



**Optische Visualisierung neuronaler Aktivität:  
Etablierung des *in – vivo* Calcium Imaging  
mit dem genetisch codierten Sensor  
Yellow Cameleon 2.1  
und Untersuchung der olfaktorischen Codierung  
im Gehirn von *Drosophila melanogaster***

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

**vorgelegt von  
Thomas Spall  
aus Klingenberg am Main**

**Würzburg, 2004**

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:                    Prof. Dr. Scheer

.....

Gutachter :                        Prof. Dr. Buchner

Gutachter:                        Prof. Dr. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

# Inhalt

<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Registrierung neuronaler Aktivität</b>	<b>7</b>
1.1.1 Elektrophysiologische Methoden	8
1.1.2 Funktionelles Imaging	8
1.1.2.1 Deoxyglucose-Mapping	8
1.1.2.2 Positron-Emissions Tomographie (PET)	9
1.1.2.3 Optisches Imaging intrinsischer Signale (OIS)	9
1.1.2.4 Imaging mittels spannungsabhängiger Farbstoffe	10
1.1.2.5 Imaging mittels konventioneller Calcium Imaging Farbstoffe	10
1.1.2.6 Imaging mittels genetisch codierter Sensoren	13
1.1.2.6.1 Genetisch codierte Spannungssensoren	14
1.1.2.6.2 Genetisch codierte Calciumsensoren	15
1.1.2.6.3 Genetisch codierte Enzymaktivitätssensoren	17
<b>1.2 Das Modellsystem <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>18</b>
<b>1.3 Olfaktorische Codierung bei <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>19</b>
<b>1.4 Aufgabenstellung</b>	<b>26</b>
<b>2 Material</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Enzymatische Manipulation der DNA</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Kits</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Nukleotide</b>	<b>29</b>
<b>2.4 DNA-Größenstandards</b>	<b>30</b>
<b>2.5 Oligonukleotide</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Sequenzierungen</b>	<b>30</b>
<b>2.7 Plasmide</b>	<b>30</b>
<b>2.8 Fliegenstämme</b>	<b>30</b>

---

<b>2.9 Medien</b>	<b>31</b>
<b>2.10 Lösungen</b>	<b>31</b>
<b>2.11 Imaging Experimente</b>	<b>33</b>
<b>3 Methoden</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Molekularbiologie</b>	<b>34</b>
3.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	34
3.1.1.1 Isolierung genomischer DNA	34
3.1.1.2 Verdau genomischer DNA	34
3.1.1.3 DNA-Fällung	35
3.1.1.4 Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung	35
3.1.1.5 Gelaufreinigung	36
3.1.1.6 PCR-Aufreinigung	36
3.1.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten	36
3.1.1.8 DNA-Konzentrationsbestimmung	37
3.1.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)	37
3.1.3 Sequenzierungen	38
3.1.4 Inverse PCR	38
3.1.5 Keimbahntransformation	40
<b>3.2 <i>in-vitro</i> Cameleon 2.1-Funktionsanalyse</b>	<b>42</b>
3.2.1 Herstellung von rekombinantem His-Tag-Cameleon 2.1-Protein	42
3.2.2 Messapparatur	42
3.2.3 Erstellung der Analyselösungen und Messung	44
3.2.4 Berechnung und Darstellung der Daten	45
<b>3.3 <i>in-vivo</i> Imaging von Calciumsignalen in den Antennalloben und Calyces von <i>Drosophila melanogaster</i> mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1</b>	<b>46</b>
3.3.1 Erstellung der UAS: Cameleon 2.1-Fliegen	46
3.3.2 <i>in-vivo</i> Präparation	46
3.3.3 Imaging-Apparatur	47
3.3.4 Duftgabe und verwendete Düfte	49

---

3.3.5 Datenauswertung	49
3.3.6 Darstellung der Calciumsignale als Filme	51
<b>3.4 <i>in-vivo</i> Imaging von Calciumsignalen im lateralen Protocerebrum von <i>Drosophila melanogaster</i> mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1</b>	<b>52</b>
3.4.1 Erstellung von homozygoten Cameleon 2.1/82-GH146-Fliegen durch Rekombination	52
3.4.2 <i>in-vivo</i> Präparation	55
3.4.3 Imaging-Apparatur	59
3.4.4 Olfaktometer	61
3.4.4.1 Aufbau und Funktion	61
3.4.4.1 Durchflussraten und Fehlerbehebung	63
3.4.5 Datenaufnahme	65
3.4.5.1 Experimente zur olfaktorischen Codierung	65
3.4.5.1.1 Experimenteller Aufbau	65
3.4.5.1.2 Messprotokoll, Soft- und Hardwareeinstellungen	67
3.4.5.1.3 Zusammenfassung der Experimente zur olfaktorischen Codierung	70
3.4.5.2 Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid	71
3.4.5.2.1 Experimenteller Aufbau	71
3.4.5.2.2 Zusammenfassung der Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid	71
3.4.5.3 Erstellung der Morphologiebilder	72
3.4.6 Datenauswertung	73
3.4.6.1 Experimente zur olfaktorischen Codierung	73
3.4.6.1.1 Erstellung der Graphen	73
3.4.6.1.2 Erstellung und Skalierung der Ca <sup>2+</sup> -Aktivitätsmuster	76
3.4.6.1.3 Darstellung der Calciumsignale als Filme	82
3.4.6.1.4 Kriterien zur Auswahl gemessener Individuen	87
3.4.6.2 Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid	90
3.4.6.2.1 Erstellung der Graphen	90
3.4.6.2.2 Erstellung der Ca <sup>2+</sup> -Aktivitätsmuster	92
3.4.6.2.3 Darstellung der Calciumsignale als Filme	93

---

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>100</b>
<b>4.1 Optomotorisches Verhalten der Cameleon 2.0 <i>in-vivo</i> Präparate</b>	<b>100</b>
<b>4.2 Molekularbiologie</b>	<b>104</b>
4.2.1 Lokalisation der Transgen-Insertion in Cameleon 2.0-Fliegen	104
4.2.2 Mutation von Cameleon 2.0 zu Cameleon 2.1	107
4.2.3 Keimbahntransformation	107
4.2.4 Auswahl und Charakterisierung der Cameleon 2.1-Linie Cam 2.1/82	108
<b>4.3 <i>in-vitro</i> Cameleon 2.1-Funktionsanalyse</b>	<b>109</b>
<b>4.4 <i>in-vivo</i> Imaging von Calciumsignalen in den Antennalloben und Calyces von <i>Drosophila melanogaster</i> mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1</b>	<b>112</b>
4.4.1 Selektive Expression von Cameleon 2.1 mit Hilfe des GAL4-UAS-Systems	112
4.4.2 Selektive Expression von Cameleon 2.1 in den olfaktorischen Projektionsneuronen	115
4.4.3 Duftevozierte Calciumsignale in Antennalloben und Calyx	116
4.4.3.1 Duftevozierte Calciumsignale in den Antennalloben	117
4.4.3.2 Duftevozierte Calciumsignale im Calyx	120
4.4.4 Zusammenfassung	126
<b>4.5 Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid</b>	<b>127</b>
<b>4.6 <i>in-vivo</i> Imaging von Calciumsignalen im lateralen Protocerebrum von <i>Drosophila melanogaster</i> mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1</b>	<b>131</b>
4.6.1 Exemplarische Messung einer Isoamylacetat / Benzaldehyd - und einer Methylcyclohexanol / Ethylacetat-Konzentrationsreihe	132
4.6.2 Quantitative Analyse aller Isoamylacetat / Benzaldehyd - und Methylcyclohexanol / Ethylacetat-Konzentrationsreihen	140
4.6.3 Statistische Auswertung und Zusammenfassung	146

---

4.6.4 Rauschen in den Ca <sup>2+</sup> -Aktivitätsmustern	149
<b>5 Diskussion</b>	<b>154</b>
5.1 Allgemeines zur Messmethode und Datendarstellung	155
5.2 Optomotorisches Verhalten der Cameleon 2.1 <i>in-vivo</i> Präparate	158
5.3 Molekularbiologie	159
5.4 <i>in-vitro</i> Cameleon 2.1-Funktionsanalyse	161
5.5 <i>in-vivo</i> Imaging von Calciumsignalen in den Antennalloben und Calyces von <i>Drosophila melanogaster</i> mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1	162
5.5.1 Duftevozierte Calciumsignale in den Antennalloben	163
5.5.2 Duftevozierte Calciumsignale im Calyx	165
5.6 <i>in-vivo</i> Imaging von Calciumsignalen im lateralen Protocerebrum von <i>Drosophila melanogaster</i> mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1	170
5.7 Modell der olfaktorischen Informationsverarbeitung für <i>Drosophila</i>	176
5.8 Perspektiven	178
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>182</b>
<b>7 Summary</b>	<b>185</b>
<b>8 Literatur</b>	<b>188</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>202</b>

---

<b>9.1 Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid</b>	<b>202</b>
<b>9.2 Experimente zur olfaktorischen Codierung im lateralen Protocerebrum</b>	<b>206</b>
9.2.1 Isoamylacetat / Benzaldehyd-Fliegen	207
9.2.2 Methylcyclohexanol / Ethylacetat-Fliegen	218
<b>9.3 Molekularbiologie</b>	<b>229</b>
9.3.1 Inverse PCR an der Cameleon 2.0-Linie C2-6/STM	229
9.3.2 Lage der Primer	229
9.3.3 Verwendete Vektoren	230
<b>9.4 Software für die <i>in-vitro</i> Cameleon 2.1 – Funktionsanalyse</b>	<b>231</b>
<b>10 Abkürzungen</b>	<b>242</b>
<b>11 Danksagung</b>	<b>244</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Registrierung neuronaler Aktivität

Das menschliche Gehirn zeichnet sich durch seine mannigfaltigen und komplexen neuronalen Verschaltungen aus. Es verarbeitet alle möglichen Reize unserer Umwelt, filtert und prozessiert Informationen und liefert so ein Abbild der uns umgebenden Realität. Es steuert unsere Reaktion auf externe Reize und ist dabei in der Lage, sich auf bereits gelernte Situationen zu beziehen um so planvolles Handeln zu ermöglichen. Seit je her ist die Wissenschaft daran interessiert, herauszufinden wie die neuronalen Schaltkreise des Gehirns diese Aufgaben erfüllen. Ein großer Schritt in Richtung eines komplexen Verständnisses ist die Erkenntnis, dass der Funktion der Neuronen im menschlichen Gehirn weitgehend die gleichen prinzipiellen Mechanismen und Bausteine zugrunde liegen wie der Wirkungsweise der Zellen von bedeutend einfacher strukturierten Gehirnen "niederer" Tiere. Ein sehr gut beschriebener Modellorganismus für neurobiologische und genetische Fragestellungen ist zum Beispiel die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*.

