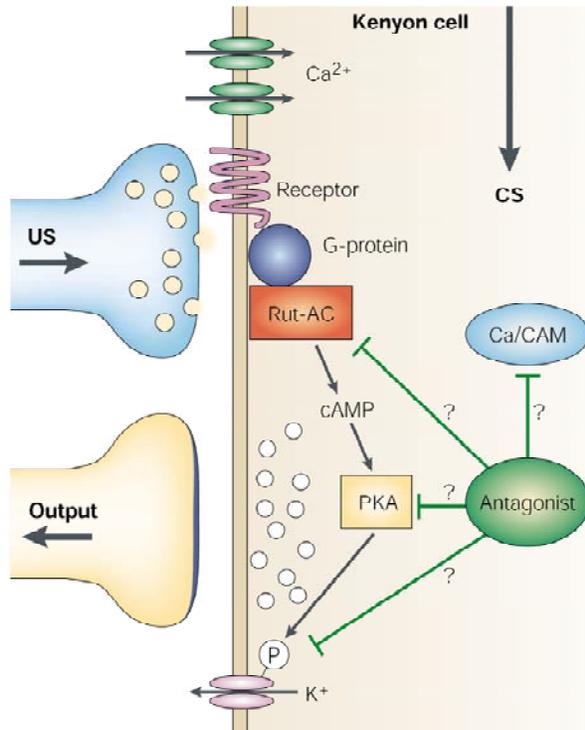


Abb. 7: Präsynaptische Modulation der Transmission an der Synapse von der Kenyonzelle zum Ausgangsneuron. Das gleichzeitige Auftreten des CS und des US führt zum Anstieg von cAMP in der Kenyonzelle, was zu einer erhöhten Aktivität der PKA führt. Die PKA verstärkt die synaptische Transmission durch Phosphorylierung von Proteinen der Präsynapse. Nach Heisenberg (2003).

1.3.3. Der Einfluss des Futterentzugs auf die Expression des zuckerconditionierten Verhaltens

Bei *Drosophila* wurde gezeigt, dass für die appetitive Konditionierung, bei der im Training ein Duft mit Zucker belohnt wird, der Faktor „Futterentzug“ eine entscheidende Rolle spielt. Gefütterte Fliegen zeigten kein bzw. kaum ein signifikantes Kurzzeitgedächtnis (Abb. 1B; Tempel et al. 1983). Mit zunehmender Dauer eines Futterentzugs bis zum Konditionierungsbeginn stieg auch das gemessene Kurzzeitgedächtnis signifikant an, bis ein Plateau erreicht wurde (Abb. 1B). Inwiefern der Gedächtnisaufbau im Training vom Fütterungszustand abhängt, blieb bislang unklar. Es wurde aber bereits nachgewiesen, dass für das Zeigen des zuckerconditionierten Gedächtnisses im Test ein Futterentzug notwendig ist. Nur Fliegen, die bis zum Test keinen Zugang zu Futter hatten, exprimierten das konditionierte Verhalten, während eine Fütterung nach der Konditionierung bis zum Test die Gedächtnisexpression inhibierte (Gruber 2006; Krashes et al. 2008). Konditionierte Fliegen, die nach dem Training zuerst gefüttert und dann wieder ausreichend lange ohne Futter gehalten wurden, zeigten im Test das Gedächtnis (Tempel et al. 1983; Krashes et al. 2008). Das macht

deutlich, dass nach dem Gedächtnisaufbau eine Fütterung nur die Bereitschaft zur Gedächtnisexpression temporär unterdrückt, nicht aber das zuckerkonditionierte Gedächtnis selbst dauerhaft beschädigt bzw. abbaut. Deshalb wurde vermutet, dass durch die Paarung mit dem Zucker (US) der Duft (CS) eine neue, futterassoziierte Bedeutung bekommt und so die Expression des olfaktorischen Gedächtnisses ähnlich reguliert werden könnte wie andere futterbezogene Verhaltensweisen (Krashes et al. 2008). Eine Untersuchung der Bereitschaft zum zuckerkonditionierten Verhalten könnte daher generell die Regulation von futterbezogenem Verhalten aufzuklären helfen, wie bereits die Forschung am *Drosophila* Neuropeptid F (dNPF) deutlich machte. Vor kurzem wurde gezeigt, dass das dNPF an der Regulation des zuckerkonditionierten Verhaltens beteiligt ist. Das dNPF wirkt hemmend auf dopaminerge Neurone, die selbst Ausgangsneurone des Pilzkörpers inhibieren und damit die Expression des Gedächtnisses supprimieren. Ein dNPF-Signal gibt daher die Gedächtnisexpression frei (Abb. 8; Krashes 2009). Andere Studien zeigten, dass der dNPF-Signalweg bei Larven das Fressverhalten aktiviert (Wu et al. 2003, 2005). Auch das Säugerhomolog NPY spielt eine wichtige Rolle für die Bereitschaft zur Futtersuche und -aufnahme (Luquet et al. 2005; Gao and Horvath 2007).

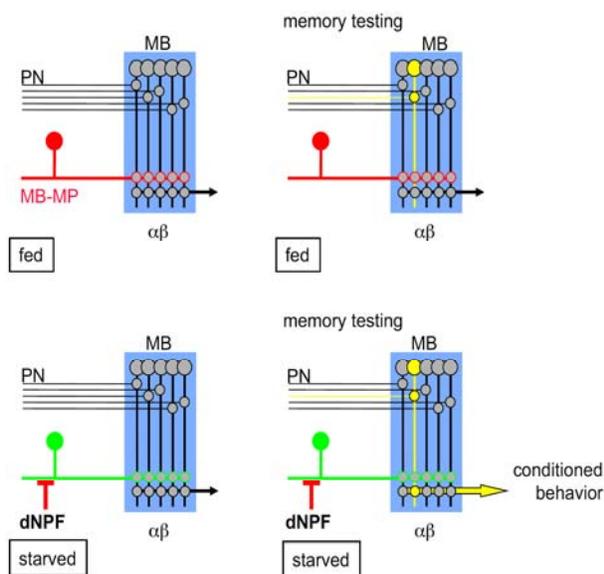


Abb. 8: Modell zur Kontrolle der Expression des zuckerkonditionierten Gedächtnisses. Ein CS+ erregt eine spezifische Gruppe von Projektionsneuronen (PN) und Zellen des Pilzkörpers (MB) (gelb). Der Pilzkörperausgang ($\alpha\beta$ -Neurone) wird in gefütterten Fliegen durch dopaminerge Neurone (rot) inhibiert (oben). In nicht gefütterten Fliegen (unten) hemmt dNPF (rot) die Wirkung der dopaminergen Zellen (grün) und das appetitive Gedächtnis wird exprimiert. Vereinfacht nach Krashes (2009).

1.4. Zielsetzung für die Doktorarbeit

In dieser Arbeit habe ich versucht, herauszufinden wie die Bereitschaft zur Expression des zuckerconditionierten Verhaltens bei *Drosophila* reguliert wird. Dazu war es zuerst notwendig zu bestätigen, dass die Bereitschaft zur zuckerconditionierten Gedächtnisexpression vom Futterentzug abhängt und durch Fütterungen temporär und reversibel unterdrückt werden kann. Außerdem sollte überprüft werden wie selektiv der Futterentzug das zuckerconditionierte Verhalten beeinflusst. Im nächsten Schritt sollte herausgefunden werden, welche fütterungsassoziierten Faktoren die anschließend getestete Bereitschaft das zuckerconditionierte Verhalten zu zeigen, unterdrücken. Dazu wurde die Wirkung

- der internen Glukosekonzentration,
- der ernährenden Eigenschaft des Futters,
- des aufgenommenen Futtermolumens,
- der Stärke des Süßgeschmacks und
- der Osmolarität des Futters

auf die Gedächtnisexpression untersucht. Schließlich wurde überprüft, ob die Gedächtnisexpression und ein Zuckerpräferenzverhalten ohne Fütterung und nur durch künstliche Stimulation AKHerger Zellen supprimiert werden können. Dabei sollte durch die Thermostimulierung AKH-produzierender Neurone ein Anstieg der Trehalose- und Lipidkonzentrationen und damit wahrscheinlich der Osmolarität der Hämolymphe bewirkt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Genotypen der verwendeten Fliegen

Tabelle 1: verwendete Fliegenlinien

Linie	Beschreibung	Kommentar	Referenzen
Canton S	Wild-Typ	aus Würzburger Fliegensammlung	Schwärzel 2002
<i>white</i> ¹¹¹⁸	<i>white</i> ⁻ Mutante	kantonisiert	Dura 1993
UAS- <i>TrpA1</i>	<i>w</i> ; UAS- <i>TrpA1(II)</i>	Expression des wärmesensitiven Ionenkanals dTRPA1	Hamada et al. 2008
Gal4-AKH	<i>y w</i> ; AKH-Gal4 (III)	treibt Expression in AKH-produzierenden Neuronen der Corpora cardiaca	Lee and Park 2004

2.2. Fliegenaufzucht

Alle Fliegen wurden auf einem Standard *Drosophila* Medium (Guo et al., 1996) in einem konstanten hell/dunkel Zyklus (14h/10h) aufgezogen und gehalten. Die Temperatur betrug 25°C und die Luftfeuchtigkeit 60%.

2.3. Futterentzug

Zur experimentellen Nutzung wurden 0 bis 1 Tage alte adulte Fliegen beiderlei Geschlechts für 1 Tag auf frischem Futter gehalten, um einen homogenen Fütterungszustand für alle herzustellen. Danach wurden die 2 bis 3 Tage alten Fliegen in Gläser transferiert, die nur Wasser getränktes „Tissue“-Papier enthielten. Der Futterentzug dauerte je nach Versuch 0h bis ca. 50h.

2.4. Konditionierter Stimulus (CS)

Als konditionierte Stimuli wurden die Düfte 3-Octanol (MERCK, Germany, 8.21859.0050) und 4-Methylcyclohexanol (Sigma-Aldrich, Germany, 66360-100ML) verwendet. Beide Düfte wurden mit Paraffin (Sigma-Aldrich, Germany, 76233-1L) 10-fach verdünnt. Während des Trainings und des Tests wurden die Düfte in Duftbehältern mit einem Durchmesser von jeweils 4.3mm (3-Octanol) und 5.3mm (4-Methylcyclohexanol) präsentiert.

2.5. Unkonditionierter Stimulus (US)

Als unkonditionierter Stimulus wurde in allen appetitiven Lernversuchen 2M Saccharose verwendet. In einem Versuch wurden zusätzlich zur Saccharose noch weitere Zucker als unkonditionierte Stimuli benutzt: 2M Glukose, 2M Fruktose, 2M Arabinose und 1M Trehalose. Für alle 2M Zuckerlösungen wurden 25µl/cm² und für die 1M Trehaloselösung 50µl/cm² auf Filterpapiere (Whatman, England, 3030917) pipetiert und nach dem Trocknen wurden die Papiere während des Trainings in Röhrchen präsentiert. In den aversiven Lernexperimenten wurde Elektroschock als unkonditionierter Stimulus gegeben.

2.6. Duftkonditionierung

Wie schon bei anderen Autoren beschrieben, wurden bei der Duftkonditionierung entweder Zucker als Belohnung oder Elektroschocks als Bestrafung verwendet (Tully and Quinn 1985; Thum et al., 2007). Es wurde eine differenzielle Konditionierung mit zwei Düften (CS^+ und CS^-) durchgeführt. Dabei empfingen die Fliegen im Training für 1min den CS^+ zusammen mit Zucker oder Elektroschocks (12 Pulse; 90V DC) (Tully and Quinn 1985; Thum et al., 2007). Anschließend wurde den Fliegen für 1min der CS^- ohne Zucker oder Elektroschocks präsentiert. Bei der Zuckerkonditionierung empfingen die Fliegen den CS^+ und den CS^- jeweils zweimal und die Tiere wurden zwischen einem zuckerenthaltenden und einem zuckerfreien Röhrchen hin und her transferiert. Um nicht assoziative Effekte durch die Reihenfolge der CS^+ - und CS^- - Präsentationen auszuschließen, wurde der CS^+ in etwa der Hälfte der Versuche vor dem CS^- angeboten und in der anderen Hälfte war die Reihenfolge umgekehrt. Nach dem Training wurde das assoziative Gedächtnis getestet, indem sich die konditionierten Fliegen zwischen dem vormals belohnten/bestraften (CS^+) und unbelohnten/unbestraften (CS^-) Duft entscheiden konnten („T-maze“-Prinzip) (Schwärzel et al. 2002). Die Fliegen wurden entweder direkt nach dem Training (Kurzzeitgedächtnis/3min-Gedächtnis) einem Test zugeführt oder zuerst in befeuchteten Gläsern aufbewahrt und dann auf ein 3h-, 4h- oder 12h-Gedächtnis getestet. Ein vollständiges Experiment bestand aus zwei Versuchen. Im ersten Versuch wurde ein Duft belohnt/bestraft und im zweiten Versuch wurde mit einer neuen Gruppe von Fliegen der andere Duft belohnt/bestraft. Aus den Mittelwerten der Präferenzen (P1 und P2) beider reziproker Experimente wurde der Lernindex (Li) berechnet (Tully and Quinn, 1985).

$$P1 = [N_{(CS^+)} - N_{(CS^-)}] / [N_{(CS^+)} + N_{(CS^-)}] \quad CS^+ = 3\text{-Oct}; CS^- = 4\text{-MCH}$$

$$P2 = [N_{(CS^+)} - N_{(CS^-)}] / [N_{(CS^+)} + N_{(CS^-)}] \quad CS^+ = 4\text{-MCH}; CS^- = 3\text{-Oct}$$

$$Li = (P1 + P2) / 2$$

2.7. Manipulation des Fütterungszustands im Lernexperiment

Zur Manipulation des Fütterungszustands wurden unterschiedliche Substanzen gefüttert (Tabelle 2). Neben metabolisierbaren Zuckern wurden als nicht „ernährende“, aber süße Substanzen D-Arabinose und Trehalose, der der Trehalaseinhibitor Validoxyamin A (VA) beigemischt war, verwendet. Als nicht süße, aber osmotisch wirksame Substanzen benutze ich

NaCl, KCl und Glycin. Die Osmolarität der Salze und des Glycins waren in den entsprechenden Experimenten doppelt so hoch wie die der Glukose. Alle Plastikgläser in denen die Fliegen gehalten wurden, waren entweder durch einen Agaroseblock oder ein Wasser getränktes „Tissue“-Papier befeuchtet, unabhängig ob die Gläser Futter enthielten oder nicht. Die Futtersubstanzen wurden, wenn nicht extra anders angegeben, in einem 0.75%-Agaroseblock angeboten. In einigen Versuchen wurden sie auch auf getrocknetem Filterpapier präsentiert. Um einseitige Effekte auf das Verhalten, die durch Erschütterungen beim Transfer in die Futtergläser auftreten könnten, auszuschließen, wurde auch die Kontrollgruppe, die nicht gefüttert wurde, in futterfreie Behälter transferiert.

Tabelle 2: verwendete Substanzen in den Konditionierungsversuchen. Die Substanzen wurden den Fliegen in der Regel zwischen Training und Test angeboten.

gefütterte Substanz(en)	Fütterungsdauer	Art der Futterpräsentation
Futtergemisch (<i>Drosophila</i> Medium)	1min, 2min, 5min, 20min	0.75% Agaroseblock (Carl Roth, Germany, 2267.3)
Saccharose: 2M (MERCK, Germany, 1.07687.1000)	4h	25µl/cm ² getrocknet auf Filterpapier
Fruktose: 2M (Carl Roth, Germany)	4h	25µl/cm ² getrocknet auf Filterpapier
D-Arabinose: 0,3M; 0,5M; 1M; 2M (Sigma-Aldrich, Germany, A3131-100G)	15min, 4h	25µl/cm ² getrocknet auf Filterpapier; 0.75% Agaroseblock
Glukose: 0,3M; 0,5M; 1M; 2M (MERCK, Germany, 1.04074.1000)	15min, 4h	25µl/cm ² getrocknet auf Filterpapier; 0.75% Agaroseblock; 7% Agaroseblock

Trehalose: 0,125M; 1M (Sigma-Aldrich, Germany, T9531-100G; BDH PROLABO, Germany, 28719.290)	4h	50µl/cm ² getrocknet auf Filterpapier; 0.75% Agaroseblock
Validoxylamine A: 20µM (Wako Chemicals, Germany, 20-01321)	4h	0.75% Agaroseblock
NaCl: 0,3M (MERCK, Germany, 1.06404.1000)	15min	0.75% Agaroseblock
KCl: 0,3M (MERCK, Germany, 1.04936.1000)	15min	0.75% Agaroseblock
Glycin: 0,6M (Carl Roth, Germany, 3908.2)	15min	0.75% Agaroseblock

2.8. Thermostimulierung AKH-produzierender Zellen

Ziel war es, die Wirkung künstlich stimulierter AKH-produzierender Neurone auf die Gedächtnisexpression und die Zuckerpräferenz zu untersuchen. Dazu erhielten transgene Fliegen (σ *y w*; *Gal4-AKH* x ♀ *w*; *UAS-TrpA1*; Kontrolle: *w* x *w*; *UAS-dTrpA1* und *y w*; *AKH-Gal4* x *w*) eine Hitzebehandlung, die den temperatursensitiven Kationenkanal TrpA1, der in AKHergen Zellen exprimiert wurde, aktivieren sollte (Lee and Park 2004; Hamada et al. 2008). Um die AKHergen Neurone thermisch zu stimulieren, wurden die Fliegen für 40min in einem 33°C-Inkubator aufbewahrt. Die Fliegen wurden für die Hitzebehandlung in vorgewärmte Gläser transferiert. Alle Gläser waren befeuchtet und ohne Futter.

2.9. Überlebensexperimente

Für die Überprüfung des Ernährungswerts der in den Konditionierungsexperimenten verwendeten Substanzen wurden die Überlebensraten nach einer Fütterung gemessen. Dazu wurden alle Fliegen für 20h ohne Futter gehalten und anschließend für unterschiedlich lange Zeit gefüttert (Tabelle 3). Je nach Versuch wurden die Fliegen entweder bis zum Versuchsende auf dem Testfutter gehalten oder zwischenzeitlich in befeuchtete Gläser ohne Futter transferiert. Nach 25h oder 50h wurden die Überlebensraten berechnet.

Überlebensrate (%) = (Anzahl der lebenden Fliegen / Anzahl aller Fliegen) x 100. Die Art der Futterpräsentation war mit der in den Konditionierungsversuchen identisch.

Tabelle 3: verwendete Substanzen in den Überlebensversuchen

gefütterte Substanz(en)	Fütterungsdauer	Art der Futterpräsentation
Futtergemisch (<i>Drosophila</i> Medium)	5min; 20min; 48-50h	0.75% Agaroseblock
Saccharose: 2M	48-50h	25µl/cm ² getrocknet auf Filterpapier
Fruktose: 2M	48-50h	25µl/cm ² getrocknet auf Filterpapier
Maltose: 1M (Carl Roth, Germany, 8951.1)	48-50h	0.75% Agaroseblock
D-Arabinose: 1M	48-50h	0.75% Agaroseblock
Glukose: 2M 1M	48-50h	25µl/cm ² getrocknet auf Filterpapier; 0.75% Agaroseblock;
Mischung aus D-Arabinose: 1M D-Glukose: 1M	48-50h	0.75% Agaroseblock
Trehalose: 0.5M; 0.125M	4h; 48-50h	50µl/cm ² getrocknet auf Filterpapier; 0.75% Agaroseblock
Trehalose: 0.5M; 0.125M Validoxylamine A: 5µM; 20µM	4h; 48-50h	0.75% Agaroseblock

2.10. Test auf Zuckerpräferenz

Für den Zuckerpräferenztest wurden Fliegen auf zwei Hälften eines trockenen Whatman Filterpapiers in einer Petrischale gegeben (Schnaitmann et al. 2010). Eine Hälfte war zuvor mit einer 2M Saccharoselösung behandelt worden, die andere zur Kontrolle mit Wasser. Die räumliche Verteilung der Fliegen wurden jede Sekunde von oben mit einer CMOS Kamera für insgesamt 240 s aufgenommen. Die Anzahl der Fliegen auf beiden Hälften wurde ständig mit Hilfe der ImageJ Software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda Maryland, USA) gezählt. Ein Präferenzindex wurde gebildet indem die Anzahl der Fliegen auf der "Kontroll"-Hälfte von der Anzahl derer auf der "Zucker"-Hälfte subtrahiert wurde und das Zwischenergebnis durch die Anzahl aller Fliegen dividiert wurde. Das Experiment erfolgte in Zusammenarbeit mit Stephan Knappek (Gruber et al. in Bearbeitung).