Die Informationsweiterleitung und – verarbeitung im Nervensystem geschieht mit Hilfe von elektrischen Signalen, genauer gesagt durch Potentialänderungen an den Plasmamembranen von Neuronen. Ionenströme bewegen sich transversal zu den Membranen der Nervenzellen durch ionenselektive Kanäle (Hodgkin und Huxley, 1952). Diese Ionenkanäle können über Membranpotentiale (spannungsabhängige Aktivierung), Transmitter (Liganden – Aktivierung) oder intrazelluläre Botenstoffe des Cytoplasmas aktiviert und moduliert werden. Unter dem Begriff neuronale Aktivität kann man also eine Vielzahl von Prozessen zusammenfassen, die mit neuronaler Erregung korrelieren, wie zum Beispiel Calciumeinstrom, erhöhte Metabolismusrate, Transmitterfreisetzung und Änderung von Membranpotentialen. Je nach Meßmethode können unterschiedliche Formen der neuronalen Aktivität untersucht werden. Im Folgenden werden die verschiedenen Techniken und Methoden kurz dargestellt und die Grundlagen dieser Arbeit näher erläutert.

### 1.1.1 Elektrophysiologische Methoden

Zur Untersuchung neuronaler Aktivität wurden im Laufe der Jahre immer neue Methoden und Techniken entwickelt. Seit langem werden elektrophysiologische Methoden angewandt. Eine der bekanntesten Methoden ist die patch – clamp Technik (Neher et al., 1978). Mit ihr können lokale Ströme individueller Neurone bis auf die Ebene einzelner Kanäle hinab untersucht werden. Intrazelluläre Ableitungen einzelner Neurone erlauben ebenfalls eine extrem gute zeitliche Auflösung, allerdings wiederum nur von einzelnen Neuronen und ohne die Möglichkeit der räumlichen Auflösung innerhalb des Neurons. Codierungen innerhalb von Netzwerken und Mikroschaltkreisen sind deshalb mit diesen Methoden nicht zugänglich. Extrazelluläre Ableitungen mit Hilfe von auf das Gewebe applizierten Elektroden erlauben eine hohe zeitliche Auflösung von Summenaktivität oder lokalen Feldpotentialen. Die räumliche Auflösung dieser Signale ist aber sehr begrenzt. Um räumliche Muster neuronaler Aktivität zu erfassen, wurden bildgebende Verfahren zur Darstellung von Gehirnaktivitäten entwickelt. Sie werden im Folgenden kurz dargestellt:

### 1.1.2 Funktionelles Imaging

Unter dem Begriff *funktionelles Imaging* fasst man verschiedene Techniken zusammen, die dem menschlichen Auge auf Zellebene ablaufende Ereignisse räumlich und zeitlich sichtbar machen.

#### 1.1.2.1 Deoxyglucose – Mapping

Diese Methode beruht auf der erhöhten Metabolismusrate aktivierter Neurone: Aktive Neurone nehmen verstärkt Glucose in die Zellen auf, wo es zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  umgesetzt wird. Die Zellen sind ebenfalls in der Lage mit  $^3\text{H}$  oder  $^{14}\text{C}$  radioaktiv markierte Deoxyglucose aufzunehmen. Es wird in die Blutbahn injiziert oder dem Futter der Tiere beigemischt. In der Zelle wird es jedoch nur phosphoryliert, so dass sich im aktiven Neuron markiertes Deoxyglucosephosphat anreichert. Das in den Neuronen angereicherte Tritium oder  $^{14}\text{C}$  kann detektiert werden und gibt somit Auskunft über die neuronale Aktivität. Diese Methode wurde und wird erfolgreich bei

Vertebraten (Kennedy et al., 1976; Steward et al., 1979; Poremba et al., 2003) und Invertebraten (Sejnowski et al., 1980) angewandt. Die Methode fand auch Anwendung bei *Drosophila* (Buchner und Buchner, 1980) und wurde schon zu Studien olfaktorischer Reize in den Antennalloben herangezogen (Rodrigues und Buchner, 1984). Zur Visualisierung der Aktivitätsdynamik von Neuronen ist diese Methode jedoch ungeeignet, da die zeitliche Auflösung mehrere Stunden beträgt.

### **1.1.2.2 Positron – Emissions Tomographie (PET)**

Neue Methoden, wie die Kernspin – Resonanz – Tomographie (MRI, magnetic resonance imaging) oder die Positron – Emissions – Tomographie (PET) ermöglichen es, Aktivitäten im lebenden Gehirn zu beobachten. Bei *in – vivo* PET Experimenten beispielsweise, werden dem Versuchstier kurzlebige radioaktive Isotope, sog. Positronenstrahler als Marker injiziert. Dabei handelt es sich in der Regel um Kohlenstoff- ( $^{11}\text{C}$ ), Sauerstoff- ( $^{15}\text{O}$ ) oder Fluor- ( $^{18}\text{F}$ ) markierte Verbindungen. Trifft ein Positron auf sein gleich schweres, aber negativ geladenes Gegenstück, ein Elektron, wandelt sich die Masse beider Teilchen in Strahlung um, die von Detektoren registriert werden kann. Mit Hilfe dieser weitgehend nicht invasiven Methode ist es möglich, Gehirnaktivitäten mit einer Auflösung von wenigen Millimetern zu detektieren. Für das Imaging auf der Ebene von Neuronen bzw. synaptischen Mikroschaltkreisen, ist diese Methode jedoch zu grob.

### **1.1.2.3 Optisches Imaging intrinsischer Signale (OIS)**

Die Methode des intrinsischen Imaging beruht auf veränderten Lichtreflexionseigenschaften, die durch physiologische Veränderung des Gewebes entstehen. Funktionelle physiologische Veränderungen, wie zum Beispiel der Zuwachs an Blutvolumen, Veränderungen der Hämoglobin – Oxymetrie und die damit veränderten Eigenschaften der Lichtstreuung, resultieren in einer Modulation der intrinsischen Gewebereflexion, die dazu benutzt wird, Aktivitätskarten im Gehirn zu erstellen (Vanzetta und Grinvald, 1999; Mayhew et al., 2000). Zum ersten Mal versuchte Lieke (1993) diese Methode für Insekten zu etablieren und damit die olfaktorische Codierung im Antennallobus zu untersuchen. Das Problem bei dieser Methode ist jedoch das sehr geringe Signal – zu – Rausch – Verhältnis.

#### **1.1.2.4 Imaging mittels spannungsabhängiger Farbstoffe**

Zur Untersuchung neuronaler Aktivitäten bieten sich auch spannungsabhängige Farbstoffe an, wie zum Beispiel die Oxonol-Farbstoffe (Grinvald et al., 1982). Diese Farbstoffe, auch RH – Farbstoffe (RH: Rina Hildesheim) genannt, beinhalten eine Reihe von Dialkylaminophenylpolyenylpyridinium – Farbstoffen, die anfänglich dazu benutzt wurden, funktionelles Imaging an Neuronen durchzuführen. Jedoch spiegelt schon die große Anzahl an RH – Farbstoff – Analoga die Tatsache wider, dass nicht ein einziger Farbstoff genügt, um unter unterschiedlichen Bedingungen optimale Signale zu liefern (Rohr et al., 1994). Diese Farbstoffe bieten zwar große Möglichkeiten zur Untersuchung neuronaler Aktivitäten, sind jedoch nicht ganz unproblematisch. So kann es bei Färbungen des Cortex in Mäusen mit dem Farbstoff RH 414 zu einer arteriellen Verengung im Cortex kommen. Problem all dieser Farbstoffe ist deren sehr geringe Sensitivität (Gonzales et al., 1997). Traditionelle Farbstoffe reagieren mit einer Konformationsänderung auf das angelegte elektrische Feld, was schließlich eine messbare Veränderung der Absorption – oder Fluoreszenzeigenschaften verursacht. Auch diese Methode wurde schon für das olfaktorische System der Honigbiene angewandt (Galizia et al., 2000), wobei auch hier das sehr geringe Signal – zu – Rausch – Verhältnis ein Problem darstellte.