2.11. Quantifizierung der aufgenommenen Futtermengen

Die Messung der Futtermenge entsprach im wesentlichen bereits publizierten Protokollen (Tanimura et al. 1982; Hiroi et al. 2004). 20h nicht gefütterte Fliegen wurden wie im Konditionierungsexperiment für 15min in Futtergläsern gehalten. Diese enthielten im 0.75%-Agaroseblock einen Farbstoff (0.05% Brilliant Blue FCF) und die zu untersuchenden Substanzen. Anschließend wurden die Fliegen gefroren, je 20 von ihnen mit 300 μ l 50%-Ethanol homogenisiert und für 40min bei 15,000 g zentrifugiert. Schließlich wurde die relative Absorption bei 630nm mit Hilfe eines „microplate reader“ (Nalge Nunc International, Denmark) gemessen. Um die aufgenommene Futtermenge zu kalkulieren, wurden die gemessenen OD-Werte von OD-Werten subtrahiert, die aus dem Homogenat nicht gefütterter Fliegen ermittelt wurden. Die von einer Gruppe von Fliegen aufgenommene Futtermenge wurde aus der Standard-Kurve (lineare Regression) der OD-Werte gegen die Farbstoffkonzentration hergeleitet. Der ermittelte Wert wurde durch die Anzahl der homogenisierten Fliegen dividiert. Das Experiment erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Teiichi Tanimura und Michiko Fujita (Gruber et al. in Bearbeitung).

2.12. Elektrophysiologie

Die elektrophysiologische Untersuchung der Chemosensillen des Labellums wurde mit Hilfe der bereits publizierten "tip-recording"-Methode durchgeführt (Hiroi et al. 2002). Eine Fliege wurde an der Spitze einer mit *Drosophila*-Ringerlösung gefüllten Glaskapillare befestigt. Der Saugrüssel wurde an der Basis des Labellums mit Lanolin fixiert (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan). Eine einzelne I-Typ Geschmackssensille des Labellums wurde für bis zu 4s mit einer Ableitelektrode stimuliert, die das Stimulans und 1mM KCL enthielt. Das von einem Vorverstärker (TastePROBE) aufgezeichnete Signal wurde digitalisiert (DT2821, Data Translation, USA), auf einem Computer gespeichert und mit einer Software (dbwave) analysiert (Marion-Poll 1995). Das Experiment erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Teiichi Tanimura und Michiko Fujita (Gruber et al. in Bearbeitung).

2.13. Statistik

Das Signifikanzlevel bei allen statistischen Tests war 5%. Die Daten wurden zuerst auf ihre Normalverteilung und Varianzen mit dem Shapiro-Wilktest untersucht, gefolgt von Bonferroni-Korrektur bzw. Barlett Test. Wurde kein Kriterium verletzt, wurde ein parametrischer Test verwendet (two-tailed [one-sample] *t*-test, one- or two-way ANOVA gefolgt von Bonferroni korrigierten post-hoc Tests). Waren die Daten nicht normal verteilt oder die Varianzen zu verschieden, so wurde ein nicht parametrischer Test verwendet (Kruskal-Wallis Test gefolgt von Dunns Korrektur). Die Statistik wurde mit Prism (GraphPad, San Diego, CA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Bedeutung des Fütterungszustands für Aufbau und Expression des zucker konditionierten Gedächtnisses

3.1.1. Wie selektiv ist der Einfluss des Futterentzugs für das zucker konditionierte Verhalten ?

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde eine deutliche Abhängigkeit des zucker konditionierten Verhaltens vom Fütterungszustand festgestellt (Abb. 1B; Gruber 2006; Tempel et al. 1983; Krashes et al. 2008). Es stellte sich die Frage, ob diese Abhängigkeit auf eine möglicherweise generell mit dem Futterentzug ansteigende, motorische Aktivität und/oder sensorische Empfindlichkeit, wie z.B. einer verbesserten Duftwahrnehmung, zurückgeführt werden kann oder ob das zuckerbelohnte Verhalten selektiv vom Fütterungszustand beeinflusst wird. Um diese Frage zu klären, wurden gefütterte und für 20h nicht gefütterte Fliegen entweder mit einer Zuckerbelohnung oder zur Kontrolle mit einer Elektroschockbestrafung konditioniert und sofort nach dem Training getestet. Dabei zeigte sich, dass das zuckerbelohnte Verhalten viel stärker vom Futterentzug abhing als das elektroschockkonditionierte (Abb. 9; $p < 0.001$). Ein Futterentzug war für ein signifikantes zucker konditioniertes Verhalten absolut notwendig (Abb. 9). Wie bereits bekannt, zeigten im Gegensatz dazu auch gefütterte Fliegen nach der Elektroschockbestrafung ein olfaktorisches Gedächtnis, auch wenn überraschenderweise ein Einfluss des Futterentzugs auf das elektroschockkonditionierte Verhalten feststellbar war (Abb. 9). Aus dem Ergebnis wird geschlossen, dass der Futterentzug selektiv den Aufbau und/oder die Expression des zucker konditionierten Gedächtnisses beeinflusst.



Abb. 9: Abhängigkeit des appetitiven und aversiven Kurzzeitgedächtnisses vom Fütterungszustand. Gefütterte Fliegen (helle Balken) zeigten nur nach einer Elektroschockkonditionierung ein Gedächtnis ($p < 0.001$) und nicht nachdem sie mit Zucker trainiert wurden ($p > 0.05$). Der Unterschied in der Gedächtnisexpression zwischen gefütterten (helle Balken) und für 20h

nicht gefütterten Fliegen (dunkle Balken) war bei der Zuckerkonditionierung deutlich stärker als bei der Elektroschockkonditionierung. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet (für alle $p < 0.001$). Es sind die Mittelwerte der Lernindizes (Li) von 12-23 Experimenten gezeigt. Die Fehlerbalken geben die SEM's an. (Zus. mit S.K.^I)¹

3.1.2. Ist der Futterentzug notwendig für den Aufbau des zuckerkonditionierten Gedächtnisses im Training und/oder für dessen Expression im Test ?

In den bisherigen Versuchen wurde das Gedächtnis immer direkt nach der Konditionierung getestet, so dass der Fütterungszustand der Fliegen während des Gedächtnisaufbaus im Training und während des Gedächtnisabrufs im Test immer sehr ähnlich war. Deshalb war es unklar, ob entweder das Lernen oder das Zeigen des Gedächtnisses oder beides vom Fütterungszustand abhängig sind. Um zuerst den Einfluss des Futterentzugs auf die Gedächtnisexpression zu untersuchen, erfolgten eine Duft-Zucker-Konditionierung im nicht gefütterten Zustand und der Test eines 4h-Gedächtnisses im gefütterten Zustand. Dazu wurden Fliegen nach einem Futterentzug von 20h konditioniert und dann entweder direkt nach dem Training oder unmittelbar vor dem Test für 20min gefüttert. Es stellte sich heraus, dass alle gefütterten Fliegen, im Gegensatz zu den nicht gefütterten der Kontrollgruppe, kein 4h-Gedächtnis zeigten (Abb. 10).

¹In Zusammenarbeit mit Stephan Knapke (S.K.^I), Tanimura-Gruppe: Prof. Teiichi Tanimura/Michiko Fujita (T.T./M.F.^{II}), Lasse Bräcker (L.B.^{III}) oder Igor Siwanowicz (I.S.^{IV}). Vgl. 8.1. Erklärung (S. 79).

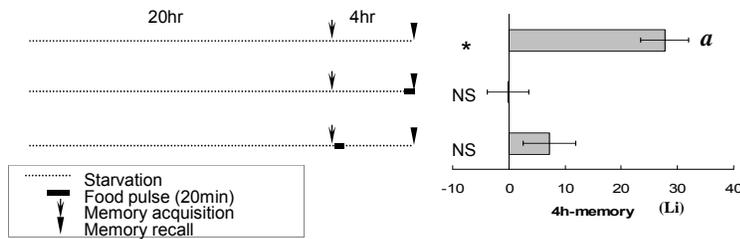


Abb. 10: Wirkung von Fütterungen zwischen Training und Test auf die Expression des appetitiven 4h-Gedächtnisses.

Fliegen, die direkt nach dem Training oder vor dem Test für

20min gefüttert wurden, zeigten kein Gedächtnis. Es sind die Li-Mittelwerte \pm SEM von 20-22 Experimenten dargestellt. Der Buchstabe **a** zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0.01$) zu allen anderen Gruppen an. Ein signifikantes Gedächtnis ($p < 0.001$) wird durch einen Stern und ein nicht signifikantes durch NS ($p > 0.05$) symbolisiert.

Da für alle Fliegen die Bedingungen für den Gedächtnisaufbau im Training gleich waren, kann gefolgert werden, dass der Fütterungszustand während des Tests kontrolliert, ob das Gedächtnis gezeigt wird oder nicht. Ob die 20min-Fütterungen zwischen Training und Test die Duft-Zucker-Assoziationen dauerhaft zerstörten oder ob dadurch das Gedächtnis selbst intakt blieb, aber die Bereitschaft es zu zeigen unterdrückt wurde, konnte mit diesem Versuch nicht geklärt werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, war es notwendig die konditionierte Gruppe von Fliegen, die direkt nach dem Training gefüttert wurde, bis zum Test länger ohne Futter zu halten. Aus diesem Grund wurde ein Experiment durchgeführt, in dem ein 12h-Gedächtnis getestet wurde. Es wurden Fliegen, die 12h nicht gefüttert wurden, konditioniert und dann entweder sofort nach dem Training oder unmittelbar vor dem 12h-Gedächtnis-Test für 20min gefüttert. Fliegen, die direkt vor dem Test gefüttert wurden, zeigten, wie schon im vorherigen 4h-Gedächtnisversuch, kein olfaktorisches Gedächtnis (Abb. 11). Im Gegensatz dazu wurde bei Fliegen, die unmittelbar nach dem Training gefüttert wurden und dann für 11h 20min bis zum Test kein Futter bekamen, ein 12h-Gedächtnis gemessen (Abb. 11). Damit wird klar, dass eine Fütterung von konditionierten Fliegen nur die Bereitschaft das Gedächtnis zu zeigen temporär unterdrückt, nicht aber das Gedächtnis selbst abbaut. Zusätzlich wurde in diesem Versuch untersucht inwiefern auch der Gedächtnisaufbau während des Trainings vom Fütterungsstatus beeinflusst wird. Dazu wurden gefütterte Fliegen konditioniert und 12h nach dem Training getestet. Es wurde entweder dauerhaft oder für 20min vor dem Training gefüttert. Zwischen Training und Test wurden alle Fliegen ohne Futter gehalten. Beide Gruppen der vor dem Training gefütterten Fliegen zeigten kein 12h-Gedächtnis (Abb. 11), trotz des 12h-Futterentzugs zwischen Training und Test. Zwei bis zum Training nicht

3.1.3. Abhängigkeit der Zuckerpräferenz vom Futterentzug

Wie aus Abbildung 11 gefolgert wurde, bilden bis zur Konditionierung gefütterte Fliegen kein Gedächtnis. Dies könnte damit erklärt werden, dass die Verhaltensbedeutsamkeit des Zucker-US‘ vom Fütterungszustand abhängt. Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss des Fütterungsstatus auf die naive Zuckerpräferenz untersucht. Dazu wurden gefütterte und unterschiedlich lange nicht gefütterte Fliegen einem binären Wahltest zugeführt. Es stellte sich heraus, dass die Präferenz für die Seite mit Zucker gegenüber der Seite ohne Zucker mit dem Fütterungszustand korreliert war (Abb. 12). Das Ergebnis macht deutlich, dass die Saccharose für gefütterte Fliegen nicht verhaltensbedeutsam ist und während einer Konditionierung wahrscheinlich keine Belohnung darstellt. Die Frage ob der Zucker inkorporiert werden muss, um als Belohnung zu wirken, kann mit diesem Versuch nicht geklärt werden (vgl. Abb.1A).

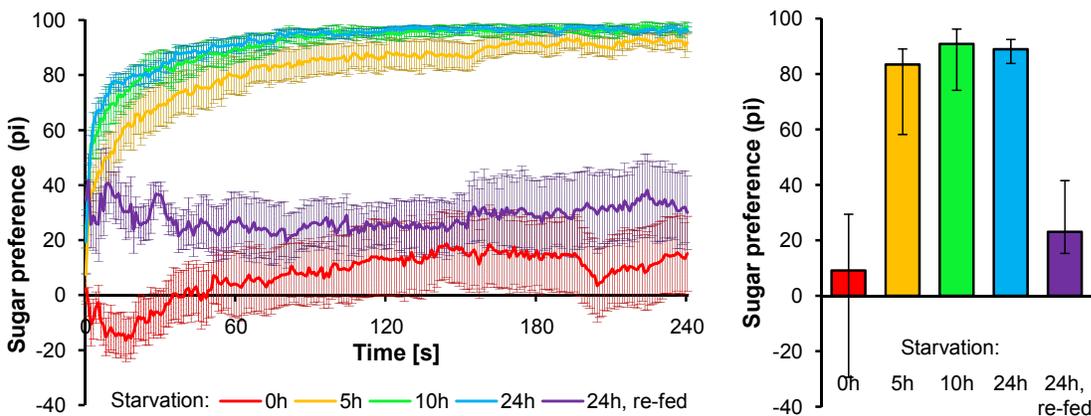


Abb. 12: Abhängigkeit der Zuckerpräferenz vom Fütterungszustand: Fliegen, die für 5h, 10h oder 24h nicht gefüttert wurden, zeigten ein Präferenzverhalten für 2M Saccharose. Eine 15min-Fütterung direkt vor dem Test bewirkte eine Reduktion der Zuckerpräferenz von zuvor 24h nicht gefütterten Fliegen. N=4-14. Die Balken geben die zusammengefassten Daten der ersten 120 s wider. Es sind die Mediane \pm Quartile angegeben. (Zus. mit S.K.)¹, vgl. S. 29

3.1.4. Einfluss kurzer Fütterungen auf die Gedächtnisexpression und das Überleben

In den Abbildungen 10 und 11 wurde gezeigt, dass ein 20min-„Futterpuls“ vor dem Test die Bereitschaft ein zucker konditioniertes 4h- und 12h-Gedächtnis auszuprägen, vollständig unterdrückte. Um nun herauszufinden wie lange eine Fütterung vor dem Test mindestens andauern muss um die Gedächtnisexpression zu inhibieren, wurden Fliegen nach einem

Futterentzug von 20h konditioniert und nach 4h getestet. Unmittelbar vor dem Test wurde entweder ein 5min-, 2min- oder 1min-„Futterpuls“ gegeben. Überraschenderweise reichte schon eine Fütterungsdauer von einer Minute aus um die Ausprägung eines 4h-Gedächtnisses zu unterdrücken (Abb. 13). Zusätzlich wurde der Effekt eines 1min-„Futterpulses“ auf die Expression eines 3min-Gedächtnisses untersucht. Dazu wurden Fliegen nach einem Futterentzug von 20h konditioniert und unmittelbar nach dem Training für eine Minute gefüttert und dann sofort getestet. Die Fütterung suppressierte die Expression des Kurzzeitgedächtnisses (Abb. 13).

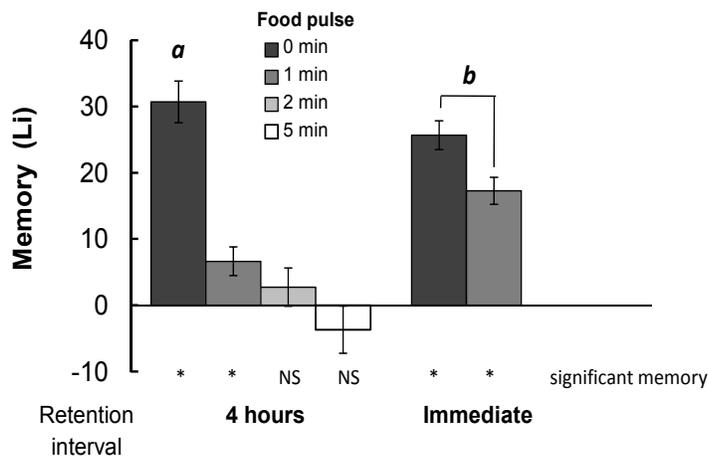


Abb. 13: Effekt kurzer Fütterungen auf die Expression des zuckerconditionierten 4h- und 3min-Gedächtnisses. 1-, 2- und 5min-„Futterpulse“ direkt vor dem Test suppressierten das konditionierte Verhalten. Eine Fütterung von 1min unterdrückte auch das Kurzzeitgedächtnis. Die Buchstaben **a** bzw. **b**

kennzeichnen jeweils einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Gruppen ($p < 0.001$ bzw. $p < 0.05$). Signifikantes konditioniertes Verhalten ($p < 0.01$) wird durch einen Stern angegeben. NS bedeutet nicht signifikant. Die Datenpunkte zeigen die Li-Mittelwerte \pm SEM von 15-25 Experimenten.

Da eine 5min-Fütterung eine 4h-Gedächtnisexpression ebenso vollständig unterdrückte wie in vorherigen Versuchen eine 20min-Fütterung, wurde untersucht inwiefern die beiden unterschiedlich lange dauernden „Futterpulse“ auch einen vergleichbar ernährenden Effekt haben. Es wurden Fliegen nach einem Futterentzug von 20h für 5min oder 20min gefüttert, anschließend für 50h erneut ohne Futterzugang gehalten und schließlich wurde für jede Gruppe die Überlebensrate berechnet. Die Überlebensraten beider gefütterter Gruppen waren nicht verschieden voneinander, aber erhöht gegenüber der Überlebensrate der nicht gefütterten Kontrollgruppe (Abb. 14). Das bedeutet, dass das gleiche Futter, für 5min oder für 20min angeboten, 50h später eine vergleichbar ernährende Wirkung auf die nicht gefütterten Fliegen

hat. Eine Futteraufnahme hat daher in beiden Fütterungsintervallen stattgefunden, wobei vermutet werden kann, dass in beiden Gruppen eine ähnliche Menge aufgenommen wurde.

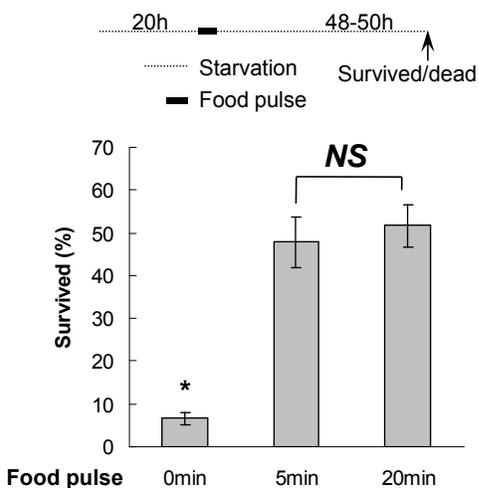


Abb. 14: Auswirkung kurzer Fütterungen auf die Überlebensrate. Fütterungen von Fliegen nach einem Futterentzug von 20h für 5- oder 20min erhöhten die nach ca. 2 Tagen gemessenen Überlebensraten vergleichbar. Die mit einem Stern gekennzeichnete Gruppe unterscheidet sich signifikant ($p < 0.001$) von allen anderen. NS bedeutet nicht signifikant. Es sind die Mittelwerte \pm SEM der überlebenden Fliegen in Prozent von 13-16 Experimenten dargestellt.

3.1.5. Verwendung reiner Zucker zur Manipulation des Fütterungszustands

Das in allen bisherigen Experimenten zur Manipulation der Fütterungszustände verwendete Futter bestand aus einem komplexen Gemisch von Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Die Wirkung einzelner Substanzen und deren Konzentrationen auf die Expression des konditionierten Verhaltens konnte daher nicht untersucht werden. Deshalb verwendete ich statt eines diffusen Futtermix' einzelne, reine und dadurch in ihrer Konzentration festlegbare Mono- und Disaccharide um die Gedächtnisexpression zu unterdrücken. Es wurden Fliegen nach einem Futterentzug von 20h konditioniert und 4h nach dem Training getestet. Zwischen Training und Test wurden die Fliegen dauerhaft mit jeweils einer der folgenden Substanzen gefüttert: 2M Saccharose, 2M Glukose, 2M Fruktose oder 1M Trehalose. Alle verwendeten Substanzen unterdrückten die Gedächtnisexpression (Abb. 15). Das Ergebnis zeigt, dass einzelne reine Zucker ähnlich die Expression eines zucker konditionierten Gedächtnisses unterdrücken können wie ein komplexes Futtergemisch.