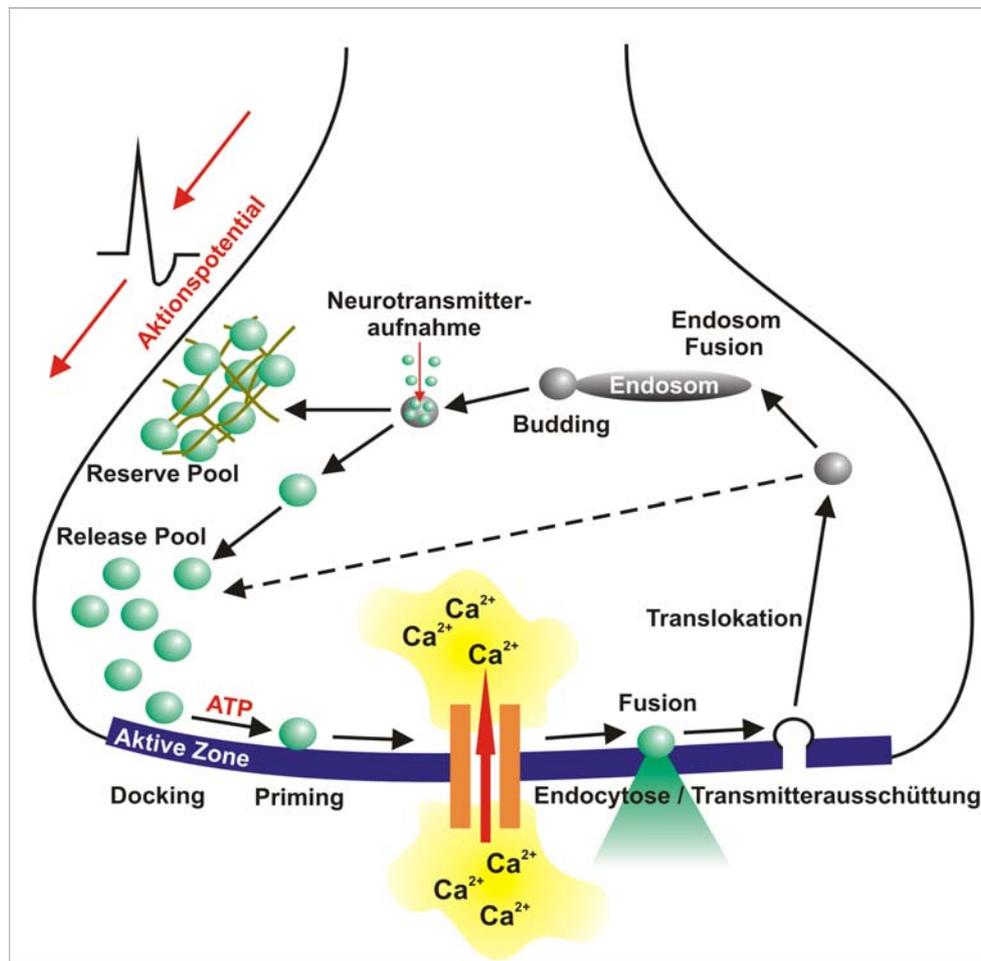
#### **1.1.2.5 konventionelle Calcium Imaging Farbstoffe**

Man kann neuronale Aktivität nicht nur über die Veränderungen der Membranpotentiale nachweisen, sondern auch über die Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration. Calciumionen spielen bei der Regulation vieler neuronaler Prozesse eine Rolle. Dabei existieren zwei Calciumquellen für das Neuron: Influx von externem Calcium durch spannungsabhängige – oder rezeptorabhängige Calciumkanäle und die interne Aufnahme oder Abgabe von Calciumionen durch das endoplasmatische Retikulum. Das endoplasmatische Retikulum zieht sich als kontinuierliches Membrannetzwerk durch das ganze Neuron und dient so als reversibler Calciumspeicher für die Dendriten, das Soma und das Axon (Broadwell et al., 1984; Martone et al., 1993; Terasaki et al., 1994). Ist das Neuron aktiv, gelangt externes Calcium ins Cytosol. Dieses Calcium wird im Lumen des endoplasmatischen Retikulums gespeichert. Die Menge an gespeichertem

Calcium variiert mit der Stärke der vorhergegangenen neuronalen Aktivität. Erreicht die Calciumkonzentration im endoplasmatischen Retikulum einen kritischen Schwellenwert, wird das Calcium wieder ins Cytosol entlassen und dient so dem Neuron als eine Art "Kurzzeitgedächtnis" für die vorhergegangene neuronale Aktivität. Das neuronale Calcium – Signaling wird also vom endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran des Neurons beeinflusst. Die beiden Membranen interagieren miteinander und kontrollieren so eine Vielzahl von Prozessen wie die Erregbarkeit des Neurons, die synaptische Plastizität, die Transkription von Genen (second – messenger – Prinzip) und die Transmitterausschüttung (Berridge, 1998).

Von besonderem Interesse für das Calcium Imaging neuronaler Aktivität ist jedoch die calciuminduzierte Transmitterausschüttung an chemischen Synapsen. Erreicht ein axonales Aktionspotential das präsynaptische Endköpfchen des Neurons, öffnen sich die spannungsabhängigen Calciumkanäle und Calcium strömt ins Cytosol, wo es die Transmitterausschüttung induziert (Abb. 1.1). Nachdem die Transmittermoleküle durch den synaptischen Spalt diffundiert sind, können sie an rezeptorabhängige Calciumkanäle in der postsynaptischen Membran binden und dort ebenfalls einen Calciuminflux induzieren. Neuronale Erregung führt also zu präsynaptischem und postsynaptischem Calciuminflux und zur Erhöhung des Calciumspiegels in Dendriten, im Axon und im Zellkörper (Berridge, 1998).

Mit der Technik des Calcium Imaging lassen sich die von der neuronalen Aktivität abhängigen Calciumkonzentrationsänderungen bildlich darstellen. Dazu benötigt man calciumsensitive Fluorophore. Das sind Farbstoffe, die ihre Emissionswellenlänge bei gegebener Anregungswellenlänge verändern, sobald sie Calcium binden (Burchiel, 2000). Zellmembranen sind für die meisten dieser Fluorophore undurchlässig, sodass sie für Experimente in die Zellen mikroinjiziert werden müssen, was Auswirkungen auf die Physiologie der Zellen haben kann. In der Zelle binden sie Calcium mit sehr hoher Selektivität (Grynkiewicz et al., 1985). Um das Problem der Mikroinjektion zu umgehen, kann man manche dieser Farbstoffe in eine für die Membran durchlässige Esterform umwandeln. Dabei lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass diese auch in andere Gewebe, wie Glia oder Epidermis, diffundieren. Das heißt, eine zellspezifische Färbung ist nur sehr schwer



**Abb. 1.1** Calciuminduzierte Transmitterausschüttung an der Präsynapse (Abb. modifiziert nach Südhof, 1995).

Durch das Auflaufen eines Aktionspotentials an die Endigung eines Axons kommt es zu einer Depolarisation der präsynaptischen Membran. Die innerhalb der Membran gelegenen spannungsabhängigen Calcium<sup>2+</sup>-Kanäle öffnen sich und Ca<sup>2+</sup>-Ionen strömen ins Cytosol. Der Anstieg der internen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt zur Fusion von bereits gepriimten und angedockten Vesikeln mit der präsynaptischen Membran, so dass der Neurotransmitter aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt abgegeben wird. Der Botenstoff kann nun über diesen Spalt an die postsynaptische Membran gelangen und an die in sie eingebetteten Rezeptoren binden. Je nach Rezeptortyp kommt es direkt oder indirekt zur Öffnung von Ionenkanälen auf der postsynaptischen Seite und somit auch hier zu einer Depolarisation bzw. Hyperpolarisation, die in der nachgeschalteten Nervenzelle ebenfalls weitergeleitet werden kann.

Die synaptischen Vesikel (SV) durchlaufen innerhalb der Neuronendigung einen Zyklus: Der initiale Kontakt der SV (*docking*) erfolgt nur an der aktiven Zone der präsynaptischen Membran. Auf diesen Schritt folgt ein Vorbereitungsschritt (*priming*), bei dem die SV für die Calcium gesteuerte Fusion mit der Membran kompetent gemacht werden. Exozytose kann nun durch einlaufende Aktionspotentiale und den dadurch hervorgerufenen Calcium-Einstrom ausgelöst werden. Entleerte Vesikel werden endocytisiert, transloziert und fusionieren zu Endosomen. Aus diesen Endosomen können durch Abschnürung (*budding*) einzelne synaptische Vesikel entstehen, die nun wieder mit Neurotransmitter befüllt werden können. Diese Vesikel können zur aktiven Zone oder in den Reserve-Pool der SV transloziert werden. Durch Phosphorylierung können die SV aus dem Reserve-Pool entlassen werden und so ebenfalls einem neuen synaptischen Vesikel-Zyklus zugeführt werden. Der Reserve-Pool der SV erlaubt dem Neuron eine größere Reaktionsbandbreite über einen weiten Aktivitätsbereich.

durchführbar. Färbungen mit Farbstoffen dieser Art sind also in großem Maße abhängig von der Dichte des Gewebes und den Diffusionseigenschaften des Farbstoffes. In einigen Modellorganismen, wie zum Beispiel der Honigbiene *Apis mellifera* oder der Ameise *Camponotus rufipes*, findet der Gebrauch von calciumsensitiven Farbstoffen wie Calcium – Green – 1 – acetoxymethyl (AM) und Calcium – Green – 2 – AM zur Untersuchung neuronaler Aktivität intensive Verwendung (Joerges et al., 1997; Galizia et al., 1999).

Die bisher aufgeführten Techniken zur Messung der neuronalen Aktivität haben entweder eine besonders gute zeitliche Auflösung, sind aber stark in der räumlichen Auflösung eingeschränkt (Elektrophysiologie) oder zeigen eine gute räumliche Auflösung, sind dafür aber in der zeitlichen Auflösung stark eingeschränkt (Deoxyglucose – Mapping). Andere Methoden, wie PET oder OIS haben entweder eine zu grobe räumliche Auflösung oder zeigen schlicht ein zu schlechtes Signal – zu – Rausch – Verhältnis. Die von extern zu applizierenden Calciumfarbstoffe schließlich, zeigen eine mangelhafte Genauigkeit in der Anfärbung von definierten Zellpopulationen. Erst die Entwicklung der genetisch codierten Sensoren brachte ganz neue Möglichkeiten für die Untersuchung neuronaler Aktivität, auch bei Versuchsobjekten, die für die oben genannten Techniken aufgrund ihrer geringen Größe bisher ungeeignet waren.

#### **1.1.2.6 Genetisch codierte Sensoren**

Grundlage für die hier beschriebenen genetisch codierten Sensoren sind das GFP (*Green Fluorescent Protein*) und das Aequorin aus der Qualle *Aequora victoria*. Diese grün – fluoreszierenden beziehungsweise lumineszierenden Proteine (Tsien, 1998) haben sich als wichtige Werkzeuge zur Untersuchung von Vorgängen auf zellulärer Ebene erwiesen. Wenn in den Zellen der Qualle *Aequora victoria* der Calciumspiegel steigt, resultiert daraus ein natürliches optisches Signal, die Qualle fluoresziert blau – grün. Auslöser der Fluoreszenz ist die Bindung von intrazellulärem Calcium an einen mit Aequorin assoziierten Cofaktor, der die Energie der chemischen Bindungen in die Emission von blau – grünem Licht umwandelt (Shimomura et al., 1978). Aufgrund der unmittelbaren Nähe von Aequorin zu GFP kann die umgewandelte chemische Energie in Form eines strahlungslosen

Energietransfers auf das GFP übertragen werden. Dieser Vorgang wird allgemein als Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) bezeichnet. Dabei fungiert das angeregte Aequorin als Donor und das GFP als Akzeptor. Das so angeregte GFP gibt die aufgenommene Energie als grüne Fluoreszenz ab (Morise et al., 1974). Das natürliche GFP, das sich autokatalytisch in ein 42Å x 42Å elf – strängiges  $\beta$ -Fass zyklisiert, enthält als Chromophor die Aminosäuren Serin (65), Tyrosin (66) und Glycin (67). Die photophysikalischen Eigenschaften des Proteins sind von seiner Tertiärstruktur, der Elektronenresonanz und dem Protonierungsgrad zwischen dem Chromophor und der Fassstruktur abhängig. Das angeregte GFP zeigt einen Protonentransfer der Hydroxylgruppe von Tyrosin (66) auf das umgebende Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen. Dadurch kommt es zur beschriebenen grünen Fluoreszenz. Die Leichtigkeit dieses Transfers ist abhängig vom Protonengehalt der umgebenden Lösung (pH – Wert). Mit sinkendem pH – Wert nimmt die Fluoreszenz ab (Haupts et al., 1998). Durch Veränderung der drei Aminosäuren des Chromophors ist es möglich Anregungs – und Emissionswellenlängen zu verändern, und somit zum Beispiel cyan – oder gelb – fluoreszierende Moleküle zu entwickeln. Der Vorteil dieser neuen Art von natürlichen Farbstoffen liegt darin, dass es sich um Proteine handelt: Proteine sind genetisch codiert und werden von den Zellen selbst exprimiert. Durch die Anwendung genetischer Methoden ist eine gezielte Expression dieser Farbstoffe möglich (Guerrero und Isacoff, 2001). Die Farbstoffe müssen daher nicht mehr mikroinjiziert oder Bad – appliziert werden.

#### 1.1.2.6.1 Genetisch codierte Spannungssensoren

Den ersten genetisch codierten spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoff FlaSH entwickelten Siegel und Isacoff (Siegel et al., 1997). Er basiert auf der Struktur eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. An jede der identischen Untereinheiten des inaktivierten Shaker  $K^+$  – Kanals wurde unweit der Pore ein GFP inseriert. Durch Spannung ausgelöste Konformationsänderungen des Kanal – Proteins wirken sich in einer Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften des Sensors aus. Problematisch ist, dass die Konformationsänderung zusammen mit der Inaktivierung vermutlich physikalische Kontakte zwischen den vier GFP Modulen schafft, sodass es zu einem Rückgang der Fluoreszenz kommt (Zemelman und Miesenböck, 2001). Außerdem besitzt dieser Sensor eine schlechte zeitliche Auflösung und interagiert vermutlich mit

endogenen Kanälen der Zelle. Eine Verbesserung dieses Sensors (Guerrero et al., 2002) oder andere spannungsabhängige Fluoreszenz – Konstrukte wie VSFP1 (Sakai et al., 2001) konnten diese Probleme bislang nicht zufriedenstellend lösen.

#### 1.1.2.6.2 Genetisch codierte Calciumsensoren

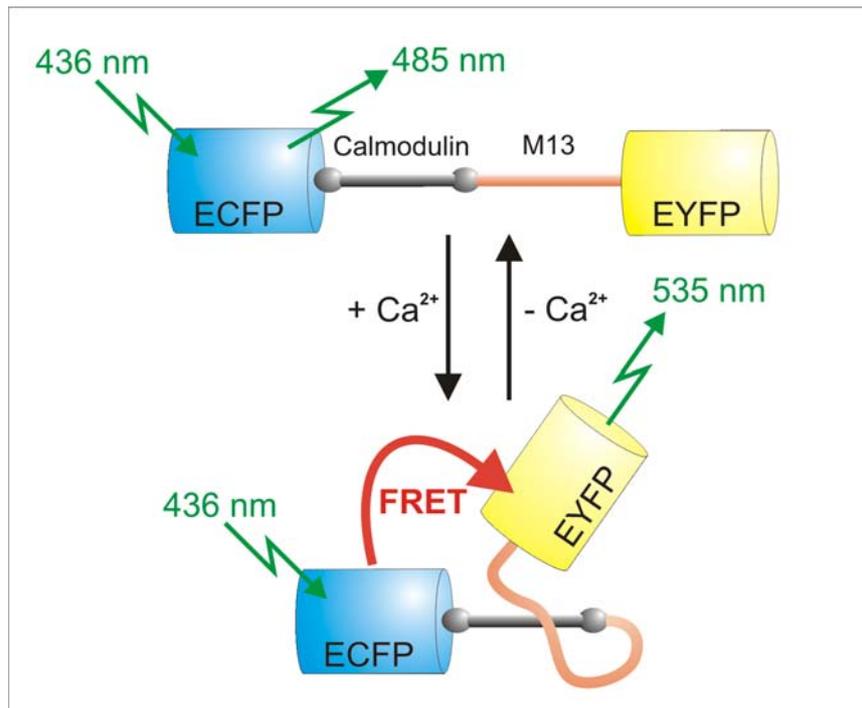
Es gibt zwei Strategien, GFP – Derivate zu calciumsensitiven Sensoren zu modifizieren: Die so genannten zirkulär permutierten Sensoren (Baird et al., 1999) und die so genannten FRET – basierten Sensoren (Romoser et al. 1997, Miyawaki et al. 1997).

Der erste zirkulär permutierte Sensor, das sogenannte “Camgaroo“, wurde von Baird et al. 1999 entwickelt. Beim “Pericam“ (Nagai et al., 2001) handelt es sich ebenfalls um einen zirkulär permutierten und genetisch codierten Calcium Sensor. Genauer betrachtet ist es ein zyklisch permutiertes EYFP, d.h. es wurden die natürlichen N – und C – Termini miteinander verbunden und dafür an einer anderen Stelle zwei neue Termini eingesetzt. Das Calcium bindet an eine Calmodulin – Sequenz, die am N – Terminus inseriert wurde. Die so aktivierte Calmodulin – Sequenz kann an eine, an den C – Terminus eingefügte M13 – Sequenz (Domäne der *Myosin Light Chain – Kinase*) binden. Die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung bewirkt, dass die Fluoreszenz um 180% ansteigt. Das Problem dieses Sensors liegt in der extrem schwachen Fluoreszenz im nicht aktivierten Zustand. Ein weiteres zirkulär permutiertes Sensorprotein ist das G – Camp (Nakai et al.2001). Dieses Protein ist in seiner Struktur dem Pericam identisch, jedoch wurde für diesen Sensor ein EGFP Modul verwendet.