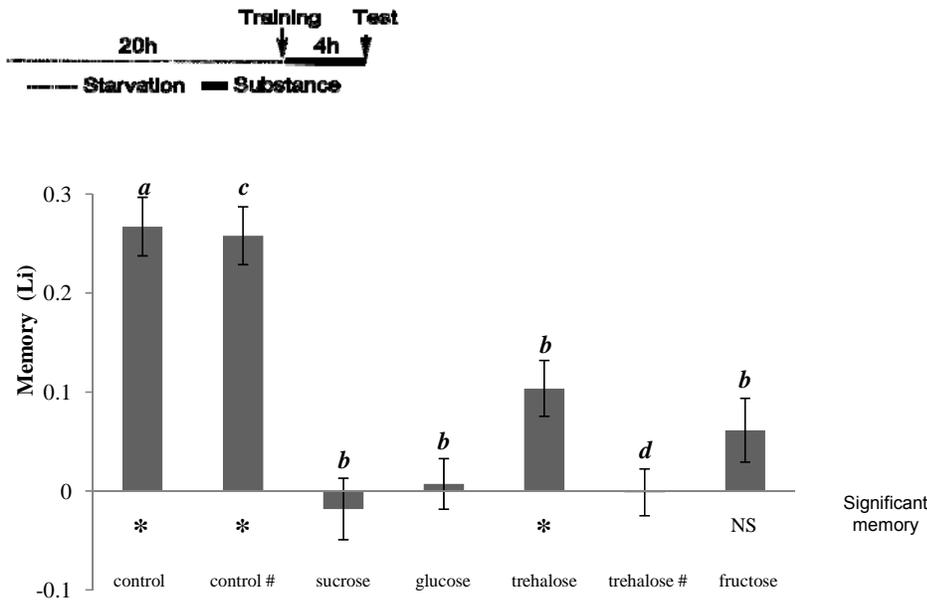


Abb. 15: Unterdrückung der Expression eines zuckerconditionierten 4h-Gedächtnisses durch verschiedene Mono- und Disaccharide. Fütterung von 2M Saccharose, 2M Glukose, 2M Fruktose oder 1M Trehalose zwischen Training und Test unterdrückten das konditionierte Verhalten. Die Substanzen wurden auf Filterpapier oder wie sonst üblich im Agaroseblock (#) präsentiert. Mit *a* und *b* bzw. *c* und *d* gekennzeichnete Gruppen unterscheiden sich jeweils signifikant (für beide $p < 0.001$) von einander. Signifikantes konditioniertes Verhalten wird durch einen Stern angezeigt ($p < 0.001$). NS bedeutet nicht signifikant. Die Balken zeigen die Li-Mittelwerte \pm SEM von 24-39 Experimenten.

Um zu überprüfen inwieweit die im Konditionierungsexperiment verwendeten Substanzen ernährend für die Fliegen sind, wurde ein Überlebensexperiment durchgeführt. Nach 20h Futterentzug, wurden den Fliegen für 50h jeweils eine der Substanzen (2M Saccharose, 2M Glukose, 2M Fruktose oder 1M Trehalose) angeboten. Fliegen, die mit den Zuckern gefüttert wurden, wiesen höhere Überlebensraten auf als nicht gefütterte Fliegen (Abb. 16). Daraus kann geschlossen werden, dass die Saccharide ernährend waren und deshalb auch aufgenommen wurden. Das Ergebnis deutet daraufhin, dass die Zucker auch im Konditionierungsexperiment den Ernährungszustand der Fliegen bis zum Test änderten.

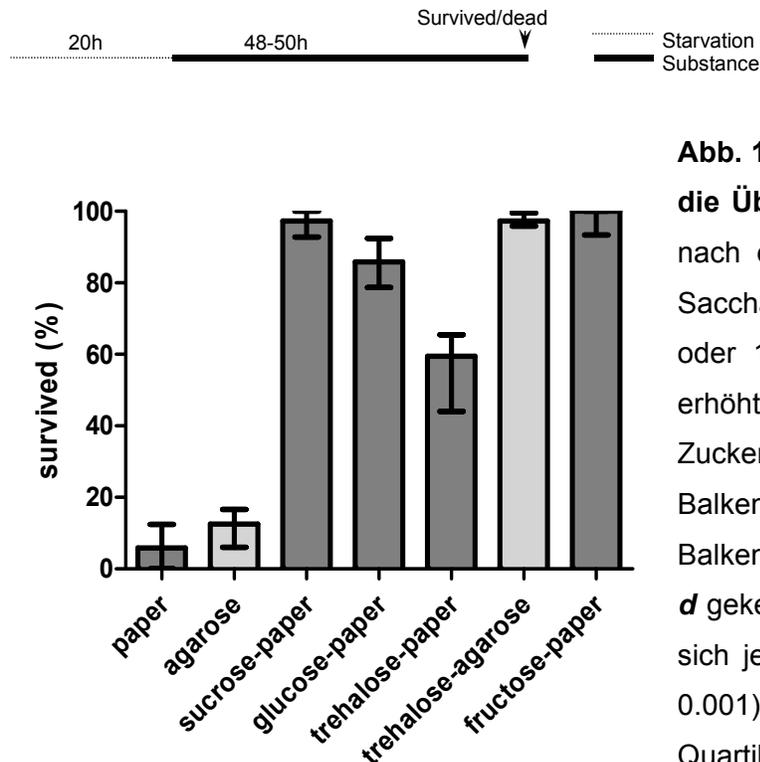


Abb. 16: Effekt verschiedener Zucker auf die Überlebensraten. Zugang von Fliegen nach einem Futterentzug von 20h zu 2M Saccharose, 2M Glukose, 2M Fruktose oder 1M Trehalose(-Agarose) für 2 Tage erhöhte die Überlebensraten signifikant. Die Zucker wurden auf Filterpapier (dunkle Balken) oder im Agaroseblock (helle Balken) präsentiert. Mit **a** und **b** bzw. **c** und **d** gekennzeichnete Gruppen unterscheiden sich jeweils signifikant ($p < 0.01$ bzw. $p < 0.001$) von einander. Es sind die Mediane \pm Quartile der überlebenden Fliegen in Prozent von 8-14 Experimenten dargestellt.

3.2. Suche nach fütterungsassoziierten Faktoren, die das zuckerconditionierte Verhalten unterdrücken

3.2.1. Inhibieren die „ernährende“ Eigenschaft des Futters und der Anstieg der Glukosekonzentration im Körper die Expression des zuckerconditionierten Gedächtnisses ?

Das Futtermischung und die verwendeten Saccharide unterdrückten die Gedächtnisexpression und waren ernährend. Um herauszufinden welche fütterungsassoziierten physiologischen Parameter entscheidend für die Unterdrückung des konditionierten Verhaltens sind, untersuchte ich deshalb zuerst die Rolle der beim Fressen ansteigenden körperlernen

Glukosekonzentration und der „ernährenden Eigenschaft“ des Futters. Dazu verwendete ich folgende Substanzen, die von nicht gefütterten Fliegen aufgenommen werden, aber die die interne Glukosekonzentration nicht erhöhen und nicht metabolisiert werden können: den süßen, aber nicht ernährenden Zucker Arabinose und eine mit dem Trehalaseinhibitor Validoxylamin A gemischte Trehalose, die nicht in Glukose gespaltet werden kann.

3.2.1.1. Fütterung von Trehalose und Validoxylamin A

Glukose dient den meisten Organismen als zellulärer Brennstoff und fungiert u.a. bei Insekten als Signalmolekül zur Regulation des Stoffwechsels (Kim and Rulifson 2004; Kohyama-Koganeya et al. 2008; Masumura et al., 2000). Möglicherweise könnte Glukose wie bei Säugetieren auch direkt an der Regulation des Fressverhaltens beteiligt sein (Marty et al. 2007). Bei Insekten wird Glukose durch die Hydrolyse des aus zwei Glukose Untereinheiten bestehenden Hauptblutzuckers Trehalose generiert. Die Spaltung der Trehalose wird dabei durch das Enzym Trehalase katalysiert (Becker et al. 1996; Wegener et al. 2003; Elbein et al. 2003). Um die Glukoseproduktion zu blockieren, verwendete ich den Trehalase Inhibitor Validoxylamin A (VA). VA, das in seiner Struktur der Trehalose ähnelt (Abb. 17A), zeigt eine hohe Affinität für die Trehalase und inhibiert spezifisch deren enzymatische Aktivität, was bei verschiedenen Lebewesen nachgewiesen wurde (Asano et al., 1990; Takahashi et al. 1995). Die Überprüfung ob und wie spezifisch VA wirkt, fand mit Hilfe eines Überlebensexperimentes statt. Dabei wurden Fliegen nach einem Futterentzug von 20h für 50h mit 0.5 M Trehalose, 1M Maltose oder 1M Glukose gefüttert. Die Zucker wurden jeweils entweder mit oder ohne 5µM VA präsentiert. Nach der 50h-Fütterung wurden die Überlebensraten berechnet. Alle VA freien oder VA enthaltenden Zucker, nur nicht die mit VA versetzte Trehalose, bewirkten eine Erhöhung der Überlebensraten (Abb. 17B). Das zeigt, dass VA die „ernährende“ Eigenschaft von Trehalose inhibiert. Die Wirkungslosigkeit von VA in der Fütterung von Maltose, einem anderen aus zwei Glukoseeinheiten zusammengesetzten Disaccharid, und Glukose lässt auf die spezifische Inhibition der Trehalase durch VA schließen (Abb. 17B). Dass VA, gemischt mit Trehalose, seine Wirkung durch die Zugabe von Glukose verliert, zeigt, dass keine toxisch erhöhte Trehalosekonzentration, sondern Hypoglycämie die Überlebensrate reduzierte (Abb. 17B). Der inhibitorische VA-Effekt auf die „ernährende“ Eigenschaft von Trehalose zeigte sich auch bei einer 4h-Fütterung (Abb. 17C).

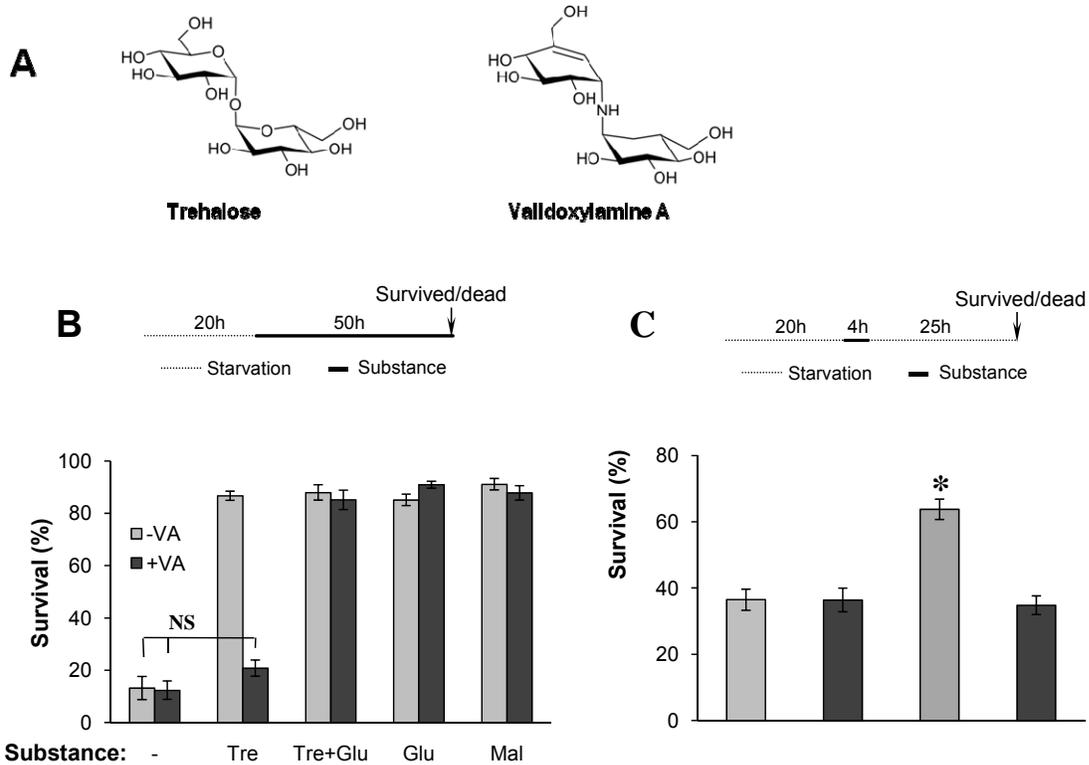


Abb. 17: Überprüfung der spezifischen Wirkung von Validoxylamin A (VA) im Überlebensexperiment. A: Chemisch ähnliche Strukturen von VA und Trehalose. **B:** Selektive Wirkung von 5 μ M VA auf das Überleben. VA reduzierte spezifisch die Überlebensrate von Fliegen, die mit 0.5M Trehalose gefüttert wurden. Dieser Effekt wurde durch Zugabe von 1M Glukose vollständig "gerettet". NS bedeutet nicht signifikant. N=9. Es sind die Mittelwerte \pm SEM der überlebenden Fliegen in Prozent dargestellt. (Zus. mit L.B.^{III})¹, vgl. S. 29 **C:** Effekt einer VA-Fütterung für 4h. Das Überleben von mit 0.125M Trehalose gefütterten Fliegen ohne 20 μ M VA war gegenüber allen anderen Gruppen erhöht. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0.001$) zu allen anderen Gruppen an. Es sind die Mittelwerte \pm SEM der überlebenden Fliegen in Prozent dargestellt. Die Anzahl der Experimente betrug 25-31.

Um die Rolle einer ansteigenden internen Glukosekonzentration als möglichen Faktor bei der Suppression eines konditionierten Verhaltens zu überprüfen, wurden Fliegen nach einem Futterentzug von 20h konditioniert und für 4h zwischen Training und Test entweder nur mit 0.125M Trehalose oder mit 0.125M Trehalose und 20 μ M VA gefüttert. Das Trehalosefutter reduzierte die Gedächtnisausprägung gleichermaßen, unabhängig ob mit oder ohne Zugabe

von VA (Abb. 18). Daraus wird gefolgert, dass ein Anstieg der Glukosekonzentration in der Fliege nicht notwendig zur Unterdrückung der Gedächtnisexpression ist.

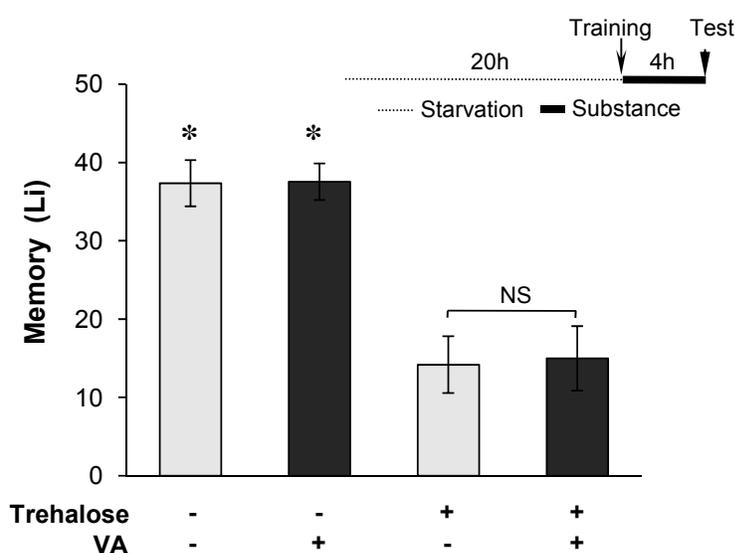


Abb. 18: Effekt von Trehalose und/oder Validoxyamin A (VA) auf die Expression eines zuckerconditionierten 4h-Gedächtnisses. 20µM VA hatte keinen Einfluss auf die Expression des conditionierten Verhaltens, unabhängig davon ob es mit oder ohne 0.125 M Trehalose präsentiert wurde. Die mit einem Stern gekennzeichneten Gruppen

unterscheiden sich signifikant ($p < 0.001$) von allen anderen. NS bedeutet nicht signifikant. Die Balken zeigen die Li-Mittelwerte \pm SEM von 12 Experimenten.

3.2.1.2. Fütterung von D-Arabinose

Alternativ zur Inhibition der Trehalase, wurde eine für *Drosophila* süße, aber nicht ernährende Substanz gesucht. Als möglichen Kandidaten (persönliche Mitteilung Tanimura; Marella et al. 2006) wählte ich die Pentose D-Arabinose. Nachdem elektrophysiologische Untersuchungen an Sensillen des Labellums Arabinose als süß identifizierten (Abb. 19A), überprüfte ich in einem Überlebensexperiment die ernährenden Eigenschaften. Nach einem 20h-Futterentzug wurden die Fliegen für 50h auf entweder 1M Arabinose, 1M Glukose oder einer Mischung aus beiden Zuckern gesetzt. Nach den 50h wurden die Überlebensraten berechnet. Diese waren zwischen Arabinose- und nicht gefütterten Fliegen nicht verschieden (Abb. 19B). Deshalb kann gefolgert werden, dass dieser Zucker nicht ernährend ist. Die Möglichkeit, dass ein Ernährungswert von gleichzeitiger Toxizität überlagert wurde, konnte durch die Rettung mit Glukose ausgeschlossen werden.

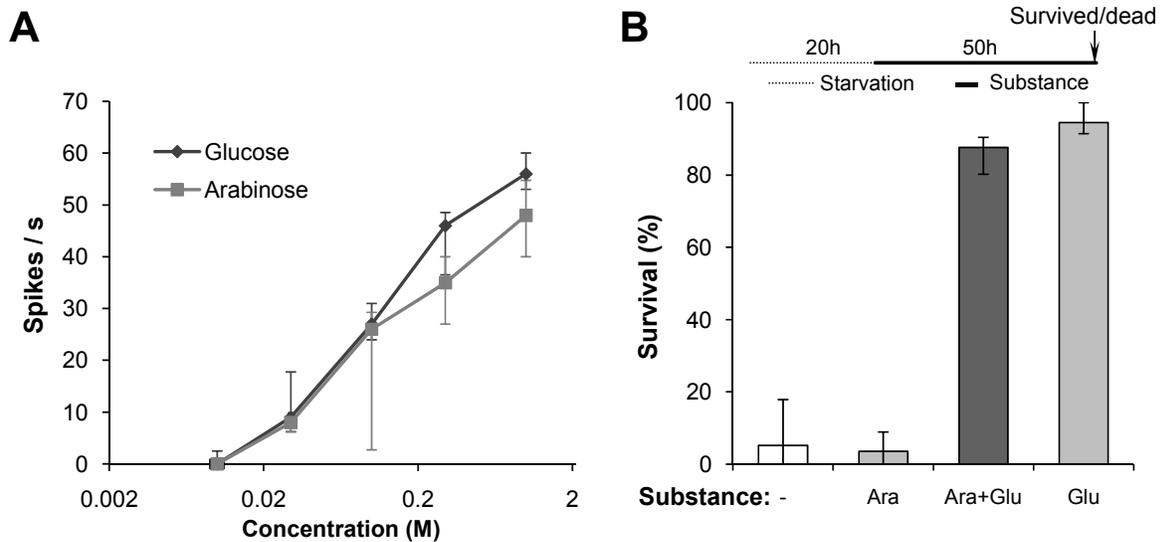


Abb. 19: Süßer Geschmack und ernährende Eigenschaft der D-Arabinose. A: Elektrophysiologische Messungen an den Sensillen des Labellums. Die Spikefrequenzen der Süß-Rezeptorneurone folgten den Konzentrationen von Arabinose und Glukose. Es sind die Mediane \pm Quartile von 8-19 Experimenten dargestellt. (Zus. mit T.T./M.F.¹¹), vgl. S. 29 **B:** Arabinose ist nicht ernährend. Die Reduktion der Überlebensrate durch 1M Arabinose wurde vollständig durch die Zugabe von 1M Glukose „gerettet“. Es sind die Mediane \pm Quartile dargestellt. Die Anzahl der Experimente betrug 6-8.

Nachdem Arabinose als nicht ernährende aber süße Substanz identifiziert war, wurde der Zucker auf seine die Gedächtnisexpression unterdrückende Eigenschaft getestet. 20h nicht gefütterte und konditionierte Fliegen wurden für 15min direkt vor dem Test mit unterschiedlichen Arabinose- und Glukosekonzentrationen gefüttert. Die Arabinose supprimierte die 4h-Gedächtnisexpression (Abb. 20). Der Unterdrückungseffekt war dem der Glukose sehr ähnlich und verstärkte sich mit zunehmender Konzentration (Abb. 20). Damit wird das Ergebnis des „Trehalaseinhibitionsversuchs“ (Abb. 18) bestätigt, dass die ernährende Eigenschaft eines Futters nicht notwendig zur Unterdrückung der zucker konditionierten Gedächtnisexpression ist. Da die Arabinosefütterung wahrscheinlich keinen Einfluss auf die interne Glukosekonzentration hat, bestätigt das Ergebnis dieses Versuchs, dass ein Glukoseanstieg im Körper nicht notwendig für die Suppression des konditionierten Verhaltens ist.

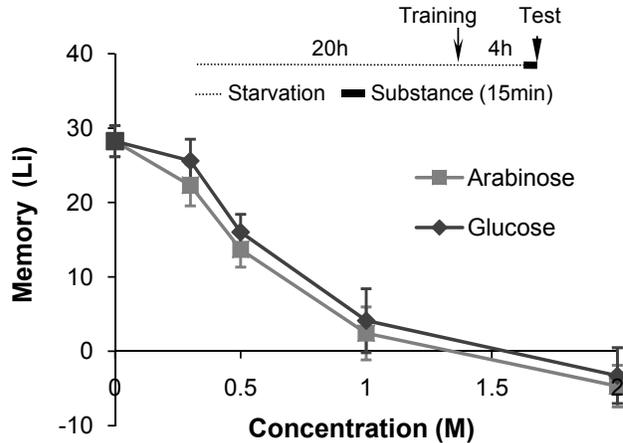


Abb. 20: Effekt von Arabinose und Glukose auf die Expression des zucker konditionierten 4h-Gedächtnisses. Die Unterdrückung des konditionierten Verhaltens durch 15min-Fütterungen direkt vor dem Test folgte ansteigenden Arabinose- und Glukosekonzentrationen (0M, 0.3M, 0.5M, 1M, 2M). Gleiche Konzentrationen der beiden Zucker hatten eine vergleichbar supprimierende Wirkung. Es sind die Mittelwerte \pm SEM von 16-47 Experimenten dargestellt.

3.2.2. D-Arabinose und andere Zucker als unkonditionierte Stimuli

Um herauszufinden ob eine süße aber nicht ernährende Substanz als Belohnung beim Gedächtnisaufbau im Training dienen kann, konditionierte ich 20h nicht gefütterte Fliegen mit 2M Arabinose und zur Kontrolle mit 2M Saccharose, 2M Glukose, 2M Fruktose oder 1M Trehalose. Mit Arabinose als unbedingtem Reiz trainierte Fliegen zeigten eine ähnlich signifikante Gedächtnisexpression wie mit Glukose, Fruktose oder Trehalose belohnte Fliegen (Abb. 21). Das konditionierte Verhalten nach der Belohnung mit Saccharose war jedoch signifikant ausgeprägter als bei allen anderen Zuckern (Abb. 21). Der Versuch macht deutlich, dass eine Substanz nicht ernährend sein muss um belohnend zu wirken. Ich vermute deshalb, dass die belohnende Eigenschaft im süßen Geschmack liegt.

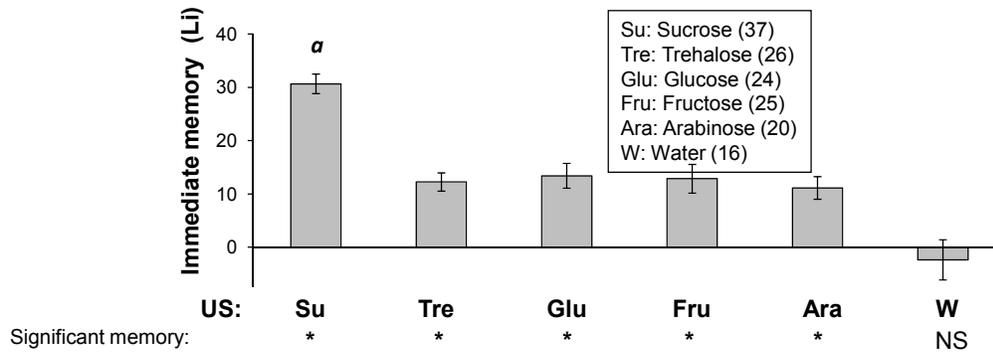


Abb. 21: Konditionierung mit verschiedenen Zuckern. Das Training von 20h nicht gefütterten Fliegen mit 2M Arabinose, 2M Saccharose, 2M Glukose, 2M Fruktose oder 1M Trehalose bewirkte die Expression eines appetitiven Kurzzeitgedächtnisses. Signifikantes konditioniertes Verhalten ($p < 0.001$) wird durch einen Stern angegeben. NS bedeutet nicht signifikant. Der Buchstabe **a** gibt einen signifikanten Unterschied ($p < 0.001$) zu allen anderen Gruppen an. Es sind die Mittelwerte \pm SEM von 16-37 Experimenten angegeben.

3.2.3. Die aufgenommene Futtermenge als mögliches verhaltensinhibitorisches Signal

Wie in Abbildung 20 gezeigt, verstärkte sich mit zunehmenden Arabinose- und Glukosekonzentrationen der Unterdrückungseffekt auf das konditionierte Verhalten. Da futterbezogene Verhaltensweisen bei vielen Tieren durch Volumensignale des Verdauungstrakts inhibiert werden (Powley and Phillips 2004; Cummings and Overduin 2007; Edgecomb et al. 1987; Roessingh and Simpson 1984; Simpson and Bernay 1983; Bernays 1985), könnte die Expression des zucker konditionierten Gedächtnisses von der aufgenommenen Futtermenge abhängig sein. Daher wurden Fliegen nach einem Futterentzug von 20h für 15min mit den gleichen Arabinose- und Glukosekonzentrationen gefüttert wie im Konditionierungsversuch. Die anschließende Quantifizierung der aufgenommenen Futtermenge zeigte jedoch, dass die inkorporierten Volumina negativ mit den zunehmenden Konzentrationen der beiden Zucker korreliert waren (Abb. 22). Darüberhinaus wurde bei allen Konzentrationen immer mehr Glukose als Arabinose aufgenommen (Abb. 22). Die Wirkungen der beiden Zucker auf die Futteraufnahme (Abb. 22) und das zucker konditionierte Verhalten (Abb. 20) korrelieren somit nicht miteinander. Deshalb kann geschlossen werden, dass der Suppressionsgrad des konditionierten Verhaltens von der Konzentration und nicht von Unterschieden in der aufgenommenen Futtermenge abhängig ist.

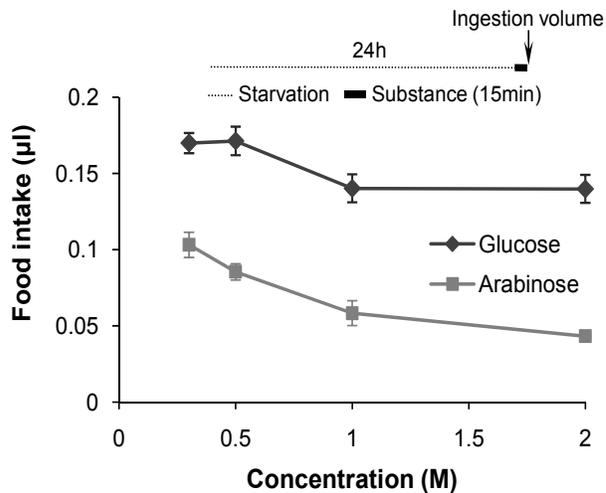


Abb. 22: Aufnahme von Arabinose und Glukose bei verschiedenen Konzentrationen.

Ansteigende Zuckerkonzentrationen (0M, 0.3M, 0.5M, 1M, 2M) bewirkten keine verstärkte Aufnahme. Es wurde bei gleichen Konzentrationen mehr Glukose als Arabinose aufgenommen. Die 15min-Fütterungen erfolgten nach einem 20h-Futterentzug. Die mit einem

Stern gekennzeichneten Gruppen unterscheiden sich jeweils signifikant ($p < 0.001$) von den nicht markierten Gruppen der gleichen Konzentration. Die Datenpunkte geben die Mittelwerte \pm SEM von 8-11 Experimenten an. (Zus. mit T.T./M.F.¹¹), vgl. S. 29

3.2.4. Wird das zuckerconditionierte Verhalten durch den süßen Geschmack und/oder die Osmolarität des Futters unterdrückt ?

3.2.4.1. Ein Versuch die Wirkung des süßen Geschmacks ohne eine Futteraufnahme zu überprüfen

Die mit der Konzentration zunehmende Unterdrückung der Gedächtnisexpression könnte mit einem Anstieg des süßen Geschmacks der Zucker erklärt werden. Um den Effekt des „süßen Geschmacks“ auf die Gedächtnisexpression zu untersuchen, sollte eine Substanz gefüttert werden, die süß ist, aber nicht inkorporiert werden kann. Dazu habe ich 20h nicht gefütterten und konditionierten Fliegen für 15min vor einem 4h-Gedächtnis-Test eine 1M Glukose in einem 7%-Agaroseblock angeboten. Diese maximale Agarosekonzentration sollte die Zuckeraufnahme verhindern. Zur Kontrolle bekamen andere Fliegen eine 1M Glukose mit der bisher immer verwendeten Agarosekonzentration von 0.75%. Das Ergebnis zeigte, dass die 1M Glukose das 4h-Gedächtnis unabhängig von den unterschiedlichen Agarosekonzentration, gleich unterdrückte (Abb. 23A). Die Quantifizierung der aufgenommenen Futtermenge ergab aber ebenfalls, dass die verschiedenen Agarosekonzentrationen keinen Einfluss auf die inkorporierte Glukosemenge hatten (Abb. 23B). Deshalb kann aufgrund dieser Versuche keine Aussage über

die Rolle des süßen Geschmacks bei der Unterdrückung der Gedächtnisexpression gemacht werden.

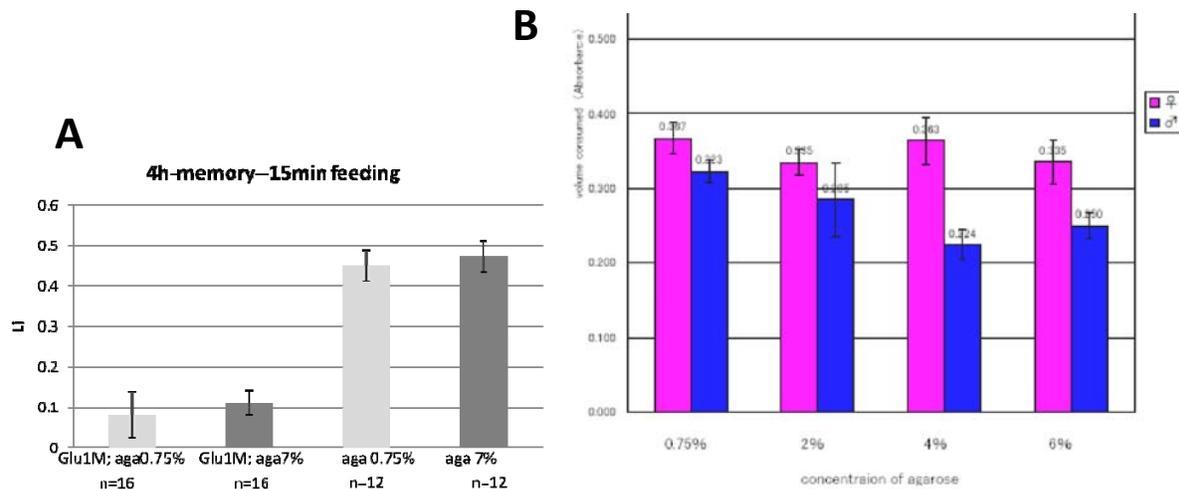


Abb. 23: Wirkung von „harter“ und „weicher“ Glukose auf die Gedächtnisexpression und die aufgenommene Menge. A. Expression des 4h-Gedächtnisses: 1M Glukose im 0.75%-(helle Balken) oder im 7%-Agaroseblock (dunkle Balken) unterdrückte das konditionierte Verhalten vergleichbar. Die Fütterung erfolgte für 15min direkt vor dem Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM von 12-16 Experimenten dargestellt. **B.** Glukoseaufnahme: Die unterschiedlichen Agarosekonzentrationen von 0.75%, 2%, 4% und 6% hatten keinen Einfluss auf die inkorporierte Menge eines 1M Glukosefutters. Alle Fliegen wurden bis zur 15min-Fütterung 20h ohne Futter gehalten. Es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. (Zus. mit T.T./M.F.^{II}), vgl. S. 29

3.2.4.2. Unterdrückung der zucker konditionierten Gedächtnisexpression durch die Osmolarität des aufgenommenen Futters

Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, wurde das zucker konditionierte Verhalten durch Fütterungen ansteigender Arabinose- und Glukosekonzentrationen zunehmend unterdrückt. Da mit den Zuckerkonzentrationen der süße Geschmack korreliert (Abb. 19A), könnte dieser ein Signal darstellen, das die Gedächtnisexpression inhibiert. Um seine Rolle bei der Verhaltenssuppression zu überprüfen, sollte der süße Geschmack von der Konzentration dissoziiert werden. Dazu wurden Fliegen nach einem Futterentzug von 20h trainiert und für 15min vor einem 4h-Gedächtnis-Test entweder mit einer reinen süßen Substanz (0.3M

Glukose) oder mit einer Mischung aus 0.3M Glukose und jeweils einer nicht süßen Substanz (0.3M NaCl, 0.3M KCl, 0.6M Glycin) gefüttert. Ich verwendete 0.3M Glukose, da bei dieser Konzentration nach einer 15min-Fütterung keine Unterdrückung der Gedächtnisexpression zu erwarten war. Durch Zugabe der nicht süßen Substanzen zur Glukose sollte die Konzentration des Futters, aber nicht der süße Geschmack erhöht werden. Elektrophysiologische Messungen bestätigten, dass die Mischungen aus Glukose und einer der nicht süßen Substanzen gleich oder weniger süß als die reine Glukose waren (Abb. 24A). Es stellte sich heraus, dass der schwach supprimierende Effekt der reinen Glukose auf die Expression des 4h-Gedächtnisses durch jede zusätzliche nicht süße Substanz (NaCl, KCl, Glycin) deutlich verstärkt wurde. Das konditionierte Verhalten wurde nur durch die Mischungen vollkommen unterdrückt (Abb. 24B). Das Ergebnis macht deutlich, dass das Ausmaß der Unterdrückung der Gedächtnisexpression mit der Konzentration, aber nicht mit dem süßen Geschmack korreliert. Die chemische Spezifität der Substanzen war nicht relevant für den synergistischen Unterdrückungseffekt auf das konditionierte Verhalten. Deshalb wird geschlossen, dass die Osmolarität der aufgenommenen Substanzen ein entscheidender Faktor zur Unterdrückung des zucker konditionierten Gedächtnisses ist. Da die Substanzen nur zusammen mit Glukose inkorporiert wurden, kann angenommen werden, dass der süße Geschmack als notwendige Stimulation für die Futteraufnahme fungiert (Abb. 24A,C). Ohne Glukose wurden NaCl, KCl und Glycin nicht aufgenommen (Abb. 24C) und hatten keine supprimierende Wirkung auf die Gedächtnisexpression (Abb. 24B). Dies deutet darauf hin, dass die Detektion der Osmolarität nicht peripher, wie z.B. an den Tarsen, sondern im Körperinneren stattfindet. Dafür kommen der Verdauungstrakt und/oder die Hämolymphe in Frage. In diesem Versuch wird außerdem bestätigt, dass die Menge des aufgenommenen Futters und die Suppression des zucker konditionierten Verhaltens nicht miteinander korrelieren (Abb. 24B, C).

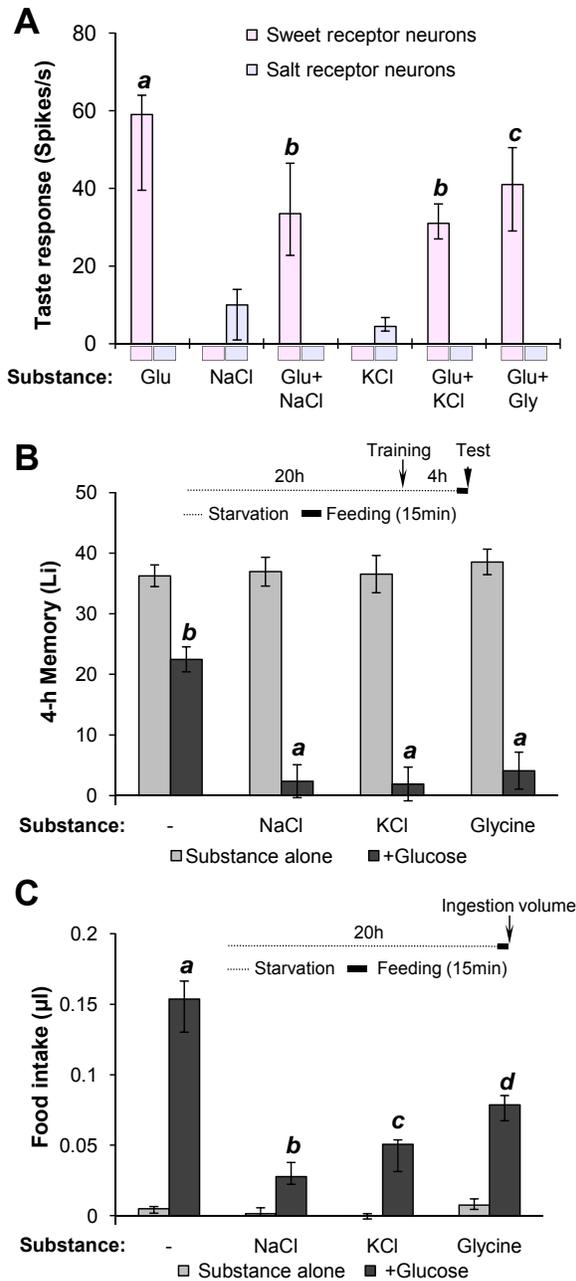


Fig. 24: Dissoziation des süßen Geschmacks von der Osmolarität. A.