Bei den so genannten Cameleons handelt es sich um FRET – basierte ratiometrische Calciumsensoren. Sie sind aus zwei unterschiedlichen GFP – Derivaten aufgebaut, wobei die beiden GFPs über eine Calmodulin – und eine M13 – Sequenz miteinander verbunden sind. Sie werden mit einer Wellenlänge angeregt, emittieren jedoch zwei unterschiedliche Wellenlängen. Das Verhältnis (Ratio) der emittierten Wellenlängen zueinander ist abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration. Die ersten Cameleons besaßen blau – und grün – fluoreszierende GFP – Derivate. Eine durch gezielte Mutagenesen verbesserte Version, das Yellow Cameleon 2.0

(Miyawaki et al., 1997) ist aus den beiden GFP – Derivaten ECFP (*Enhanced Cyan Fluorescent Protein*) und EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) aufgebaut. Es zeigt eine deutlich stärkere Fluoreszenz als die ursprüngliche Version, besitzt jedoch eine verminderte Fluoreszenz bei niedrigen intrazellulären pH – Werten. Die pH – Sensitivität konnte in einer weiteren Version, dem Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) verbessert werden. Von Cameleon 2.0 unterscheidet sich die neue Version nur durch zwei Aminosäuresubstitutionen. Der Austausch findet im EYFP des Fusionsproteins statt, hier werden die Aminosäuren Valin (Position 68 im EYFP) gegen Leucin und die Aminosäure Glutamin (Position 69 im EYFP) gegen Lysin ausgetauscht. Diese Version zeigt nun eine stabile pH – insensitive Fluoreszenz im pH – Bereich 6,5 – 8. Da die in dieser Arbeit beschriebenen Calcium Imaging Experimente zum größten Teil mit Cameleon 2.1 durchgeführt wurden, wird die Funktionsweise der ratiometrischen Calciumsensoren exemplarisch anhand des Cameleon 2.1 erläutert (Abb. 1.2):

Die beiden GFP – Derivate EYFP und ECFP sind über Calmodulin (4 Calcium – Bindungsstellen) und die Calmodulin – Bindungssequenz des M13 – Peptids miteinander verbunden. Das Fusionsprotein wird in Neuronen exprimiert und liegt dort frei im Cytosol vor. Bei niedriger neuronaler Aktivität ist die intrazelluläre Calciumkonzentration niedrig, das Cameleon 2.1 liegt in nahezu linearer Konformation vor. ECFP kann mit Licht der Wellenlänge 436 nm angeregt werden und emittiert cyan – farbenes Licht der Wellenlänge 485 nm. Steigt die neuronale Aktivität, strömt Calcium ins Zellinnere und bindet an Calmodulin, das sich seinerseits an M13 anlagert. Die so ausgelöste Konformationsänderung des Calciumsensors resultiert in einer engen räumlichen Nachbarschaft von ECFP und EYFP. Regt man ECFP erneut mit 436 nm an, kommt es zum bereits erwähnten strahlungslosen Energietransfer FRET von ECFP auf EYFP. ECFP emittiert nur noch wenig Cyan – Fluoreszenz, dafür emittiert das angeregte EYFP nun Gelb – Fluoreszenz der Wellenlänge 535 nm. Nimmt der intrazelluläre Calciumspiegel wieder ab, geht das Fusionsprotein in seine Ausgangskonformation zurück, es arbeitet also reversibel. Das Yellow Cameleon 2.1 ist also in der Lage unterschiedliche intrazelluläre Calciumkonzentrationen zu messen und dient somit als Indikator für neuronale Aktivität. Man spricht von einem ratiometrischen Sensor, da das Verhältnis (Ratio) von EYFP – zu ECFP – Fluoreszenz Auskunft über die neu-



**Abb. 1.2** Schematische Darstellung des Yellow Cameleon 2.1

ECFP und EYFP sind über Calmodulin und das M13 – Peptid miteinander verbunden. Bindung von Calcium an Calmodulin führt zu einer Konformationsänderung und somit zu einem strahlungslosen Energietransfer (FRET) von ECFP auf EYFP. Dadurch erfolgt eine Veränderung im Emissionsverhältnis EYFP (535nm) / ECFP (485nm).

ronale Aktivität gibt: Ist das Verhältnis von EYFP – zu ECFP – Fluoreszenz hoch, liegt eine starke neuronale Aktivität vor, ist es niedrig, liegt eine schwache Aktivität vor. Weitere verbesserte Versionen des Cameleon 2.1, sind das Yellow Cameleon 3.1 (Miyawaki et al., 1999) und das Yellow Cameleon 6.1 (Truong et al., 2001). Die Version 3.1 wurde in ihrer Quanteneffizienz verbessert, indem die GFP – Derivate ausgetauscht wurden. Die Version 6.1 besteht ebenfalls aus den GFP Derivaten ECFP und EYFP, jedoch wurde hier die M13 – Sequenz gegen eine CKKp (*CaM – Dependent Kinase Kinase Protein*) ersetzt, was zu einer Verstärkung des FRET – Effekts führt. Allerdings wurden diese neuen Sensoren bislang nicht für physiologische Experimente herangezogen.

#### 1.1.2.6.3 Genetisch codierte Enzymaktivitätssensoren

Durch die Entwicklung verschiedener genetisch codierter Enzymaktivitätssensoren kann die Aktivität von Enzymen untersucht werden. Die Expression von Zielgenen wird bei verschiedenen Signaltransduktionswegen durch die Phosphorylierung

spezifischer Transkriptionsfaktoren reguliert. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, den Phosphorylierungszustand von Proteinen *in situ* sichtbar zu machen. Dazu gehört zum Beispiel die Generierung genetisch codierter Enzymaktivitätssensoren, wie z.B. des Phosphorylierungssensors ART (*cAMP Responsive Tracer*). Er visualisiert die cAMP induzierte Phosphorylierung und somit die Dynamik der Proteinkinase A (Nagai et al., 2000). In Zukunft könnte also nicht nur Calcium als Korrelat neuronaler Aktivität registriert werden, sondern möglicherweise auch weitere komplexe zelluläre Vorgänge, wie z.B. andere second messenger – Aktivierungen.

## 1.2 Das Modellsystem *Drosophila melanogaster*

Obwohl der phylogenetische Abstand zwischen Mensch und Fruchtfliege sehr groß ist, kann auf der Ebene der Proteine, welche für den ordnungsgemäßen Ablauf der Erregungweiterleitung verantwortlich sind, ein hohes Maß an Konservierung und Homologie aufgezeigt werden. In der Neurobiologie besteht ein Vorteil von *Drosophila* darin, dass sie trotz der Komplexität des Nervensystems eine mit ca.  $2 \cdot 10^5$  Neuronen überschaubare Anzahl von Nervenzellen aufweist (*Homo sapiens* ca.  $10^{10}$ -  $10^{12}$  Neurone), deren Struktur bereits sehr gut beschrieben ist. Weitere Vorteile gegenüber anderen Versuchstieren liegen in der kurzen Generationsdauer von *Drosophila*, den leichten und kostengünstigen Aufzucht – und Lebensbedingungen, sowie einer großen Nachkommenschaft. Der weitaus wichtigste Grund, warum *Drosophila* das Paradeobjekt der Genetik ist, sind jedoch die großen Fortschritte in der modernen Molekulargenetik: Das mittlerweile komplett entschlüsselte Genom von *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) in Kombination mit der Möglichkeit gezielter Mutagenesen (Ballinger und Benzer, 1989; Kaiser und Goodwin, 1990), Keimbahntransformationen (Spradling und Rubin, 1982), gezielter Expression von Neurotoxinen in definierten Neuronen bzw. Nervenbahnen (Keller et al., 2002) und der gezielten Expression von Transgenen mittels der GAL4 – UAS – Technik (Brand und Perrimon, 1993), machen *Drosophila* zu einem idealen Untersuchungsobjekt für die genetische und neurobiologische Grundlagenforschung. Auch bei der Erforschung von Gehirnprozessen, denen verschiedene Lernleistungen zugrunde liegen, können Mutanten von *Drosophila melanogaster* verwendet werden (z.B. Benzer und Quinn, 1974; Schwaerzel et al., 2002).

Für das optische Imaging neuronaler Aktivität bietet sich *Drosophila* ganz besonders an, da die bereits beschriebenen genetisch codierten Sensoren über das GAL4 – UAS – System (*GAL4 Transkriptionsfaktor – Upstream Activating Sequence*) (Brand und Perrimon, 1993) in definierten Zellpopulationen exprimiert werden können. Da auch die Keimbahntransformation, also die Generierung von transgenen Tieren im Modellsystem *Drosophila melanogaster* relativ einfach durch Mikroinjektion von DNA in Embryonen zu erreichen ist, können neue genetisch codierte Sensoren vergleichsweise rasch *in – vivo* getestet werden. Außerdem steht mittlerweile eine große Auswahl an GAL4 – Treiberlinien zur Verfügung (*Drosophila Stockcenters* in Bloomington, USA), um den gewünschten Sensor im entsprechenden Zielgewebe zu exprimieren. Die kleinen Dimensionen, die das Gehirn von *Drosophila melanogaster* einnimmt, bieten nun einen großen Vorteil gegenüber anderen Versuchsobjekten. Während zum Beispiel das Imaging bei Mäusen lediglich auf einzelne Teile des Gehirns beschränkt ist, kann man bei *Drosophila* das Zusammenspiel unterschiedlicher Signalwege im gesamten Gehirn beobachten.

### **1.3 Olfaktorische Codierung bei *Drosophila melanogaster***

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Codierung von Düften im olfaktorischen System von *Drosophila melanogaster*. Die mittels Calcium Imaging untersuchten neuronalen Vorgänge sollen Aufschluss darüber geben, wie Informationen (externe Reize, hier Düfte) im Gehirn prozessiert werden. Da die Art und Weise der zentralnervösen Verarbeitung unmittelbar mit der Anatomie der miteinander verschalteten Gehirnareale zusammenhängt, werden die olfaktorischen Gehirnregionen von *Drosophila* im Folgenden näher erläutert und mit den funktionsgleichen Gehirnarealen anderer Organismen verglichen.