Elektrophysiologische Messungen der Süß- (rosa) und Salzneuronen (blau) an den Sensillen des Labellums. Die Spikefrequenz der Süß-Neurone war bei 0.3M Glukose größer bzw. gleich wie bei den Mischungen aus 0.3M Glukose mit 0.3M NaCl, 0.3M KCl bzw. 0.6M Glycin. Die mit **a** gekennzeichnete Gruppe unterscheidet sich signifikant von mit **b** ($p < 0.05$), aber nicht von mit **c** markierten Gruppen ($p > 0.05$). Es sind die Mediane \pm Quartile angegeben. $N=12-30$. (Zus. mit T.T./M.F.¹⁾, vgl. S. 29

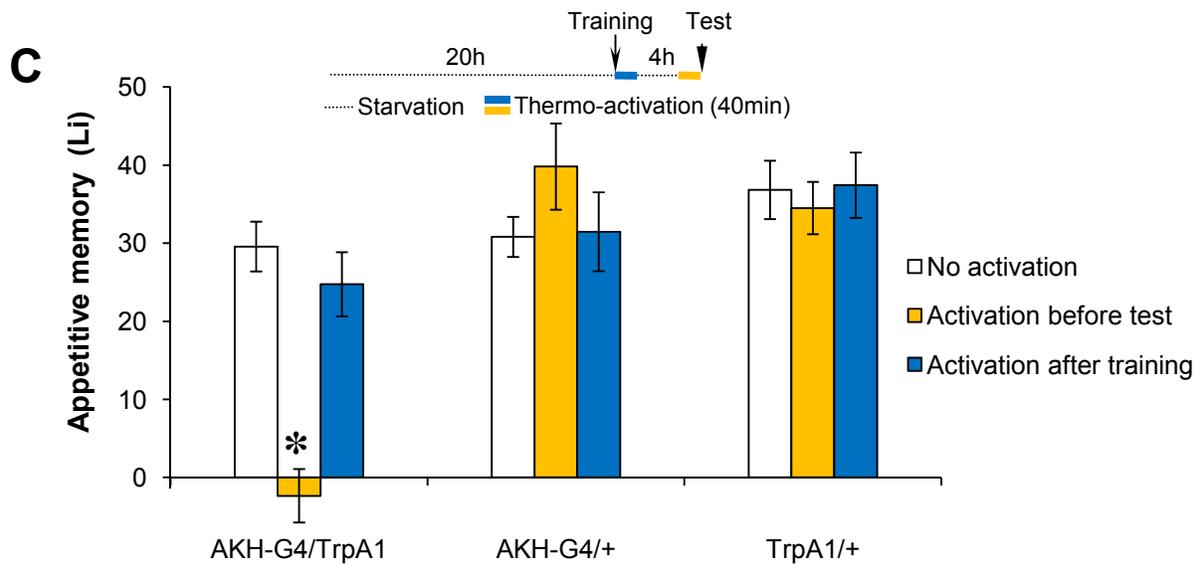
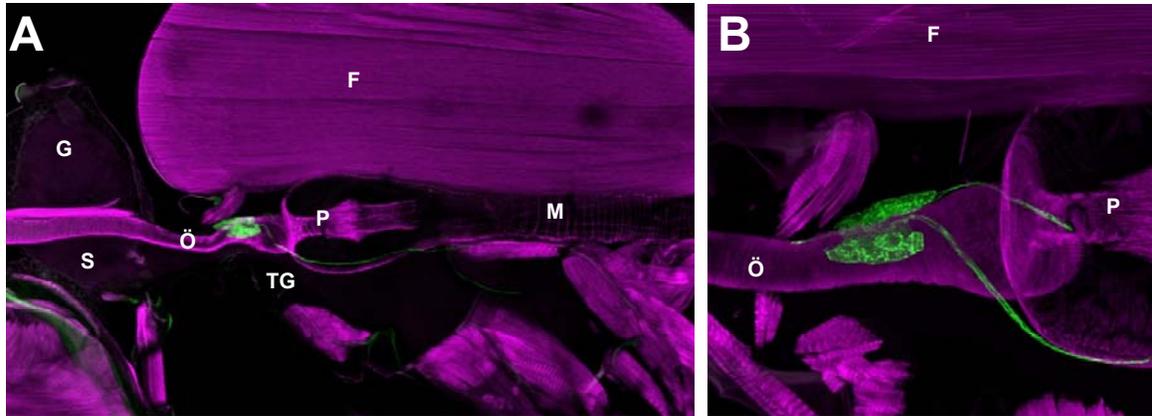
B. Osmolaritätseffekt auf die Expression des zuckerconditionierten 4h-Gedächtnisses. Zugabe von NaCl, KCl oder Glycin zur Glukose unterdrückte das konditionierte Verhalten vollständig. Die Konzentrationen sind gleich wie in **A**. Die 15min-Fütterungen waren direkt vor dem Test. Mit **a** gekennzeichnete Gruppen (Glukosemischungen) unterscheiden sich signifikant ($p < 0.001$) von allen anderen und weisen kein signifikantes Gedächtnis auf ($p > 0.05$). Die mit **b** markierte Gruppe (Glukose) unterscheidet sich von allen anderen signifikant ($p < 0.01$). Es sind die Mittelwerte \pm

SEM von 19-43 Experimenten dargestellt. **C.** Inkorporation der oben beschriebenen Substanzen. Die Aufnahme der Mischungen aus Glukose und NaCl, KCl oder Glycin war gleich oder geringer als die der reinen Glukose. Konzentrationen und Fütterungsdauer sind gleich wie in **B**. Die mit **a** gekennzeichnete Gruppe unterscheidet sich signifikant von mit **b** ($p < 0.01$) und **c** ($p < 0.05$), aber nicht von mit **d** markierten Gruppen ($p > 0.05$). Die Datenpunkte repräsentieren die Mediane \pm Quartile von 11-12 Experimenten. (Zus. mit T.T./M.F.¹⁾, vgl. S. 29.

3.3. Thermostimulation AKH-erger Zellen

Um herauszufinden, ob Hämolymphsignale wie die Osmolarität an der Suppression des zucker konditionierten Verhaltens beteiligt sind, versuchte ich die Konzentrationen von Hauptnährstoffen des Bluts zwischen Training und Test künstlich zu erhöhen. Dass eine Erhöhung der Hämolympheosmolarität bei Insekten die Fressbereitschaft unterdrücken kann, wurde durch Injektionsexperimente bei *Locusta* nahegelegt (Bernays and Chapman 1974; Abisgold and Simpson 1987; Simpson and Bernays 1983; Simpson and Raubenheimer 1993). Für die homeostatische Regulation der Lipid- und Zuckerspiegel in der Hämolymphe sind bei *Drosophila* neurosekretorische Zellen und die Corpora cardiaca der Ringdrüse verantwortlich (Kim and Rulifson 2004, Rulifson et al. 2002). Bei Bedarf werden diese im Fettkörper gespeicherten Nährstoffe durch das AKH mobilisiert und in die Hämolymphe freigegeben (Lee and Park 2004; Isabel et al. 2005). AKH wird ausschließlich in einem Teil der Corpora cardiaca exprimiert und bei sinkendem Blutzuckerspiegel ausgeschüttet (Lee and Park 2004; Kim and Rulifson 2004; Isabel et al. 2005; Predel et al. 2004; Wegener et al. 2006). Um ohne eine Fütterung eine vorübergehende Erhöhung der Trehalose- und Lipidkonzentrationen und damit wahrscheinlich des osmotischen Drucks in der Hämolymphe zu erreichen, wurden AKH-produzierende Zellen (Abb. 25A, B) durch einen 40min-„Hitzeimpuls“ stimuliert. Diese artifizielle Stimulation wurde durch eine *AKH-Gal4* (Lee and Park 2004) getriebene Expression des temperatursensitiven Kationenkanals *dTrpA1* ermöglicht (Hamada et al. 2008). Bei 20h nicht gefütterten und anschließend mit Zucker konditionierten Fliegen wurde ein 4h-Gedächtnis getestet. Ein 40min-„Hitzeimpuls“ direkt vor dem Test unterdrückte die Gedächtnisexpression vollständig (Abb. 25C), trotz fehlender Fütterung. Die Inhibition der Gedächtnisexpression war nur vorübergehend, da der gleiche „Hitzeimpuls“ direkt nach dem Training keine Wirkung auf das konditionierte Verhalten hatte (Abb. 25C). Wurden Fliegen für 20h nicht gefüttert und anschließend im Training mit einem Elektroschock bestraft, hatte die gleiche Hitzebehandlung direkt vor dem Test keinen Effekt auf ein 3h-Gedächtnis (Abb. 25D). Das bedeutet, dass die Stimulierung der AKH-produzierenden Zellen weder die generelle Duftwahrnehmung noch die Bewegungsfähigkeit signifikant beeinträchtigen. Erstaunlicherweise wurde durch den 40min-„Hitzeimpuls“ ein nachfolgend getestetes Zuckerpräferenzverhalten nicht verändert (Abb. 25E). Das deutet daraufhin, dass die Thermostimulationen der AKH-erger Neurone nur die zucker konditionierte Reaktion auf den konditionierten Duftreiz, nicht aber einfache, erfahrungsunabhängige Reaktionen auf einen Zuckerreiz beeinflussen. Zusammenfassend wird gefolgert, dass die künstliche Stimulation AKH-produzierender Neurone das

zuckerconditionierte Verhalten spezifisch, temporär und reversibel unterdrückt. Ich nehme an, dass das Unterdrückungssignal durch einen AKH-induzierten Anstieg der Trehalose- und/oder Lipidkonzentrationen und damit wahrscheinlich von der Osmolarität der Hämolymphe verursacht wird.



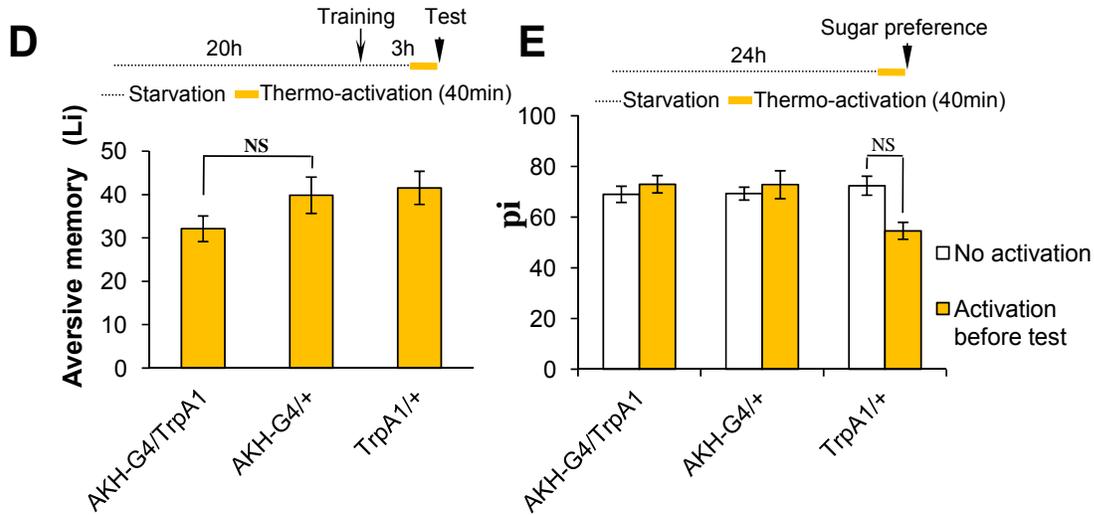


Abb. 25: Auswirkung der Thermostimulation AKH-produzierender Zellen auf die Zuckerpräferenz und das konditionierte Verhalten. **A.** und **B.:** AKHerge Neurone der Corpora cardiaca. AKH-produzierende Zellen (grün) sind dem Verdauungstrakt benachbart (violett). G, Gehirn; S, Subösophagialganglion; Ö, Ösophagus; P, Proventriculus; M, Mitteldarm; TG, Thoracalganglion; F, Flugmuskel. (Zus. mit I.S.^{IV})¹, vgl. S. 29 **C.** Zuckerkonditioniertes 4h-Gedächtnis: Fliegen, die den thermosensitiven Kanal TRPA1 in AKHergen Zellen exprimierten (*AKH-Gal4* x *UAS-dTripA1*), zeigten keine Gedächtnisexpression, wenn die 40min-Hitzestimulation direkt vor dem Test erfolgte (orange). Die gleiche Hitzebehandlung unmittelbar nach dem Training (blau) oder die Abwesenheit einer Thermostimulierung verursachten keinen Unterdrückungseffekt. Der Stern kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0.001$) zu allen anderen Gruppen. Es sind die Mittelwerte \pm SEM von 8-14 Experimenten dargestellt. **D.** Aversives 3h-Gedächtnis: Die 40min-Thermostimulation AKHeger Neurone vor dem Test hatte keinen Einfluss auf die Expression eines elektroshockkonditionierten Verhaltens. NS bedeutet nicht signifikant. Es sind die Mittelwerte \pm SEM von 15-16 Experimenten dargestellt. (Zus. mit S.K.^I)¹, vgl. S. 29 **E.** Zuckerpräferenz: Fliegen, die TRPA1 in AKHergen Zellen exprimierten (*AKH-Gal4* x *UAS-dTripA1*), zeigten nach 40min-Hitzestimulation direkt vor dem Test kein von den Kontrollgruppen abweichendes Präferenzverhalten. NS bedeutet nicht signifikant. Es sind die Mittelwerte \pm SEM von 8 Experimenten dargestellt. (Zus. mit S.K.^I)¹, vgl. S. 29

4. Diskussion

4.1. Einfluss des Futterentzugs auf das zuckerconditionierte Lernen und Gedächtnis

In Übereinstimmung mit anderen Autoren zeigen meine Versuche, dass der Futterentzug notwendig für die Expression des zuckerconditionierten Gedächtnisses im Test ist und dass Fütterungen nach der Konditionierung die Bereitschaft zum Zeigen des Verhaltens vorübergehend unterdrücken (Abb. 10, 11; Tempel et al. 1983; Gruber 2006; Krashes et al. 2008). Ich konnte darüberhinaus demonstrieren, dass bereits Fütterungen von wenigen Minuten direkt vor dem Test die Expression des zuckerconditionierten Verhaltens unterdrücken (Abb. 13).

Da Fütterungen von 1min einen gedächtnisunterdrückenden Effekt hatten (Abb. 13), wohingegen die 2min-Präsentation des Zucker-US' während des Trainings offensichtlich keine supprimierende Wirkung auf die Gedächtnisexpression hat, ist anzunehmen, dass der getrocknet auf Filterpapier angebotene Saccharose-US nicht inkorporiert wird. Futteraufnahmeexperimente von wenigen Minuten mit auf Filterpapier getrockneten Zuckern scheinen diese Annahme zu bestätigen (persönliche Mitteilung Prof. Tanimura).

Außerdem habe ich nachgewiesen, dass ein Futterentzug bis zum Training notwendig für den Gedächtnisaufbau ist (Abb. 11). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der Zucker generell keine belohnende Bedeutung für gefütterte Fliegen hat, was durch das Fehlen einer erfahrungsunabhängigen Zuckerpräferenz ohne Futterentzug unterstützt wird (Abb. 12).

4.2. Wie wurde die Expression des zuckerconditionierten Gedächtnisses unterdrückt ?

4.2.1. Osmolarität des aufgenommenen Futters

Weder ein Anstieg der internen Glukosekonzentration (Abb. 17, 18), noch die „ernährende“ Eigenschaft des Futters (Abb. 19, 20) oder Unterschiede in der aufgenommenen Futtermenge (Abb. 20, 22) waren notwendig um das zuckerconditionierte Verhalten zu unterdrücken. Es wurde gezeigt, dass der Suppressionsgrad des zuckerconditionierten Verhaltens der Konzentration der Substanzen folgte (Abb. 20) und nicht mit der Stärke des süßen Geschmacks korrelierte (Abb. 24). Da die chemische Spezifität der Substanzen keine Rolle für den Unterdrückungseffekt spielte (Abb. 24), wird geschlossen, dass die Osmolarität des aufgenommenen Futters ein entscheidender Faktor bei der Regulation des zuckerconditionierten Verhaltens ist.

4.2.2. Thermostimulation AKH-produzierender Zellen

Nicht nur Fütterungen, sondern auch die Thermostimulation AKHerger Zellen bei transgenen Fliegen (*AKH-Gal4* x *UAS-TrpA1*) direkt vor dem Test führten zur Unterdrückung des zuckerconditionierten Verhaltens (Abb. 25C).

4.2.2.1. Regulation AKH-produzierender Neurone

Expression und Synthese des AKHs wurden bei larvalen und adulten Fliegen (*Drosophila melanogaster*) ausschließlich in ca. 14 Zellen lokalisiert, die als Drüsenlappen („glandular lobes“) den Hauptteil der paarigen Corpora cardiaca bilden (Lee and Park 2004; Kim and Rulifson 2004; Isabel et al. 2005; Predel et al. 2004; Wegener et al. 2006). Die AKH-Ausschüttung wird normalerweise durch Absinken der extrazellulären Glukose- oder Trehalosekonzentration induziert, was bei Futterentzug oder z.B. bei längeren Flugaktivitäten erfolgt. Da die Zellen der Corpora cardiaca bei *Drosophila* das Enzym Trehalase exprimieren, könnte die Regulation der Aktivität AKHerger Neurone durch Glukose, dem enzymatischen

Spaltprodukt der Trehalose, erfolgen (Kim and Rulifson 2004). Wie die vom Glukosespiegel des Blutes regulierten endokrinen Zellen des Pankreas und Neurone im Hypothalamus bei Säugern (Marty et al. 2007), werden auch in AKH-produzierenden Neuronen ATP-sensitive Kalium-Kanäle exprimiert. Diese Kanäle dienen als intrazelluläre Energiesensoren, da ihr Öffnen und Schließen vom ATP/ADP-Verhältnis abhängt. Dadurch wird das Membranpotential und letztlich die Ausschüttung des Hormons beeinflusst (Kim and Rulifson 2004).

4.2.2.2. Wie unterdrückt die Thermostimulation AKH-produzierender Neurone die Expression des zuckerconditionierten Verhaltens ?

Wie sich herausstellte, führt eine 40-min Hitzestimulation AKHerger Neurone, die den thermosensitiven Kanal TRPA1 (Hamada et al. 2008) exprimieren, zur Unterdrückung des zuckerconditionierten Verhaltens (Abb. 25C). Als Ursache dafür schlage ich einen durch die Thermostimulation AKHerger Zellen bedingten Anstieg der Trehalose- und Lipidkonzentration in der Hämolymphe vor. Dabei könnte die Erhöhung des Trehalose- und/oder des Lipid- oder des Osmolaritätsspiegels das gedächtnisunterdrückende Signal darstellen. Die letzte Möglichkeit ist deshalb wahrscheinlich, da insbesondere die Trehalose als Hauptblutzucker der Insekten einen signifikanten Beitrag zur Gesamtosmolarität der Hämolymphe liefern könnte (Gelperin 1971a; Van der Horst et al. 1980; Elbein et al. 2003). Dass die Aktivität AKH-produzierender Neurone einen Konzentrationsanstieg der Trehalose und/oder der Lipide im Blut verursacht, wurde bei einer Reihe von Insekten nachgewiesen (Steele 1961,1963; Friedman 1967; Goldsworthy and Coupland 1974; Loughton and Orchard 1981; Moreau 1982). Bei Locusten bewirkte beispielsweise die Injektion eines Extrakts der Drüsenlappen („glandular lobes“) der Corpora cardiaca in die Hämolymphe einen Anstieg der Zucker- und Lipidkonzentrationen. Bei *Drosophila* wurde nach Apoptose der AKHerger Zellen eine drastisch reduzierte Trehalosekonzentration in der Hämolymphe festgestellt (Lee and Park 2004; Isabel et al. 2005). Eine ektopische Expression von AKH im Fettkörper bewirkte einen signifikanten Anstieg der Trehalose- und Lipidkonzentrationen in der Hämolymphe (Lee and Park 2004). Die Wirkung der ektopischen AKH-Expression macht auch deutlich, dass die Konzentrationserhöhungen in der Hämolymphe auf AKH und nicht auf mögliche koexprimierte Hormone oder Transmitter zurückzuführen sind. Wie massenspektrometrische Untersuchungen ergaben, wird AKH wahrscheinlich als einziges Neuropeptid im Drüsenlappen der Corpora cardiaca exprimiert (Predel et al. 2004; Wegener et al. 2006; persönliche Mitteilung Dr. Christian Wegener). Daher

kann angenommen werden, dass der Suppressionseffekt auf die Gedächtnisexpression durch künstliche Stimulation AKHerger Zellen auf die indirekte Wirkung von AKH und nicht auf die anderer Neuropeptide zurückzuführen ist. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass das konditionierte Verhalten unabhängig vom Anstieg der Blutkonzentrationen durch eine direkte neuronale Aktivität AKH-produzierender Neurone unterdrückt wird. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die Aktivität der AKHerger Zellen im Wild typ durch Futterentzug stimuliert wird und daher mit dem Anstieg der Bereitschaft zur Gedächtnisexpression und des Fressverhaltens kovariert. Dass die Aktivität AKH-produzierender Zellen offensichtlich nicht mit der Inhibition, sondern mit der Aktivierung der Fressbereitschaft assoziiert ist, wurde aus Versuchen mit Fliegen, deren AKHerger Neurone ausgeschaltet wurden, geschlossen (Lee and Park 2004; Isabel et al. 2005). Diesen Fliegen fehlte die für den Wildtyp typische, mit zunehmendem Futterentzug ansteigende, lokomotorische Aktivität. Zusammenfassend wird daher angenommen, dass die Unterdrückung des zucker konditionierten Verhaltens durch einen Anstieg der Trehalose- und/oder Lipidkonzentrationen oder der daraus resultierenden Osmolarität der Hämolymphe verursacht wird, welche durch die Hitzestimulation AKHerger Neurone bewirkt wird bzw. werden.

4.3. Lokalisierung der gedächtnisunterdrückenden Signale

4.3.1. AKH-Versuch

Die Fliegen wurden bis zur Hitzebehandlung und bis zum Test nicht gefüttert (Abb. 25C). Das macht deutlich, dass weder ein Anstieg der Osmolarität oder der Futtermenge im Verdauungstrakt noch eine Aktivierung der Geschmacksrezeptoren notwendig für eine Unterdrückung der Gedächtnisexpression sind. Folglich kann angenommen werden, dass die Detektion der Osmolarität bzw. der Trehalose- und/oder Lipidkonzentrationen in der Hämolymphe stattfindet.

4.3.2. Fütterungsversuche

Es wird angenommen, dass die Unterdrückung des konditionierten Verhaltens durch die Osmolarität des aufgenommenen Futters verursacht wird. KCl, NaCl und Glycin hatten nur einen Suppressionseffekt auf die Gedächtnisexpression, wenn sie zusammen mit Glukose aufgenommen wurden. Als jeweils pure Substanz wurden sie nicht inkorporiert und hatten dann auch keinen Einfluss auf die Gedächtnisausprägung (Abb. 24). Deshalb wird geschlossen, dass die Detektion der Osmolarität prinzipiell im Körper und nicht peripher wie z.B. an den Tarsen erfolgt. Eine solche Detektion könnte im Verdauungstrakt oder in der Hämolymphe stattfinden. Wie schnell die Aufnahme von Zuckern in das Blut erfolgt, wurde an bis zur Flugunfähigkeit erschöpften Fliegen gezeigt. Es genügte eine Glukosefütterung von 30s, damit die Tiere wieder fliegen konnten (Wigglesworth 1949; vgl. Abb. 14). Gleiche Arabinose- und Glukosekonzentrationen hatten eine vergleichbar supprimierende Wirkung auf die Gedächtnisexpression (Abb. 20). Aber es wurde bei jeweils gleicher Konzentration deutlich mehr Glukose als Arabinose aufgenommen (Abb. 22). Daher könnte vermutet werden, dass bei gleicher Konzentration jeweils mehr Glucose als Arabinose von der Hämolymphe absorbiert wird. Dies würde den Schluss zulassen, dass die Detektion der Osmolarität nicht im Blut, sondern im Verdauungstrakt stattfindet. Andererseits könnte die Hämolympheabsorption von der Konzentration bzw. Osmolarität der Zucker und nicht von deren Mengenunterschieden im Verdauungstrakt abhängen. Beispielsweise wurde bei Schaben (*Periplaneta americana*) gefunden, dass die Kropfentleerungsrate in den Darm von der Osmolarität des Kropfinhalts abhängt (Treherne 1957). Unter dieser Voraussetzung könnte die Detektion der Osmolarität im Verdauungstrakt und/oder in der Hämolymphe erfolgen. Eine Messung der Zuckerkonzentrationen bzw. der Osmolarität in der Hämolymphe nach einer Arabinose- und Glukosefütterung könnte mehr Klarheit bringen.

4.3.3. Eine mögliche Osmolaritätsdetektion im Verdauungskanal und/oder im Blut

Die Unterdrückung der Gedächtnisexpression sowohl durch Aufnahme chemisch unterschiedlicher Substanzen als auch durch Hitzestimulierung AKHerger Neurone könnte durch einen Anstieg der Hämolympheosmolarität erklärt werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Verhaltensinhibition bei den Fütterungen und bei der Thermostimulation AKH-produzierender Zellen jeweils in unterschiedlichen Körperkompartimenten induziert wird. Die unterdrückende Wirkung der Futteraufnahme könnte auf einen Osmolaritätsanstieg des Inhalts

des Verdauungskanals zurückgeführt werden. Die Verhaltenssuppression im AKH-Versuch wird wahrscheinlich durch ein Signal der Hämolymphe verursacht. Kürzlich wurden Neurone gefunden, deren Zellkörper sich in der Hämolymphe befinden und deren Fortsätze direkten Kontakt mit dem Inhalt des Verdauungskanals haben könnten (Abb. 26). Diese Zellen könnten an einer Detektion der Osmolarität des aufgenommenen Futters und/oder des Bluts beteiligt sein (Abb. 28).

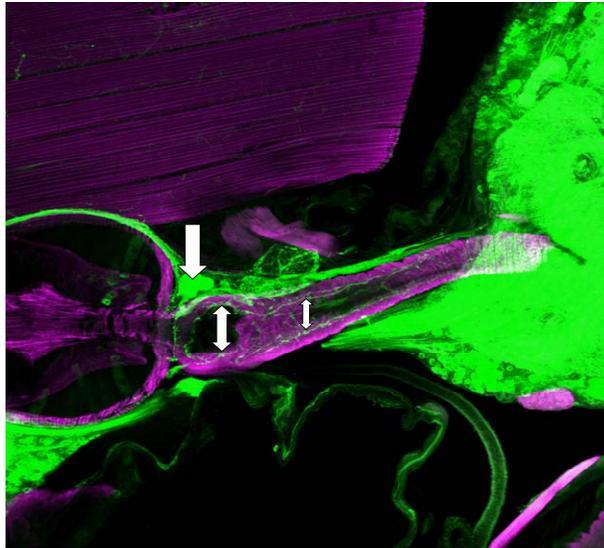


Abb. 26: Mutmaßliche Osmolaritätsrezeptorneurone. Die Zellkörper (grün, Pfeil) könnten mit der Hämolymphe und die Zellfortsätze (grün, Doppelpfeile) mit dem Lumen des Verdauungstrakts (violett) im Kontakt stehen. (Zus. mit I.S.^{IV})¹, vgl. S. 29

Generell scheint die Hämolymphe als physiologisches Korrelat zum Futterentzug gut geeignet zu sein. Sie absorbiert Futterbestandteile aus dem Verdauungskanal und Nährstoffe durch metabolische Aktivitäten vom Fettkörper und anderen Geweben (Simpson and Raubenheimer 1993). Qualität und Menge des gegenwärtig und in der Vergangenheit aufgenommenen Futters, sowie die metabolische Aktivität bestimmter Gewebe spiegeln sich daher in der Zusammensetzung des Bluts wider und bilden den aktuellen Fütterungszustand ab (Abisgold und Simpson 1987; Simpson and Raubenheimer 1993). Da die Blutosmolarität aus der Kombination aller gelöster (Nähr-)Stoffe resultiert, könnte sie ein grober Indikator für den Fütterungszustand sein (Simpson and Raubenheimer 1993). Auch der Inhalt des Verdauungskanals könnte den aktuellen Fütterungszustand wiedergeben. Die Osmolarität des kürzlich aufgenommenen Futters könnte ein grober Indikator für dessen Nährwert sein. Fluktuationen in der externen Futterverfügbarkeit könnten daher mit Schwankungen der

Osmolarität des Inhalts des Verdauungstrakts und/oder des Bluts korrelieren, welche als verhaltensmodulierende Signale dienen könnten.

4.4. Sättigungssignale im Tierreich

4.4.1. Hämolyphosmolarität als inhibitorisches Signal

Ein Einfluss der Osmolarität auf das Verhalten wurde auch bei Heuschrecken gefunden (Bernays and Chapman 1974; Abisgold and Simpson 1987; Simpson and Bernays 1983; Simpson and Raubenheimer 1993). Aus Experimenten mit *Locusta migratoria* wurde gefolgert, dass Injektionen von z.B. Trehalose, NaCl oder Glycin ins Blut die anschließende Futteraufnahme reduzieren (Bernays and Chapman 1974). Wie im AKH-Versuch (Abb. 25) wurden die Tiere so lange ohne Futter gehalten, dass der Verdauungstrakt zur Zeit der Manipulation der Hämolymphe und des anschließenden Tests entleert war. Die injizierten Substanzen hatten unabhängig von ihrer chemischen Spezifität alle die gleiche Suppressionswirkung. Daraus wurde geschlossen, dass eine Erhöhung der Osmolarität in der Hämolymphe eine Suppression der Futteraufnahme bewirkt. Anders als in den Fütterungsexperimenten, in denen z.B. Fütterungen von wenigen Minuten ein 4h-Gedächtnis vollständig unterdrückten (Abb. 13), hatten Injektionen direkt vor oder während der Testfütterung bei *Locusta* kaum bzw. keinen Einfluss auf die Fressbereitschaft. Die größte unterdrückende Wirkung hatten Injektionen, die 20min vor einer Grasfütterung verabreicht wurden. Die Frage wie das Blutsignal zur Verhaltensänderung führt, blieb von den Autoren unbeantwortet. Die Osmolarität der Hämolymphe könnte direkt die Aktivität von Neuronen regulieren, die futterbezogene Verhaltensweisen beeinflussen. So wird beispielsweise bei Schnecken (*Limax maximus*) die Aktivität von Neuronen des motorischen Fressprogramms („feeding motor programme“) im zentralen Nervensystem direkt von einem Anstieg der Osmolarität der Hämolymphe inhibiert (Phifer and Prior 1985).

4.4.2. Verhaltenssuppression durch mutmaßliche Dehnungsrezeptorneurone

Bei *Phormia regina* wurden zwei Populationen mutmaßlicher Dehnungsrezeptorneurone identifiziert, die entweder an einer RN-Abzweigung oder an MAN-Verzweigungen liegen und mit dem Vorderdarm bzw. dem Kropf assoziiert sind. Die Aktivität dieser Neurone hängt offenbar von der Peristaltik und dem Volumen des Verdauungskanal ab (Gelperin 1967; 1971b). Verhaltensexperimente zeigten, dass nicht nur die aufgenommene Futtermengen, sondern auch die inkorporierten Zuckerkonzentrationen mit der Unterdrückung der Fressbereitschaft korrelieren (Gelperin 1971a; Edgecomb et al. 1987). Außerdem wurde eine Abhängigkeit der Aktivität mutmaßlicher Dehnungsrezeptorneurone von der Zuckerkonzentration gefunden. So war die RN-Spikefrequenz nach Fütterung mit 1M Saccharose größer als nach Aufnahme von 0.1M (Gelperin 1971a; Gelperin 1972). Um diese Befunde zu erklären, wurde vorgeschlagen, dass die Peristaltik („slug movement“) und das Volumen des Verdauungstrakts, die von Dehnungsrezeptorneuronen detektiert werden, von der Osmolarität des aufgenommenen Futters bzw. der Hämolymphe abhängen (Abb. 27; Gelperin 1971a). Wie bei *Phormia regina* gezeigt wurde, korreliert das Kropfgewicht, als Indikator für dessen Füllung, mit der Konzentration der zuvor angebotenen Zucker (Edgecomb et al. 1987). Bei Schaben (*Periplaneta americana*) bewirkten äquiosmolare Konzentrationen verschiedener Substanzen (Glukose, Sorbose, Glycerol und NaCl) die gleichen Entleerungsraten des Kropfs. Je höher die Osmolarität des Kropfinhalts war, desto langsamer wurde der Kropf entleert (Treherne 1957). Untersuchungen bei *Phormia regina* kamen zum gleichen Ergebnis. Zusätzlich konnte bei ihnen und bei *Locusta migratoria* nachgewiesen werden, dass auch eine Erhöhung der Osmolarität in der Hämolymphe mittels Injektionen die Verlangsamung der Kropfentleerung bewirkt (Gelperin 1966; Bernays 1985). Daher könnten die Dehnungsrezeptorneurone die Blutosmolarität indirekt über die Peristaltik und das Volumen des Verdauungstrakts detektieren (Abb. 27; Gelperin 1971a).

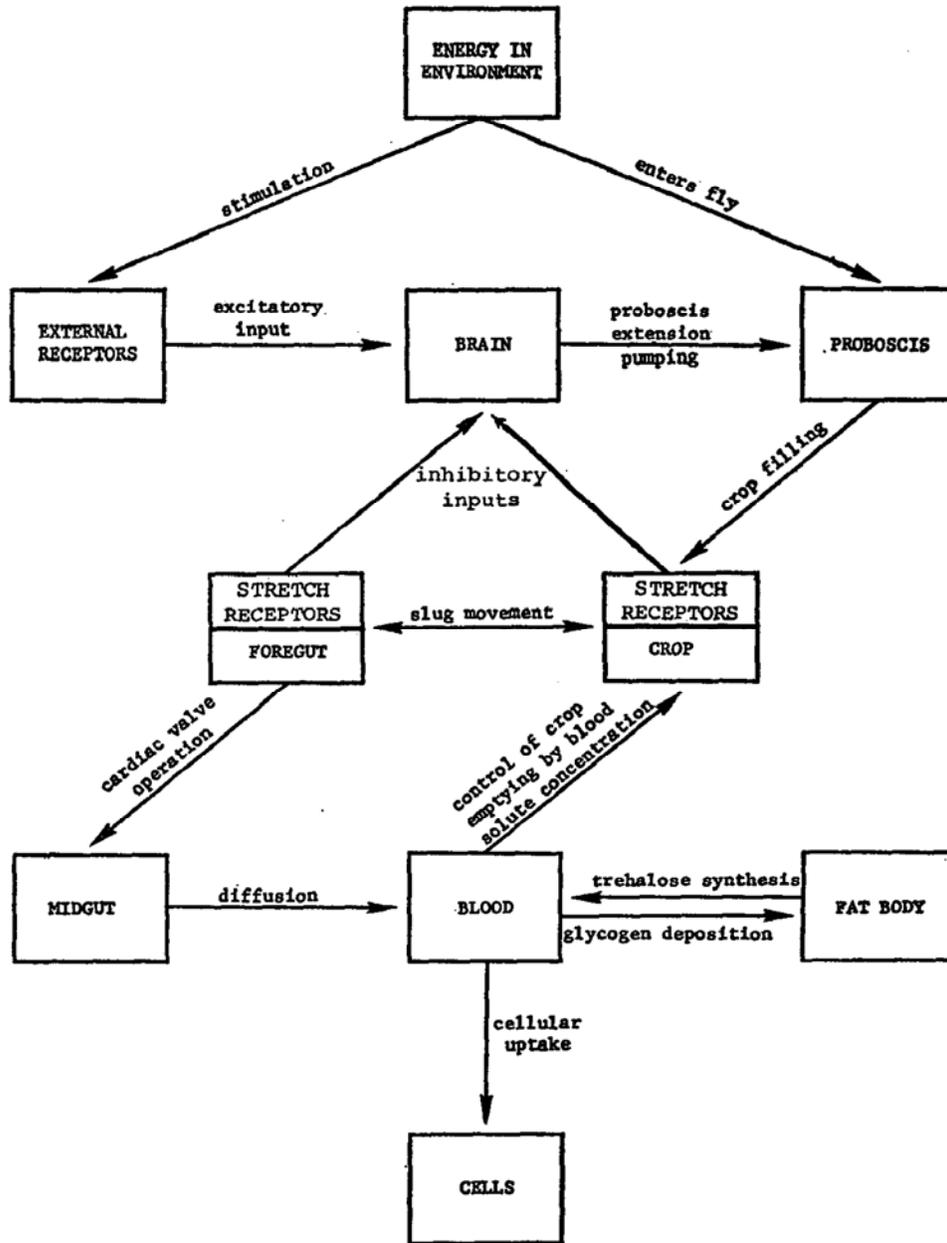


Abb. 27: Diagramm zur Regulation des Metabolismus' und des Fressverhaltens bei der Schmeißfliege. Die Fressbereitschaft ist über die Blutosmolarität mit dem Stoffwechsel verknüpft. Die Blutosmolarität resultiert wahrscheinlich hauptsächlich aus der Konzentration zirkulierender Trehalose, dem Hauptblutzucker der Fliegen (Gelperin 1971a).

Da der beschriebene Mechanismus eine Füllung des Verdauungstrakts voraussetzt, ist er als Ursache für die durch Thermostimulation AKHerger Zellen beobachtete Unterdrückung der

Gedächtnisexpression (Abb. 25C) sehr unwahrscheinlich. Auch die Ergebnisse der Fütterungsversuche zeigen keine Korrelation zwischen aufgenommener Futtermenge und Suppression des zuckerconditionierten Verhaltens (Abb. 20, 22). Dehnungsrezeptorneurone, die Volumenunterschiede des Verdauungstrakts detektieren, können deshalb die Regulation der Gedächtnisexpression nicht erklären. Nur Neurone, die die Osmolarität direkt oder eine von ihr abhängige Peristaltik detektieren, können das zuckerconditionierte Verhalten inhibieren (vgl. 4.3.3.).

4.4.3. Signale der internen Glukose-/Trehalosekonzentrationen und des Ernährungszustands

Bei Säugern spielt der Glukosespiegel des Bluts eine wichtige Rolle bei der Regulation von Stoffwechsel und Fressverhalten (Marty et al. 2007; Havel 2001). Auch bei *Drosophila* und anderen Insekten ist anzunehmen, dass Glukose (bzw. Trehalose) als Signalmolekül für die Regulation des Stoffwechsels und vielleicht des Verhaltens fungiert (Masumura et al. 2000; Amakawa 2001; Kim and Rulifson 2004; Kohyama-Koganeya et al. 2008). Die Inhibition des zuckerconditionierten Verhaltens nach Thermostimulation AKH-produzierender Zellen (Abb. 25) könnte durch einen Anstieg der Glukose-/Trehalosekonzentration im Blut verursacht werden. Das zuckerconditionierte Verhalten wurde aber durch Fütterung des nicht ernährenden Trehalose-VA-Gemischs und der Arabinose ebenso unterdrückt wie durch metabolisierbare Zucker (Abb. 18, 20). Außerdem wurde der Unterdrückungseffekt der Glukose durch Zugabe von Salz verstärkt (Abb. 24). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass ein Anstieg der internen Glukose/Trehalosekonzentrationen und eine Verbesserung des Ernährungszustands vielleicht hinreichend, aber nicht notwendig sind um das zuckerconditionierte Verhalten zu unterdrücken. Dass bei Insekten die internen Glukose/Trehalose-Konzentrationen und der Ernährungsstatus für die Regulation der Futteraufnahme nicht notwendig sein müssen, wurde an einer anderen Fliegenart gezeigt. Ähnlich wie Arabinose für *Drosophila* ist Fukose ein süßer, aber nicht metabolisierbarer Zucker für *Phormia*. Fukose wird von den Fliegen sogar gegenüber einigen ernährenden Zuckern präferiert (Hassett et al. 1950; Dethier et al. 1956) und die Aufnahme wird bis zum „Hungertod“ ebenso reguliert wie die bei metabolisierbaren Zuckern (Gelperin 1971a).

4.4.4. Die Rolle des Geschmacks

Da eine Mischung aus 0.3M Glukose und einer nicht süßen Substanz das konditionierte Verhalten stärker unterdrückte als pure 0.3M Glukose (Abb. 24B), habe ich geschlossen, dass die Wahrnehmung des süßen Geschmacks keinen supprimierenden Einfluss auf die anschließend getestete Gedächtnisexpression hat. Dass das zuckerkonditionierte Verhalten völlig ohne Geschmacksstimuli supprimiert werden kann, wurde durch die Wirkung der Thermostimulation AKH-produzierender Neurone deutlich (Abb. 25C). Generell ist der süße Geschmack bei *Drosophila* wie bei vielen anderen Tieren wichtig für die Initiation des Fressverhaltens (Marella et al. 2006; Abb. 24A, C). Die stimulierende Wirkung des süßen Geschmacks wurde beispielsweise bei Fliegen (*Phormia regina*, *Drosophila melanogaster*) gezeigt. Reizungen der Geschmackssensillen mit Saccharose führten bei Fliegen, die keinem Wasserentzug ausgesetzt waren, dazu, dass sie kurz danach sogar auf Wasserstimuli mit PER's reagierten. Bei Locusten wurde nach einem Kontaktverlust zum Phagostimulans ein kurzfristiger Aktivitätsanstieg beobachtet, der als gesteigerte Futtersuche interpretiert wurde (Duerr and Quinn 1982; Simpson and Bernays 1983; Bernays 1985). Daher wurde für *Phormia* und andere Insekten angenommen, dass der Prozess der Futteraufnahme hauptsächlich ein Resultat aus dem Zusammenspiel einer positiven Rückkopplung durch den Süß-Geschmack und negativer Rückkopplungen durch Signale von z.B. Dehnungs- bzw. mutmaßlichen Osmolaritätsrezeptorneuronen ist (Abb. 4, 27; Gelperin 1971a; Simpson and Bernays 1983). Demnach sind im nicht gefütterten Zustand die inhibitorischen Signale schwächer als stimulierende gustatorische Futterreize und es kommt zur Nahrungsaufnahme. Diese wird beendet, wenn die stimulierende Wirkung gustatorischer Reize durch Adaptation der Rezeptoren und zentralnervöse Habituation abnimmt und wenn gleichzeitig inhibitorische Signale z.B. vom Verdauungstrakt zunehmen (Abb. 4, 27; Dethier and Gelperin 1967; Dethier 1952; Edgecomb et al. 1987; Gelperin 1971a; Simpson and Bernays 1983; Bernays 1985).