Die olfaktorische Codierung beginnt mit der Duftrezeption: Duftmoleküle treffen auf Duftrezeptorproteine, die in den Dendriten von Rezeptorneuronen exprimiert sind. In Mäusen exprimieren individuelle Rezeptorneurone nur eines oder wenige der ca. 1000 existierenden Rezeptorgene (Buck und Axel, 1991, Levy et al., 1991, Ben-Arie et al., 1994). Die Rezeptorneurone sind also funktionell unterschiedlich und werden nur durch definierte Düfte aktiviert (Ngai et al., 1993). Die einzelnen Rezeptorneurone ziehen mit hoher Präzision zu je 2 der insgesamt 1800 Glomeruli

im olfaktorischen Bulbus. Ein bestimmter Duft aktiviert also ein definiertes "Set" von Rezeptorneuronen, die die Duftinformation in ein Duftidentitätsmuster im Bulbus überschreiben: Die Rezeption eines bestimmten Duftes resultiert in einem für ihn charakteristischen Glomeruliaktivitätsmuster (Mombaerts et al., 1996). Bei *Drosophila* sind ca. 1500 olfaktorischen Rezeptorneurone in den Antennen und Maxillarpalpen lokalisiert (Stocker et al., 1993). Individuelle Rezeptorneurone exprimieren auch hier nur wenige der 57 Rezeptorgene (Clyne et al., 2000; Vosshall et al., 2000; Guo et al., 2001), sind also auch funktionell unterschiedlich. Sie enden in den paarweise ausgebildeten Antennalloben, wo sie die präsynaptische Eingangsregion der 43 Glomeruli bilden (Laissue et al., 1999). Die hier auftretende axonale Konvergenz ähnelt also enorm dem Verschaltungsmuster des olfaktorischen Bulbus der Vertebraten: In beiden Systemen terminieren die sensorischen Neurone, die einen bestimmten Rezeptortyp exprimieren, in nur einem oder wenigen Glomeruli.

Das aus dem Konvergenzprinzip resultierende duftinduzierte Aktivitätsmuster von funktionellen Einheiten (Glomeruli), der so genannte "glomeruläre Code", ist ein im gesamten Tierreich weit verbreiteter Mechanismus der Duftverarbeitung: Arbeiten an Zebrafisch (Vertebrata) haben gezeigt, dass die neuronale Repräsentation von Düften durch die kombinatorische Aktivierung eines für den gegebenen Duft spezifischen Sets von Glomeruli im Bulbus erreicht wird (Friedrich und Korsching, 1997 und 1998; Fuss und Korsching, 2001). Rubin et al. (1999) konnten an der Ratte (Vertebrata) nachweisen, dass Düfte und verschiedene Duftkonzentrationen durch distinkte räumliche Glomeruli – Aktivitätsmuster codiert sind. Dasselbe Prinzip macht sich auch der Antennallobus der Invertebraten, das strukturelle und funktionelle Analogon zum olfaktorischen Bulbus der Vertebraten, zu Nutze: Intensive Optical Imaging Experimente an der Honigbiene (Lieke, 1993; Joerges et al., 1997; Galizia und Menzel, 2001; Sachse und Galizia, 2003; Sandoz et al., 2003) haben auch hier den glomerulären Code, d.h. die duftspezifische räumliche Aktivierung eines für den gegebenen Duft spezifischen Sets von Glomeruli bestätigt. Untersuchungen an weiteren Insekten lieferten identische Ergebnisse: Schon 1984 konnten Rodriguez und Buchner mittels Deoxyglucose – Mapping bei *Drosophila* nachweisen, dass die olfaktorische Stimulation ein kombinatorisches Set von Glomeruli in den Antennalloben der Fruchtfliege aktiviert. Calcium Imaging Experimente an den Antennalloben der Ameise *Camponotus rufipes* (Galizia und Menzel, 1999) und der

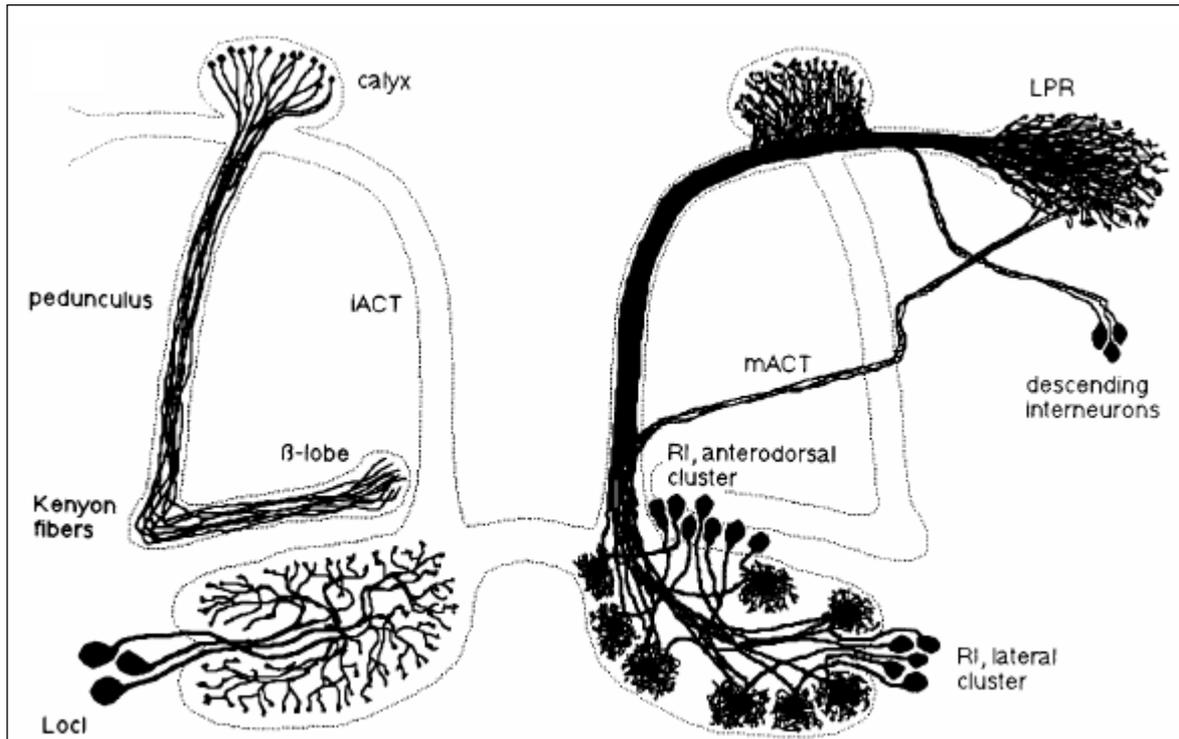
Motte *Spodoptera littoralis* (Carlsson et al., 2002) bestätigen ebenfalls den kombinatorischen glomerulären Code.

Wie bereits erwähnt bilden die Rezeptorneurone das präsynaptische Neuropil der Antennalloben aus. Sie innervieren die nachgeschalteten postsynaptischen Dendriten der Projektionsneurone. In *Drosophila* konvergieren ca. 1500 Rezeptorneurone auf 150 – 200 Projektionsneurone (Jefferis et al., 2001) und sind so am beschriebenen glomerulären Code mitbeteiligt. Die Signalintegration im Insekten – Antennallobus ist jedoch nicht nur Ergebnis der starken Konvergenz, sondern resultiert auch aus dem Zusammenspiel mit intrinsischen inhibitorischen Netzwerken im Antennallobus, die lateral mit den Projektionsneuronen verschaltet sind und somit die von den Rezeptorneuronen eingehenden Duftinformationen prozessieren: Sie verstärken sowohl die räumlichen Muster des glomerulären Codes durch eine Art "Kontrast – Verschärfung" (Sachse und Galizia, 2002 und 2003) als auch die temporale Synchronisierung der Projektionsneuronen – Antworten (Laurent et al., 1998).

Das anatomische Analogon zu den Projektionsneuronen der Invertebraten sind die Mitralzellen der Vertebraten. Im Zebrafisch (Vertebrata) greifen ca. 350 bis 650 Mitralzellen die Duftinformation aus dem olfaktorischen Bulbus ab, und leiten sie an höhere Gehirnzentren weiter. Elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass eine Duftstimulation eine schnelle Oszillation des lokalen Feldpotentials (20 – 30 Hz) aller Mitralzellen zur Folge hat. Duftspezifische Antworten zeigen die Mitralzellen in Form eines langsamen (einige hundert Millisekunden) räumlichen Aktivitätssmusters: Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die Repräsentation eines bestimmten Duftes in den Mitralzellen kontinuierlich über die Zeit hinweg verändert, d.h. unterschiedliche Düfte zeigen unterschiedliche zeitliche Aktionspotentialmuster. Dabei steigt der Unterschied der Mitralzellenantworten mit der Zeit an: Zu Beginn des Duftstimulus ähneln sich die Feuermuster für verschiedene Düfte, mit andauerndem Stimulus verschärfen sich jedoch die Unterschiede im Muster verschiedener Düfte. Daraus resultiert ein höheres Maß an Duftdiskriminierung (Friedrich und Laurent, 2001). D.h. neben der räumlichen Codierung eines bestimmten Duftes in Form des glomerulären Codes konnte für Zebrafisch auch eine zeitliche Codierung der Düfte nachgewiesen werden. Die Mitralzellen der Vertebraten

leiten die Duftinformation weiter an den olfaktorischen Cortex, der wiederum in Verbindung mit weiteren höheren Gehirnzentren, wie dem limbischen System (vermittelt emotionale und physiologische Effekte von Düften) oder dem Neocortex, steht. An Mäusen (Vertebrata) konnte nachgewiesen werden, dass die Duftinformation der Mitralzellen auf eine stereotypische sensorische Karte im olfaktorischen Cortex übertragen wird (Zou et al., 2001). Dabei zeigen verschiedene Düfte überlappende Aktivitätsmuster, die zwischen verschiedenen Individuen gleich sind. Die Tatsache, dass das Aktivitätsmuster eines bestimmten Duftes über den gesamten Cortex ungleichmäßig verteilt ist, spricht dafür, dass der olfaktorische Cortex seine Information an verschiedene nachgeschaltete höhere Gehirnzentren weitergibt, die alle unterschiedliche Funktionen aufweisen, jedoch bisher weitgehend unerforscht sind.

Bei den Invertebraten bilden vor allem die Projektionsneurone das postsynaptische Neuropil des Antennallobus aus. Bei *Drosophila* ziehen sie in zwei Trakten zum lateralen Protocerebrum (Abb. 1.3). Dabei verlaufen die meisten Neurone im inneren Antennocerebraltrakt: Er innerviert en passant den Calyx und trägt so zum präsynaptischen Eingangsnuropil des Pilzkörpers bei. Die restlichen Projektionsneurone bilden den medianen Antennocerebraltrakt aus und ziehen direkt zum lateralen Protocerebrum (Stocker et al., 1997). Die Projektionsneurone zeigen wie die Rezeptorneurone ein genetisch determiniertes Verzweigungsmuster im Antennallobus (Jefferis et al., 2001). Auch die axonalen Projektionen und Verzweigungen im lateralen Protocerebrum sind stereotypisch: Die anterodorsalen und lateralen Projektionsneurone ziehen über den inneren Antennocerebraltrakt, die ventralen Projektionsneurone über den medianen Trakt zu den höheren Gehirnzentren und zeigen dabei ganz distinkte axonale Verläufe und Innervationsgebiete im lateralen Protocerebrum (Marin et al., 2002; Wong et al., 2002). Auffällig ist dabei, dass die Projektionsneurone, die in ähnlichen Arealen des lateralen Protocerebrums terminieren, ihren neuronalen Input von benachbarten Glomeruli beziehen. Außerdem ist das stereotypische Verzweigungsmuster im lateralen Protocerebrum durch eine starke Überlappung der einzelnen Projektionsneurone charakterisiert, die zumeist ein großes Volumen im lateralen Protocerebrum einnehmen (Marin et al., 2002). In ihrer Ganzheit bietet die anatomische Stereotypie der Rezeptorneurone und Projektionsneurone also die



**Abb. 1.3** schematische Darstellung ausgewählter olfaktorischer Neurone von *Drosophila* (Abb. entnommen aus Stocker et al., 1997). Dargestellt sind die bilateralsymmetrischen Antennalloben, Pilzkörper und laterale Protocerebra.

**Rechte Seite:** Projektionsneurone (= PNs oder relay Interneurons RI). Die Zellkörper der PNs clustern anterodorsal, lateral und ventral (nicht abgebildet) um den Antennallobus herum. Ihre Dendriten bilden das postsynaptische Neuropil der Glomeruli und ihre Axone ziehen über den medianen Antennocerebraltrakt (mACT) direkt, oder über den inneren Antennocerebraltrakt (iACT) indirekt, ins laterale Protocerebrum (LPR). Die PNs des iACT innervieren en passant den Calyx des Pilzkörpers.

**Linke Seite:** Die Duftinformation wird am Calyx des Pilzkörpers von den Dendriten der Kenyonzellen abgegriffen. Ihre Axone erstrecken sich parallel durch den Pedunculus zu den Pilzkörperloben. Dort verzweigen sich die Kenyonzellen in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\alpha'$ -,  $\beta'$ -Loben (nicht abgebildet) oder verlaufen unverzweigt in den  $\gamma$ -Lobus. Außerdem abgebildet: Lokale Interneurone (LOCI) im Antennallobus.

Möglichkeit einer Übertragung des glomerulären Codes in ein duftspezifisches, räumliches Aktivitätsmuster auf die höheren Gehirnzentren, und bildet somit die Grundlage für ein stereotypes olfaktorisches Verhalten von *Drosophila*.

Elektrophysiologische Untersuchungen an anderen Insekten postulieren eine räumlich – zeitliche Duftrepräsentation im Gehirn. Laurent et al. (1996) und Stopfer et al. (2003), konnten an den Projektionsneuronen von Heuschrecken (Invertebrata) nachweisen, dass unterschiedliche Düfte und unterschiedliche Duftkonzentrationen

duft – und konzentrationspezifische zeitliche Aktivitätsmuster evozieren. Dabei wird die Duftqualität nicht unabhängig von der Duftquantität codiert, sondern beide Informationen sind im Feuermuster der Projektionsneurone enthalten. Elektrophysiologische Untersuchungen an den Projektionsneuronen der Honigbiene (Stopfer et al., 1997) sowie an den Projektionsneuronen von *Drosophila* (Wilson et al., 2004) konnten ebenfalls eine duftspezifische zeitliche Codierung der Duftidentität nachweisen.

Wie bereits beschrieben innervieren die Projektionsneurone des inneren Antennocerebraltrakts en passant den Calyx und bilden so ein wichtiges präsynaptisches Eingangsneuopil des Pilzkörpers. Die Duftinformation wird an den Calyces von den Dendriten der ca. 2500 Kenyonzellen pro Pilzkörperseite abgegriffen, deren Axone sich parallel von je einem Calyx, am Pedunculus entlang, zu den Pilzkörperloben erstrecken (Abb. 1.3). Dort verzweigen sich die Kenyonzellen in  $\alpha$ -, $\beta$ - und  $\alpha'$ -, $\beta'$ -Loben oder verlaufen unverzweigt in den  $\gamma$ -Lobus (Crittenden et al., 1998). Die Pilzkörper stellen die Zentren für das mit Geruch assoziierte Lernen dar (Heisenberg, 2003). Hier konvergieren konditionierte Reize (Duft) und nicht – konditionierte Reize (Belohnung oder Bestrafung) (de Belle und Heisenberg, 1994; Schwärzel, 2003). Um weitere Einblicke in die olfaktorische Funktion der Pilzkörper zu erlangen, untersuchten Wang et al. (2003) mittels T – Maze Experimenten an *Drosophila* die Auswirkung von *shibire*<sup>ts1</sup> – Expression in den Pilzkörpern auf das olfaktorische Verhalten der Tiere: Durch die Expression von UAS: *shibire*<sup>ts1</sup> mit der GAL4 – Pilzkörpertreiberlinie 238Y wird die synaptische Übertragung in den Kenyonzellen blockiert, der Pilzkörper fällt praktisch aus. Solche Fliegen zeigen für hoch konzentrierte Düfte (= aversive Düfte) ein wildtypisches Fluchtverhalten, für niedrig konzentrierte Düfte (= attraktive Düfte) zeigen sie jedoch kein wildtypisches Annäherungsverhalten. Aus den Ergebnissen folgern die Autoren, dass die olfaktorische Information für "attraktiv" im Pilzkörper verarbeitet wird, und die Information "aversiv" also im lateralen Protocerebrum codiert sein muss, da es neben dem Pilzkörper das einzige Gehirnzentrum ist, das von den Projektionsneuronen innerviert wird. Dieser erste Ansatz einer räumlichen Arbeitsteilung in der Zuweisung von positiven oder negativen Dufteigenschaften im Fliegengehirn, besitzt jedoch zwei Schwächen: Zum einen konnten die Autoren nicht befriedigend nachweisen, dass das Ausbleiben des Annäherungsverhalten causal zur Pilzkörperblockade ist, es

kann sich hierbei auch um einen Effekt der sehr niedrigen Duftkonzentration handeln, zum anderen führt die Expression von UAS: *shibire<sup>ts1</sup>* mit der GAL4 – Pilzkörper – Treiberlinie 238Y nur zum Ausfall von ca. 60% der Kenyonzellen, d.h. eine totale Blockade des Pilzkörpers liegt nicht vor. In einem ähnlichen Versuchsansatz blockierten Heimbeck et al. (2001) durch ektopische UAS: Tetanustoxin – Expression mittels der GAL4 – Projektionsneuronen – Treiberlinie GH146 zweidrittel der Projektionsneurone von *Drosophila*. Als Folge des neuronalen Ausfalls zeigen die Tiere Defekte in der Detektion von niedrig konzentrierten Düften und im männlichen Paarungsverhalten. Diese Ergebnisse, zusammen mit Ergebnissen von Untersuchungen an Fliegen denen der Pilzkörper komplett fehlt, führen die Autoren zu dem Schluss, dass die direkte Innervierung des lateralen Protocerebrums über den medianen Antennocerebraltrakt, d.h. unter Umgehung des Pilzkörpers, für die Prozessierung von erfahrungsunabhängigem Verhalten zuständig ist.