4.5. Uneinheitliche Regulation futterbezogener Verhaltensweisen

4.5.1. Wirkung der Thermostimulierung AKHerger Zellen auf das Verhalten

Die Hitzestimulierung AKH-produzierender Zellen führte zur vollständigen Unterdrückung des zuckerkonditionierten Verhaltens, hatte aber keine Auswirkung auf das Zuckerpräferenzverhalten (Abb. 25C, E). Das zuckerkonditionierte Verhalten und die

Zuckerpräferenz werden offensichtlich unterschiedlich reguliert. Die Expressionen verschiedener futterbezogener Verhaltensweisen und Änderungen physiologischer Parameter kovariieren meist mit dem Futterentzug. Es wurde gezeigt, dass bei *Drosophila* z.B. die Futteraufnahme, die PER-Frequenz, die lokomotorische Aktivität, das Präferenzverhalten und die Expression des zuckerconditionierten Verhaltens mit dem Futterentzug zunehmen (Abb. 1, 12; Meunier et al. 2007; Edgecomb et al. 1994; Lee and Park 2004; Isabel et al. 2005; Gruber 2006). Ebenso wurden z.B. ein Anstieg der Geschmackssensitivität zuckerdetektierender Neurone und die Reduktion der Trehalose- und Lipidkonzentrationen in der Hämolymphe nach längerem Futterentzug nachgewiesen (Meunier et al. 2007). Auf den ersten Blick könnte deshalb vermutet werden, dass diesen Verhaltensweisen und physiologischen Parametern ein für alle gemeinsamer Regulationsmechanismus zu Grunde liegt. Andererseits gibt es Anhaltspunkte, dass vom Futterentzug aktivierte Verhaltensweisen unterschiedlich reguliert werden. Bei *Phormia* ist beispielsweise die Regulation der Futteraufnahme und der PER-Auslöseschwelle pharmakologisch und durch das Durchschneiden von Nerven trennbar. Injektionen von Reserpin und d-Amphetamin erhöhten die Futteraufnahme und die PER-Auslöseschwelle. Injektionen von Fenfluramin bewirkten nur einen Anstieg der PER-Auslöseschwelle, nicht aber eine Erhöhung des aufgenommenen Futtermolumens (Murdock et al. 1985; Long et al. 1986). Die Durchtrennungen des RN und des MAN bewirkten beide Hyperphagie (Dethier and Gelperin 1967; Gelperin 1967; Gelperin 1971b). Die PER-Auslöseschwelle wird aber nur durch Schneiden des RN gesenkt und das auch nur wenn die Stimulation an den Tarsen und nicht am Labellum erfolgte (Edgecomb et al. 1987; Sudlow et al. 1987). Es wäre deshalb möglich, dass die Thermostimulation AKH-erzeugender Zellen ein Signal produziert, welches das zuckerconditionierte Verhalten, nicht aber die Zuckerpräferenz unterdrückt. Kürzlich durchgeführte Versuche zeigen außerdem, dass die Hitzestimulierung AKH-produzierender Neurone die Futteraufnahme inhibiert (persönliche Mitteilung Prof. Tanimura) und daher nicht ausschließlich die Gedächtnisexpression beeinflusst.

Die selektive Inhibition nur einer der beiden Verhaltensweisen könnte aber auch dadurch erklärt werden, dass die Zuckerwahrnehmung durch die AKH-Ausschüttung verstärkt wird. Eine mögliche unterdrückende Wirkung einer erhöhten Blutosmolarität auf das Präferenzverhalten könnte durch einen gleichzeitigen Anstieg der Geschmackssensitivität kompensiert worden sein. Dass AKH an der Modulation der Geschmackssensitivität beteiligt sein könnte, wird deshalb wahrscheinlich, weil AKH-Rezeptoren nicht nur im Fettkörper, sondern auch in gustatorischen Neuronen exprimiert werden, die den süßen Geschmack vermitteln (Bharucha et

al. 2008). Möglicherweise ist aber auch die verhaltensauslösende Schwelle des Zuckerreizes so niedrig, dass, anders als beim konditionierten Duft, der Unterdrückungseffekt einer Thermostimulierung AKH-produzierender Neurone zu schwach ist und keine sichtbare Auswirkung auf das naive Präferenzverhalten hat.

4.5.2. Wirkung der Fütterung und der Hitzestimulation AKHerger Zellen auf das zuckerkonditionierte Verhalten

Nicht nur verschiedene futterbezogene Verhaltensweisen (vgl. 4.5.1.), sondern auch die Expression des zuckerkonditionierten Verhaltens könnten unterschiedlich reguliert werden. Dies kann vermutet werden, wenn man die Fütterungs- und AKH-Versuche vergleicht. Fütterungen vor dem Test unterdrückten das zuckerkonditionierte Verhalten und die Zuckerpräferenz (Abb. 10, 11, 12, 13). Eine Suppression des zuckerkonditionierten Verhaltens wurde schon nach einer Minute festgestellt (Abb. 13). Als ein entscheidender Faktor zur Unterdrückung wurde die Osmolarität des Futters vorgeschlagen, die im Verdauungskanal und/oder im Blut detektiert werden könnte (Abb. 24). Demgegenüber verursachte die Hitzestimulation AKHerger Neurone die Unterdrückung des konditionierten Verhaltens, beeinflusste aber nicht die Expression der Zuckerpräferenz (Abb. 25). Nach der artifiziellen Stimulation der AKHerger Zellen könnten die Osmolarität oder die Konzentrationen spezifischer Moleküle wie z.B. Glukose/Trehalose oder Lipide das verhaltensinhibierende Signal repräsentieren. Dieses ist wahrscheinlich ein Signal des Bluts und nicht des Verdauungskanals. Außerdem bleibt unklar ob das mutmaßliche „Blutsignal“ unmittelbar oder zeitlich verzögert die Verhaltensexpression unterdrückt. Daher könnte angenommen werden, dass die Fütterungen zumindest teilweise andere Signalwege induzieren als die Hitzestimulierung AKHerger Zellen (Abb. 28). Eine unterschiedliche Regulation eines futterbezogenen Verhaltens wurde auch bei Heuschrecken in bezug auf die Futteraufnahme vorgeschlagen (Bernays 1985). Die Fressbereitschaft wird durch Füllung des Verdauungskanals sofort, durch eine künstliche Erhöhung der Blutosmolarität aber zeitlich versetzt inhibiert (vgl. 4.4.1.).

4.6. Motivationsmodell zum zuckerkonditionierten Verhalten

Ob und wie stark ein Verhalten gezeigt wird, kann sehr variieren, auch wenn die Reizsituation konstant bleibt. Verhalten ist außerdem meist zielgerichtet und weist häufig eine kurzzeitige Stabilität bis zum Erreichen des Ziels auf. Schließlich stellt sich oft die Frage, warum eine bestimmte von vielen möglichen Handlungen realisiert wird. Um diese Eigenschaften des Verhaltens verstehen zu können, wurden Motivationskonzepte entwickelt (Berridge 2004). Mit Motivation (lat. *movere* = bewegen) ist meist der Antrieb zu einem bestimmten Verhalten gemeint. Motivation kontrolliert die Aktivierung, Richtung, Zielorientierung, Intensität und Dauer des Verhaltens. Auch die zuckerkonditionierte Gedächtnisexpression weist Eigenschaften eines motivierten Verhaltens auf. So wurde in den von mir durchgeführten Versuchen gezeigt, dass die Expression des zuckerkonditionierten Verhaltens trotz konstanter Reizsituation im Training und im Test sehr variabel sein kann. Ob sich die Fliegen in Richtung des CS+ bewegen, hing von den Fütterungsbedingungen ab. Das Verhalten hat somit eine Zielgerichtetheit und aufgrund der Konditionierung des Duftstimulus mit der Zuckerbelohnung wahrscheinlich auch eine Zielerwartung. Generell wird die Motivation für ein Verhalten durch zahlreiche externe und interne Faktoren beeinflusst. Bei den meisten Motivationskonzepten spielen Änderungen physiologischer Parameter eine wichtige modulierende Rolle für die Expression eines Verhaltens. So wird angenommen, dass mit der Zunahme eines physiologischen Mangels durch Defizitsignale Verhaltensweisen verstärkt werden, die schließlich diesen Mangel beseitigen (Berridge 2004; Berridge and Schulkin 1989). Die Expression des zuckerkonditionierten Gedächtnisses ist vom Futterentzug abhängig und kovariert somit mit physiologischen Parametern, wie z.B. mit Nährstoffkonzentrationen in der Hämolymphe. Es können deshalb Signale postuliert werden, die mit der externen Futterverfügbarkeit und mit internen physiologischen Parametern korrelieren, und die die Expression dieses Verhaltens modulieren. Meine Ergebnisse machen wahrscheinlich, dass die Osmolarität des Inhalts des Verdauungstrakts und/oder der Hämolymphe das zuckerkonditionierte Verhalten unterdrückt. Die Osmolarität, die aus der Gesamtheit aller gelösten (Nähr-) Stoffkonzentrationen im Verdauungskanal und/oder Blut resultiert, könnte den Fütterungszustand grob widerspiegeln (Simpson and Raubenheimer 1993). Es könnte deshalb angenommen werden, dass die Osmolarität des Inhalts des Verdauungstrakts und/oder des Bluts ein internes physiologisches Korrelat zur externen Futterverfügbarkeit darstellt und als verhaltensmodulierendes Signal fungiert. Möglicherweise könnten außerdem Trehalose- und/oder Lipidkonzentrationen im Blut als chemisch spezifische Signale auf das zuckerkonditionierte Verhalten wirken. Wie kürzlich

herausgefunden wurde, stimuliert das dNPF die Expression des zuckerbelohnten Gedächtnisses (Krashes et al. 2009). Dabei wirkt dNPF hemmend auf dopaminerge Neurone, die selbst inhibitorisch den Pilzkörper innervieren. Das zuckerconditionierte Verhalten wird nur dann exprimiert, wenn dNPF bei Futterentzug die Inhibition des Pilzkörperausgangs durch die dopaminergen Zellen unterdrückt (vgl. Abb. 8). Aufgrund der Resultate meiner Arbeit kann vermutet werden, dass die dNPF-Ausschüttung und damit die Kontrolle über die Gedächtnisexpression durch Osmolaritätssignale reguliert werden könnte (Abb. 28).

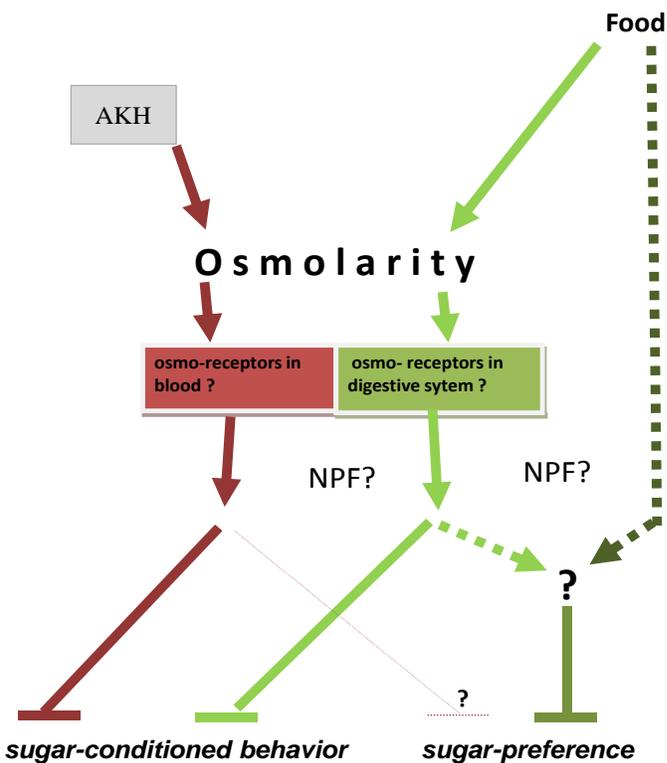


Abb. 28: Modell zur Regulation der Expression des zuckerconditionierten Verhaltens und der Zuckerpräferenz. Die **Futteraufnahme** unterdrückt durch ein Osmolaritätssignal die Expression des zuckerconditionierten Verhaltens („conditioned odor approach“) und durch ein Osmolaritätssignal oder andere Signale die Expression des Zuckerpräferenzverhaltens. Die Osmolaritätsdetektion könnte im Verdauungstrakt und/oder im Blut erfolgen. Die **Thermostimulation AKH-produzierender Neurone** bewirkt die selektive Unterdrückung des zuckerconditionierten Verhaltens durch ein Signal der Trehalose und/oder Lipidkonzentrationen oder der Osmolarität der Hämolymphe. An der Regulation der futterbezogenen Verhaltensweisen könnten Hormone wie das dNPF beteiligt sein.

Generell wird deutlich, dass nicht nur die Bedeutung der Futterreize selbst, sondern auch die eines futterreizassoziierten Stimulus (CS+) durch Signale interner physiologischer Zustände moduliert werden können. Dieses Phänomen wurde auch bei Mäusen nachgewiesen. Dabei wurde ein akustischer CS mit einem NaCl-US bestraft. Nach einem anschließend herbeigeführten physiologischen Salzverlust, wirkte der CS+ nicht als aversiver sondern als appetitiver Reiz (Tindell et al. 2009). Die Bedeutung des CS+ hatte sich in Abhängigkeit vom internen Salzzustand sogar umgekehrt. Dadurch, dass die aktuelle Bedeutung externer Reize durch interne physiologische Zustände moduliert werden kann, tendiert ein Individuum dazu sich in einer gegebenen Umwelt seinen Bedürfnissen entsprechend zu verhalten. Die Verrechnung externer und interner Faktoren führt auf diese Weise zu biologisch sinnvollem Verhalten.

5. Zusammenfassung

In dieser Doktorarbeit habe ich die Regulation der Expression des zuckerbelohnten Verhaltens durch den Fütterungszustand bei *Drosophila melanogaster* untersucht. Die Fliegen können während einer Trainingsphase mit Hilfe einer Zuckerbelohnung auf einen bestimmten Duft konditioniert werden. Nach dem Training können die Fliegen dann auf das olfaktorische Gedächtnis getestet werden. Die Bereitschaft das zuckerkonditionierte Gedächtnis im Test zu zeigen wird vom Fütterungszustand kontrolliert, wie ich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Arbeiten demonstrierte (Tempel et al. 1983; Gruber 2006; Krashes et al. 2008). Nur nicht gefütterte Fliegen exprimieren das Gedächtnis, während Fütterungen bis kurz vor dem Test eine reversibel supprimierende Wirkung haben. Einen ähnlichen regulatorischen Einfluss übt der Futterentzug auch auf die Expression anderer futterbezogener Verhaltensweisen, wie z.B. die naive Zuckerpräferenz, aus.

Nachdem ich den drastischen Einfluss des Fütterungszustands auf die Ausprägung des zuckerkonditionierten Verhaltens gezeigt bzw. bestätigt hatte, habe ich nach verhaltensregulierenden Faktoren gesucht, die bei einer Fütterung die Gedächtnisexpression unterdrücken. Als mögliche Kandidaten untersuchte ich Parameter, die zum Teil bereits bei verschiedenen futterbezogenen Verhaltensweisen unterschiedlicher Tierarten als „Sättigungssignale“ identifiziert worden waren (Marty et al. 2007; Powley and Phillips 2004; Havel 2001; Bernays and Chapman 1974; Simpson and Bernays 1983; Gelperin 1971a). Dabei stellte sich heraus, dass weder die „ernährende“ Eigenschaft des Futters, noch ein durch Futteraufnahme bedingter Anstieg der internen Glukosekonzentration für die Suppression des zuckerkonditionierten Gedächtnisses notwendig sind. Die Unterdrückung der Gedächtnisexpression kann auch nicht durch Unterschiede in den aufgenommenen Futtermengen, die als verhaltensinhibitorische Dehnungssignale des Verdauungstrakts wirken könnten, oder mit der Stärke des süßen Geschmacks erklärt werden. Die Suppression des zuckerbelohnten Verhaltens folgte den Konzentrationen der gefütterten Substanzen und war unabhängig von deren chemischen Spezifität. Deshalb wird die Osmolarität des aufgenommenen Futters als ein entscheidender Faktor für die Unterdrückung der zuckerkonditionierten Gedächtnisexpression angenommen. Weil nur inkorporierte Substanzen einen Unterdrückungseffekt hatten, wird ein osmolaritätsdetektierender Mechanismus im Körper

postuliert, wahrscheinlich im Verdauungstrakt und/oder der Hämolymphe. Die Hämolympfsmolarität ist als „Sättigungssignal“ bei einigen wirbellosen Tieren bereits nachgewiesen worden (Bernays and Chapman 1974; Simpson and Raubenheimer 1993; Gelperin 1971a; Phifer and Prior 1985). Deshalb habe ich mit Hilfe genetischer Methoden und ohne die Fliegen zu füttern, versucht über einen künstlich induzierten Anstieg der Trehalose- und Lipidkonzentrationen die Osmolarität der Hämolymphe in *Drosophila* zu erhöhen. Eine solche konzentrationserhöhende Wirkung für Lipide und die Trehalose, dem Hauptblutzucker der Insekten, ist bereits für das adipokinetische Hormon (AKH), das von Zellen der Corpora cardiaca exprimiert wird, nachgewiesen worden (Kim and Rulifson 2004; Lee and Park 2004; Isabel et al. 2005). Es stellte sich heraus, dass die künstliche Stimulierung AKH-produzierender Neurone das zuckerconditionierte Verhalten temporär, reversible und selektiv unterdrückt. Gleiche Behandlungen hatten keinen Effekt auf ein aversiv konditioniertes olfaktorisches Gedächtnis oder ein naives Zuckerpräferenzverhalten.

Wie aus dieser Arbeit hervorgeht, stellt wahrscheinlich die Osmolarität des Verdauungstrakts und der Hämolymphe oder nur der Hämolymphe ein physiologisches Korrelat zum Fütterungszustand dar und wirkt als unterdrückendes Signal. Dass Fütterungen das zuckerconditionierte Verhalten und die Zuckerpräferenz supprimieren, die künstliche Stimulation AKH-produzierender Zellen aber selektiv nur die zuckerbelohnte Gedächtnisexpression unterdrückt, deutet auf mindestens zwei unterschiedliche „Sättigungssignalwege“ hin. Außerdem macht es deutlich wie uneinheitlich futterbezogene Verhaltensweisen, wie das zuckerbelohnte Verhalten und die naive Zuckerpräferenz, reguliert werden.

6. Summary

In this work I investigated the regulation of the expression of the sugar conditioned behavior by feeding states in *Drosophila melanogaster*. During the training flies are able to associate an odor with a sugar reward. During the test these flies have the opportunity to show their odor memory. In accordance with previous findings (Tempel et al. 1983; Gruber 2006; Krashes et al. 2008), I also showed that the readiness to express sugar conditioned memory is controlled by the feeding state. The memory was only displayed by starved flies, whereas feedings of the flies until the test cause a reversible and temporary suppression of conditioned behavior. Feeding states similarly influence the expression of other food-related behaviors like sugar preference.

After I have showed/confirmed the drastic influence of feeding state on sugar conditioned behavior, I tried to search for factors which suppress the memory expression of conditioned flies during feeding. Therefore I verified physiological parameters as promising candidates which have already been identified as “satiation-signals” for different food-related behaviors through the animal kingdom (Marty et al. 2007; Powley and Phillips 2004; Havel 2001; Bernays and Chapman 1974; Simpson and Bernays 1983; Gelperin 1971a). As the results revealed, neither the nutritional value of the available food nor an increase of the internal glucose-concentrations were necessary for suppressing conditioned behavior. Furthermore differences in sweet taste and in the amount of the ingested food, which likely serve as volumetric signals of the digestive system, were not critical determinants for inhibition of the memory expression. Because suppression followed the concentration of the substances independent of the chemical specificity, I conclude that the osmolarity of the ingested food is a critical factor for inhibition of sugar conditioned behavior. Only ingested substances were suppressive. Therefore an internal osmolarity-detecting mechanism is postulated, most probably in the digestive system or the hemolymph. Hemolymph-osmolarity has already been shown as a “satiation-signal” for some invertebrates (Bernays and Chapman 1974; Simpson and Raubenheimer 1993; Gelperin 1971a; Phifer and Prior 1985). Thus I tried to increase the hemolymph-osmolarity by an artificially induced rise of the concentration of lipids and trehalose, the main blood sugar of insects. A concentration-increasing effect such like this has already been shown for the adipokinetic hormone (AKH), which is expressed in cells of the corpora cardiaca (Kim and Rulifson 2004; Lee and Park 2004; Isabel et al. 2005). I demonstrated that an artificial stimulation of AKH-

producing neurons induces the suppression of sugar conditioned behavior, but leaves aversive conditioned behavior and naïve sugar preference unchanged.

This work indicates that the osmolarity of the digestive system and the hemolymph or only of the hemolymph serves as (a) physiological correlate(s), which signals suppression. Feeding induced inhibition of the expression of sugar conditioned behavior and naïve sugar preference, whereas the artificial stimulation of AKH-producing cells selectively inhibited sugar rewarded memory expression alone. Thus I assume at least two separable “satiation”-pathways. Moreover these results demonstrate the non-uniform regulation of different food-related behaviors like sugar conditioned behavior and naïve sugar preference.

7. Literaturverzeichnis

7.1. Bücher

Ashburner, M. (1989) *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Bernays, E. A. (1985) Regulation of feeding behaviour. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 4 (ed. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert), pp. 1–32. Oxford, New York: Plenum

Dudai, Y. (OXFORD University Press 2002) *Memory from A to Z*

Heldmaier und Neuweiler (Springer 2003) *Vergleichende Tierphysiologie*

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*, 4th Edn. New York, McGraw-Hill, pp. 19–20.

7.2. Diplomarbeit

Gruber, Franz Andreas (2006) *Fütterungsabhängige Regulierung des appetitiven Lernverhaltens bei *Drosophila melanogaster**

7.3. Wissenschaftliche Zeitschriften

Abisgold, J.D., and Simpson, S.J. (1987). THE PHYSIOLOGY OF COMPENSATION BY LOCUSTS FOR CHANGES IN DIETARY-PROTEIN. *Journal of Experimental Biology* 129, 329-346.

Abisgold, J.D., and Simpson, S.J. (1988). THE EFFECT OF DIETARY-PROTEIN LEVELS AND HEMOLYMPH COMPOSITION ON THE SENSITIVITY OF THE MAXILLARY PALP CHEMORECEPTORS OF LOCUSTS. *Journal of Experimental Biology* 135, 215-229.

Amakawa, T. (2001). Effects of age and blood sugar levels on the proboscis extension of the blow fly *Phormia regina*. *J Insect Physiol* 47, 195-203.

Armstrong, J.D., Kaiser, K., Muller, A., Fischbach, K.F., Merchant, N., and Strausfeld, N.J. (1995). FLYBRAIN, AN ONLINE ATLAS AND DATABASE OF THE DROSOPHILA NERVOUS-SYSTEM. *Neuron* 15, 17-20.

Asano, N., Takeuchi, M., Kameda, Y., Matsui, K., and Kono, Y. (1990). TREHALASE INHIBITORS, VALIDOXYLAMINE-A AND RELATED-COMPOUNDS AS INSECTICIDES. *Journal of Antibiotics* 43, 722-726.

Becker, A., Schlöder, P., Steele, J., and Wegener, G. (1996). The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 52, 433-439.

Behmer, S.T., Elias, D.O., and Bernays, E.A. (1999). Post-ingestive feedbacks and associative learning regulate the intake of unsuitable sterols in a generalist grasshopper. *Journal of Experimental Biology* 202, 739-748.

Bernays, E., and Chapman, R. (1974). The effect of haemolymph osmotic pressure on the meal size of nymphs of *Locusta migratoria* L. *J Exp Biol* 61, 473-480.

Berridge, K.C., and Schulkin, J. (1989). PALATABILITY SHIFT OF A SALT-ASSOCIATED INCENTIVE DURING SODIUM DEPLETION. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B-Comparative and Physiological Psychology* 41, 121-138.

Berridge, K. (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav* 81, 179-209.

Bharucha, K., Tarr, P., and Zipursky, S. (2008). A glucagon-like endocrine pathway in *Drosophila* modulates both lipid and carbohydrate homeostasis. *J Exp Biol* 211, 3103-3110.

Broughton, S.J., Piper, M.D.W., Ikeya, T., Bass, T.M., Jacobson, J., Drieger, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D.J., Leivers, S.J., et al. (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3105-3110.

Buch, S., and Pankratz, M. Making metabolic decisions in *Drosophila*. *Fly (Austin)* 3, 74-77.

Cummings, D., and Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117, 13-23.

Davis, R. (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci* 28, 275-302.

Dethier, V.G. (1952). ADAPTATION TO CHEMICAL STIMULATION OF THE TARSAL RECEPTORS OF THE BLOWFLY. *Biological Bulletin* 103, 178-189.

Dethier, V.G., Evans, D.R., and Rhoades, M.V. (1956). SOME FACTORS CONTROLLING THE INGESTION OF CARBOHYDRATES BY THE BLOWFLY. *Biological Bulletin* 111, 204-222.

Dethier, V.G., and Gelperin, A. (1967). HYPERPHAGIA IN BLOWFLY. *Journal of Experimental Biology* 47, 191-&.

Dura, J.M., Preat, T., and Tully, T. (1993). IDENTIFICATION OF LINOTTE, A NEW GENE AFFECTING LEARNING AND MEMORY IN *DROSOPHILA-MELANOGASTER*. *Journal of Neurogenetics* 9, 1-14.

Edgecomb, R.S., Murdock, L.L., Smith, A.B., and Stephen, M.D. (1987). REGULATION OF TARSAL TASTE THRESHOLD IN THE BLOWFLY, *PHORMIA-REGINA*. *Journal of Experimental Biology* 127, 79-94.

Edgecomb, R., Harth, C., and Schneiderman, A. (1994). Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *J Exp Biol* 197, 215-235.

Elbein, A., Pan, Y., Pastuszak, I., and Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13, 17R-27R.

Friedman, S. (1967). CONTROL OF TREHALOSE SYNTHESIS IN BLOWFLY *PHORMIA REGINA* MEIG. *Journal of Insect Physiology* 13, 397-&.

Fujikawa, K., Takahashi, A., Nishimura, A., Itoh, M., Takano-Shimizu, T., and Ozaki, M. (2009). Characteristics of genes up-regulated and down-regulated after 24 h starvation in the head of *Drosophila*. *Gene* 446, 11-17.

- Gao, Q., and Horvath, T. (2007). Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annu Rev Neurosci* 30, 367-398.
- Gelperin, A. (1967). Stretch Receptors in the Foregut of the Blowfly. *Science* 157, 208-210.
- Gelperin, A. (1966). CONTROL OF CROP EMPTYING IN BLOWFLY. *Journal of Insect Physiology* 12, 331-&.
- Gelperin, A. (1971a). REGULATION OF FEEDING. *Annual Review of Entomology* 16, 365-&.
- Gelperin, A. (1971b). ABDOMINAL SENSORY NEURONS PROVIDING NEGATIVE FEEDBACK TO FEEDING BEHAVIOR OF BLOWFLY. *Zeitschrift Fur Vergleichende Physiologie* 72, 17-&.
- Goldswor.Gj, and Coupland, A.J. (1974). INFLUENCE OF CORPORA CARDIACA AND SUBSTRATE AVAILABILITY ON FLIGHT SPEED AND WING BEAT FREQUENCY IN LOCUSTA. *Journal of Comparative Physiology* 89, 359-368.
- Guo, A., Li, L., Xia, S., Feng, C., Wolf, R., and Heisenberg, M. Conditioned visual flight orientation in *Drosophila*: dependence on age, practice, and diet. *Learn Mem* 3, 49-59.
- Hamada, F., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S., Ghezzi, A., Jegla, T., and Garrity, P. (2008). An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* 454, 217-220.
- Hassett, C.C., Dethier, V.G., and Gans, J. (1950). A COMPARISON OF NUTRITIVE VALUES AND TASTE THRESHOLDS OF CARBOHYDRATES FOR THE BLOWFLY. *Biological Bulletin* 99, 446-453.
- Havel, P. (2001). Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 963-977.
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* 4, 266-275.
- Hiroi, M., Marion-Poll, F., and Tanimura, T. (2002). Differentiated response to sugars among labellar chemosensilla in *Drosophila*. *Zoological Science* 19, 1009-1018.

- Hiroi, M., Meunier, N., Marion-Poll, F., and Tanimura, T. (2004). Two antagonistic gustatory receptor neurons responding to sweet-salty and bitter taste in *Drosophila*. *J Neurobiol* 61, 333-342.
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., and Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr Biol* 12, 1293-1300.
- Isabel, G., Martin, J., Chidami, S., Veenstra, J., and Rosay, P. (2005). AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R531-538.
- Jiang, G.Q., and Zhang, B.B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 284, E671-E678.
- Kim, S., and Rulifson, E. (2004). Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells. *Nature* 431, 316-320.
- Kim, Y., Lee, H., and Han, K. (2007). Classical reward conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Genes Brain Behav* 6, 201-207.
- Kohyama-Koganeya, A., Kim, Y., Miura, M., and Hirabayashi, Y. (2008). A *Drosophila* orphan G protein-coupled receptor BOSS functions as a glucose-responding receptor: loss of boss causes abnormal energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15328-15333.
- Krashes, M., DasGupta, S., Vreede, A., White, B., Armstrong, J., and Waddell, S. (2009). A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell* 139, 416-427.
- Krashes, M., and Waddell, S. (2008). Rapid consolidation to a radish and protein synthesis-dependent long-term memory after single-session appetitive olfactory conditioning in *Drosophila*. *J Neurosci* 28, 3103-3113.
- Lee, G., and Park, J. (2004). Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311-323.
- Leopold, P., and Perrimon, N. (2007). *Drosophila* and the genetics of the internal milieu. *Nature* 450, 186-188.

- Long, T.F., Edgecomb, R.S., and Murdock, L.L. (1986). EFFECTS OF SUBSTITUTED PHENYLETHYLAMINES ON BLOWFLY FEEDING-BEHAVIOR. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 83, 201-209.
- Lorenz, M.W., and Gade, G. (2009). Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. *Integrative and Comparative Biology* 49, 380-392.
- Loughton, B.G., and Orchard, I. (1981). THE NATURE OF THE HYPERGLYCEMIC FACTOR FROM THE GLANDULAR LOBE OF THE CORPUS CARDIACUM OF LOCUSTA-MIGRATORIA. *Journal of Insect Physiology* 27, 383-385.
- Luquet, S., Perez, F., Hnasko, T., and Palmiter, R. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310, 683-685.
- Marella, S., Fischler, W., Kong, P., Asgarian, S., Rueckert, E., and Scott, K. (2006). Imaging taste responses in the fly brain reveals a functional map of taste category and behavior. *Neuron* 49, 285-295.
- MarionPoll, F. (1995). Object-oriented approach to fast display of electrophysiological data under MS-Windows. *Journal of Neuroscience Methods* 63, 197-204.
- Marty, N., Dallaporta, M., and Thorens, B. (2007). Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 22, 241-251.
- Masumura, M., Satake, S., Saegusa, H., and Mizoguchi, A. (2000). Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *Gen Comp Endocrinol* 118, 393-399.
- Meunier, N., Belgacem, Y., and Martin, J. (2007). Regulation of feeding behaviour and locomotor activity by takeout in *Drosophila*. *J Exp Biol* 210, 1424-1434.
- Moreau, R., Gourdoux, L., Lequellec, Y., and Dutrieu, J. (1982). ENDOCRINE CONTROL OF HEMOLymph CARBOHYDRATES IN LOCUSTA-MIGRATORIA - COMPARISON BETWEEN EFFECTS OF 2 ENDOGENOUS HORMONAL EXTRACTS AND EFFECTS OF INSULIN AND GLUCAGON. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 73, 669-673.
- Murdock, L.L., Brookhart, G., Edgecomb, R.S., Long, T.F., and Sudlow, L. (1985). DO PLANTS PSYCHOMANIPULATE INSECTS. *Acs Symposium Series* 276, 337-351.

Oshea, M., and Rayne, R.C. (1992). ADIPOKINETIC HORMONES - CELL AND MOLECULAR-BIOLOGY. *Experientia* 48, 430-438.

Phifer, C., and Prior, D. (1985). Body hydration and haemolymph osmolality affect feeding and its neural correlate in the terrestrial gastropod, *Limax maximus*. *J Exp Biol* 118, 405-421.

Powley, T., and Phillips, R. (2004). Gastric satiation is volumetric, intestinal satiation is nutritive. *Physiol Behav* 82, 69-74.

Predel, R., Wegener, C., Russell, W., Tichy, S., Russell, D., and Nachman, R. (2004). Peptidomics of CNS-associated neurohemal systems of adult *Drosophila melanogaster*: a mass spectrometric survey of peptides from individual flies. *J Comp Neurol* 474, 379-392.

Roessingh, P., and Simpson, S.J. (1984). VOLUMETRIC FEEDBACK AND THE CONTROL OF MEAL SIZE IN *SCHISTOCERCA-GREGARIA*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 36, 279-286.

Rulifson, E., Kim, S., and Nusse, R. (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 296, 1118-1120.

Ryuda, M., Shimada, K., Koyanagi, R., Azumi, K., Tanimura, T., and Hayakawa, Y. (2008). Analysis of Hunger-Driven Gene Expression in the *Drosophila melanogaster* Larval Central Nervous System. *Zoological Science* 25, 746-752.

Schnaitmann C., Vogt K., Triphan T. and Tanimoto H. (2010). Appetitive and aversive visual learning in freely moving *Drosophila*. *Front. Behav. Neurosci.*

Schwaerzel, M., Heisenberg, M., and Zars, T. (2002). Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* 35, 951-960.

Simpson, S.J. (1983). THE ROLE OF VOLUMETRIC FEEDBACK FROM THE HINDGUT IN THE REGULATION OF MEAL SIZE IN 5TH-INSTAR *LOCUSTA-MIGRATORIA* NYMPHS. *Physiological Entomology* 8, 451-467.

Simpson, S.J., and Raubenheimer, D. (1993). THE CENTRAL ROLE OF THE HEMOLYMPH IN THE REGULATION OF NUTRIENT INTAKE IN INSECTS. *Physiological Entomology* 18, 395-403.

- Simpson, S., and Bernays, E. (1983). The regulation of feeding: locusts and blowflies are not so different from mammals. *Appetite* 4, 313-346.
- Steele, J.E. (1961). OCCURRENCE OF A HYPERGLYCAEMIC FACTOR IN CORPUS CARDIACUM OF AN INSECT. *Nature* 192, 680-&.
- Steele, J.E. (1963). THE SITE OF ACTION OF INSECT HYPERGLYCEMIC HORMONE. *General and Comparative Endocrinology* 3, 46-52.
- Sudlow, L.C., Edgecomb, R.S., and Murdock, L.L. (1987). REGULATION OF LABELLAR AND TARSAL TASTE THRESHOLDS IN THE BLACK BLOWFLY, PHORMIA-REGINA. *Journal of Experimental Biology* 130, 219-234.
- Takahashi, M., Kono, Y., Kurahashi, H., Matsushita, K., Nishina, M., and Kameda, Y. (1995). EFFECT OF A TREHALASE INHIBITOR, VALIDOXYLAMINE-A, ON 3 SPECIES OF FLIES. *Applied Entomology and Zoology* 30, 231-239.
- Tanimura, T., Isono, K., Takamura, T., and Shimada, I. (1982). GENETIC DIMORPHISM IN THE TASTE SENSITIVITY TO TREHALOSE IN DROSOPHILA-MELANOGASTER. *Journal of Comparative Physiology* 147, 433-437.
- Tempel, B., Bonini, N., Dawson, D., and Quinn, W. (1983). Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1482-1486.
- Thum, A., Jenett, A., Ito, K., Heisenberg, M., and Tanimoto, H. (2007). Multiple memory traces for olfactory reward learning in *Drosophila*. *J Neurosci* 27, 11132-11138.
- Tindell, A., Smith, K., Berridge, K., and Aldridge, J. (2009). Dynamic computation of incentive salience: "wanting" what was never "liked". *J Neurosci* 29, 12220-12228.
- Treherne, J.E. (1957). GLUCOSE ABSORPTION IN THE COCKROACH. *Journal of Experimental Biology* 34, 478-485.
- Tully, T., and Quinn, W. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 157, 263-277.
- Van Der Horst, D.J., Houben, N.M.D., and Beenackers, A.M.T. (1980). DYNAMICS OF ENERGY SUBSTRATES IN THE HEMOLYMPH OF LOCUSTA-MIGRATORIA DURING FLIGHT. *Journal of Insect Physiology* 26, 441-448.

Venken, K., and Bellen, H. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 6, 167-178.

Venken, K., and Bellen, H. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 6, 167-178.

Wegener, C., Reinl, T., Jänsch, L., and Predel, R. (2006). Direct mass spectrometric peptide profiling and fragmentation of larval peptide hormone release sites in *Drosophila melanogaster* reveals tagma-specific peptide expression and differential processing. *J Neurochem* 96, 1362-1374.

Wegener, G., Tschiedel, V., Schlöder, P., and Ando, O. (2003). The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *J Exp Biol* 206, 1233-1240.

WIGGLESWORTH, V. (1949). The utilization of reserve substances in *Drosophila* during flight. *J Exp Biol* 26, 150-163, illust.

Wu, Q., Wen, T., Lee, G., Park, J., Cai, H., and Shen, P. (2003). Developmental control of foraging and social behavior by the *Drosophila* neuropeptide Y-like system. *Neuron* 39, 147-161.

Wu, Q., Zhao, Z., and Shen, P. (2005). Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y- and insulin-like systems. *Nat Neurosci* 8, 1350-1355.

Zinke, I., Schutz, C.S., Katzenberger, J.D., Bauer, M., and Pankratz, M.J. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *Embo Journal* 21, 6162-6173.

8. Anhang

8.1. Erklärung

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. Die mit meiner Publikation wortgleichen oder nahezu wortgleichen Textpassagen habe ich selbst verfasst. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Alle in Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern¹ gemachten Experimente sind als solche gekennzeichnet. Diese Zusammenarbeit umfasste theoretische Diskussionen und vor allem die praktische Umsetzung einiger von mir und meinem Betreuer² geplanter Experimente.

Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren

vorgelegen hat. Ich habe zuvor keinen Versuch unternommen, den akademischen Grad eines Doktors der Naturwissenschaften zu erwerben.

München, den 18. März 2007

Franz Gruber

Prof. Martin Heisenberg

¹ Stephan Knapek, Lasse Bräcker: Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany davor Lehrstuhl für Neurobiologie und Genetik, Universität Würzburg, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany

Igor Siwanowicz: Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany

Teiichi Tanimura, Michiko Fujita: Department of Biology, Graduate School of Sciences, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka, 812-8581, Japan.

² Hiromu Tanimoto: Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany davor Lehrstuhl für Neurobiologie und Genetik, Universität Würzburg, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany

8.2. Curriculum vitae

Franz Andreas Gruber

AG Tanimoto, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried. Tel.:089-8578 3791. E-Mail: fgruber@neuro.mpg.de

Geburtstag: 01.08.1974

Geburtsort: Berchtesgaden (Oberbayern, Deutschland)

Promotion: 2006-2010, AG Tanimoto Max-Planck-Institut für Neurobiologie Martinsried bei München, davor AG Heisenberg bei Hiromu Tanimoto Lehrstuhl für Neurobiologie und Genetik, Universität Würzburg.

Diplomarbeit: AG Heisenberg bei Hiromu Tanimoto Lehrstuhl für Neurobiologie und Genetik, Universität Würzburg.

Hauptstudium: 2003-2006, Universität Würzburg.

Grundstudium: 2001-2003, FU Berlin.

Abendgymnasium: 1998-2000, Abendgymnasium Lübeck mit Abitur abgeschlossen, Mitarbeit in einer TV-Produktionsfirma, Bühnenarbeit.

Grundwehrdienst: 1997-1998, Wehrdienst (Fallschirmjäger Oldenburg/Wildeshausen).

Schulen/Arbeit: 1981-1997, Grundschule/Gymnasium Berchtesgaden, FOS Traunstein, Arbeitstätigkeit bei der Jennerbahn Berchtesgaden, in der Gastronomie auf Helgoland und Mitarbeit in einer TV-Produktionsfirma.

..... (Unterschrift)

8.3. Publikation

Gruber, F., Fujita, M., Knapek, S., Bräcker, L., Siwanowicz, I., Tanimura, T., and Tanimoto, H.:
Osmolarity of ingested substances suppresses motivation to approach food-predicting odor (in
Bearbeitung).

8.4. Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Hiromu Tanimoto, der zuerst während der Diplom- und dann während der Doktorarbeit der entscheidende Ansprechpartner und Unterstützer für mich war. Die intensive Betreuung in Form zahlloser wissenschaftlicher Diskussionen hat mir sehr geholfen. Ich wünsche Hiromu und der gesamten Arbeitsgruppe weiter viel Erfolg bei der Forschung.

Ich möchte Prof. Heisenberg dafür danken, dass ich die Gelegenheit hatte in seinem Lehrstuhl meine Doktorarbeit anzufangen und schließlich auch bei ihm als Erstkorrektor und Prüfer abzuschließen. Die Atmosphäre im Lehrstuhl war sehr angenehm. In besonders positiver Erinnerung wird mir auch Prof. Erich Buchner bleiben.

Danken möchte ich Dr. Nico Blüthgen für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Für die gute Zusammenarbeit geht ein besonderer Dank an Lasse Bräcker, Stephan Knappek, Igor Siwanowicz und vor allem an Prof. Teiichi Tanimura und Michiko Fujita aus Japan.

Danken möchte ich auch allen Kollegen und Weggefährten in Würzburg und München.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Freundin für ihre Unterstützung.