Die Duftrepräsentation in den Kenyonzellen des Pilzkörpers ist gegenwärtig noch Thema spekulativer Diskussionen. Heisenberg (2003) betrachtet den Pilzkörper als Koinzidenzdetektor: Komplexe Duftgemische zeigen überlappende glomeruläre Aktivitätsmuster in den Antennalloben. Diese Aktivitätsmuster werden von den entsprechenden Projektionsneuronen über den inneren Antennocerebraltrakt in die präsynaptische Eingangsregion des Calyx transferiert. Dort könnten die postsynaptischen Kenyonzellen als Koinzidenzdetektoren wirken, d.h. eine bestimmte Kenyonzelle wird erst dann aktiviert, wenn alle mit ihr verschalteten Projektionsneurone ebenfalls aktiv sind (Heisenberg – Modell: 1 Kenyonzelle ist mit 3 Projektionsneuronen verschaltet). Aufgrund der Hypothese, dass für jede mögliche Kombination von Projektionsneuronen (Heisenberg – Modell: jede mögliche Kombination von 3 Projektionsneuronen) eine nachgeschaltete Kenyonzelle vorhanden ist, könnte die beschriebene Koinzidenzdetektion alle möglichen verschiedenen glomerulären Aktivitätsmuster in räumliche Aktivitätsmuster der Kenyonzellen übertragen. Das heißt, komplexe Duftgemische, wie auch monomolekulare Düfte, sollten als “Sets“ von spezifisch aktivierten, über den gesamten Calyx verteilten Kenyonzellen repräsentiert sein. Unterstützt wird diese Hypothese von elektrophysiologischen Untersuchungen an der Heuschrecke: Perez – Orive et al. (2002) geben die Wahrscheinlichkeit einer über alle Projektionsneurone gemessenen duftinduzierten Aktivierung, mit  $p = 0,64$  an, wohingegen die

Kenyonzellen unter gleichen Umständen nur eine Aktivierungswahrscheinlichkeit von  $p = 0,11$  zeigen. In den elektrophysiologischen Aufnahmen ihrer Arbeit zeigten die duftinduzierten Antworten der Projektionsneurone typischerweise 5 – 30 Aktionspotentiale, wohingegen die Kenyonzellen mit nur 1 oder 2 Aktionspotentialen auf die 17 getesteten Düfte reagierten. Im Vergleich zu den Projektionsneuronen haben die Kenyonzellen also eine reduzierte Aktivierungswahrscheinlichkeit und Signalstärke. Außerdem konnte bei den Experimenten festgestellt werden, dass das räumliche Muster der aktivierten Kenyonzellen über dem gesamten Calyx verstreut ist. Diese Ergebnisse sprechen für das Koinzidenzdetektor – Modell des Pilzkörpers, der demnach wie eine Art Filter die neuronale Information der Antennalloben verarbeiten könnte.

Die ersten Einblicke in die räumliche olfaktorische Codierung der Pilzkörper von *Drosophila* erlaubt die *in – vivo* Calcium Imaging Arbeit von Wang et al. (2001): Mit dem konventionellen Farbstoff Calcium Green wurden ca. 70 Somata von Kenyonzellen angefärbt und gezeigt, dass verschiedene Düfte und Duftkonzentrationen ganz bestimmte duftspezifische räumliche Aktivitätsmuster im Calyx evozieren. Dabei waren die Aktivitätsmuster für individuelle Düfte über den gesamten gemessenen Calyxbereich verstreut. Das entspricht den elektrophysiologischen Untersuchungen von Perez – Orive et al. (2002).

## 1.4 Aufgabenstellung

Bei der vorliegenden Arbeit liegt eine zweigeteilte Aufgabenstellung vor: Zum einen musste die Technik des *in – vivo* Calcium Imagings mittels genetisch codierter Sensoren bei *Drosophila melanogaster* erst komplett neu etabliert werden, zum anderen sollte mit der neuen Technik die Repräsentation von Düften in den olfaktorischen Bahnungen der Fruchtfliege untersucht werden.

Der erste Schritt in dieser noch neuartigen Disziplin war der Entwurf einer *in – vivo* Präparation, mittels der ein optischer Zugang zum Fliegenhirn geschaffen werden sollte. Um zu testen, ob das Fliegenhirn seine neuronalen Funktionen nach der Präparation noch wahrnehmen kann, wurde das optomotorische Verhalten von Tieren untersucht, die das Cameleon 2.0 (Miyawaki et al., 1997) im Pilzkörper

exprimieren. Auf molekularbiologischer Ebene bestand eine Aufgabe in der Lokalisation der Insertion des Cameleon 2.0 – Konstruktes mittels inverser PCR. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Sören Diegelmann durchgeführt. Die Herstellung von verbessertem Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) aus Cameleon 2.0 und die anschließende Keimbahntransformation, zusammen mit der Charakterisierung der neuen Cameleon 2.1 – Fliegenlinien, wurde ebenfalls von Sören Diegelmann durchgeführt (Diegelmann et al., 2002). Um die Funktionsfähigkeit des neuen Cameleon 2.1 – Konstrukts zu überprüfen, wurde eine *in – vitro* Analyse mit rekombinantem His – Tag – Cameleon 2.1 – Protein durchgeführt. Dazu war es nötig, eine Photomultiplier – Messanordnung mit dazugehöriger Datenaufnahme und Datendarstellungssoftware zu entwickeln, die in der Lage ist, die Cameleon 2.1 – Fluoreszenz zu detektieren.

Die ersten *in – vivo* Calcium Imaging Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Giovanni Galizia am Lehrstuhl für Neurobiologie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Dabei sollte zum einen die Fragestellung bearbeitet werden, ob die Duftrepräsentation in den Antennalloben von *Drosophila* ebenfalls dem für andere Organismen bereits beschriebenen glomerulären Code (Lieke, 1993; Mombaerts et al., 1996; Joerges et al., 1997; Friedrich und Korsching, 1997 und 1998; Rubin et al., 1999; Fuss und Korsching, 2001; Galizia und Menzel, 2001; Sachse und Galizia, 2003; Sandoz et al., 2003) unterliegt, und zum anderen, wie verschiedene Düfte im Calyx repräsentiert sind, d.h wie die Prozessierung der Duftidentität von den Antennalloben auf höhere Gehirnzentren funktioniert – ein Ansatz der bis dahin noch nicht bearbeitet wurde. Dazu wurde die GAL4 – UAS – Linie GH146 – UAS: Cameleon 2.1 verwendet (Fliegen heterozygot für beide P – Element Insertionen). Die GAL4 – Treiberlinie GH146 (Stocker et al., 1997) exprimiert den Calciumsensor in ca. 90 von ca. 150 Projektionsneuronen (s.a. Abb. 1.3).

Aufgrund dieser ersten erfolgreichen Experimente, wurde der Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie der Universität Würzburg, durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, eine eigene Imaging Apparatur der Firma Visitron Systems (Puchheim, Deutschland) bewilligt. Vornehmste Aufgabe war es nun, die Messprozedur mit dieser neuen Apparatur zu etablieren, d.h. die einzelnen

Komponenten aufeinander abzustimmen und die mitgelieferte Datenaufnahme – und Auswertungssoftware auf unsere Bedürfnisse abzustimmen. Ein wichtiger Funktionstest für das Paket aus Imaging – Apparatur, Software, *in – vivo* – Präparation und der durch Rekombination hergestellten homozygoten Cameleon 2.1 – Fliegen, waren die Experimente zur Depolarisation des gesamten Fliegengehirns mit Kaliumchlorid. Sie besitzen keine physiologische Aussagekraft, liefern aber im Vergleich zu den Duftstimuli sehr große Calciumsignale im Fliegengehirn, ideal also für einfache Funktionstests. Nach der Etablierungsarbeit konnten neue physiologische Fragestellungen angegangen werden: Nachdem mit den Imaging Experimenten an den Antennalloben und Calyces von *Drosophila* schon ein postsynaptisches und ein präsynaptisches Neuropil der olfaktorischen Bahnungen untersucht werden konnte, lag es nahe, auch das dritte durch die GAL4 – Linie GH146 zugängige Gehirnareal, das laterale Protocerebrum, zu analysieren (s.a. Abb. 1.3). Besonders spannend ist dieses Gehirnzentrum, weil ihm bisher bei den Untersuchungen von duftinduzierter neuronaler Aktivität wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Die Duftexperimente am lateralen Protocerebrum, die ebenfalls mit homozygoten GH146 – UAS: Cameleon 2.1 – Tieren durchgeführt wurden, sollten folgende Fragenstellungen erörtern: Sind duftvezierte, also physiologische Calciumsignale im lateralen Protocerebrum überhaupt messbar? Wenn ja, wie unterscheiden sich die Calciumsignale von verschiedenen Düften und bei unterschiedlichen Konzentrationen? Ändert sich mit der Konzentration die Signalstärke und / oder ändert sich die Größe und Form des reagierenden neuronalen Areals? Eng damit verbunden stellt sich die Frage, ob verschiedene Düfte im lateralen Protocerebrum räumlich unterschiedlich repräsentiert sind, d.h. ist die Duftidentität ähnlich wie in den Antennalloben anderer Organismen in einem räumlichen neuronalen Muster codiert? Insgesamt sollen die Antworten auf diese Fragen Aufschluss darüber geben, welchen Mechanismen die Prozessierung olfaktorischer Information, ausgehend von den Antennalloben, der ersten zentralnervösen olfaktorischen Instanz, über die Calyces der Pilzkörper, bis hin zum lateralen Protocerebrum, also zwei nachgeschalteten höheren Gehirnzentren, im Fliegengehirn von *Drosophila melanogaster* unterliegt.

## 2 Material

### 2.1 Enzymatische Manipulation der DNA

#### Restriktionsendonukleasen

<i>Enzyme</i>	<i>Anbieter</i>	<i>Benutzter Puffer</i>
HaellI	Gibco	BRL2
HpaII	Gibco	BRL8

#### Andere Enzyme

<i>Enzyme</i>	<i>Anbieter</i>
RNase A	Sigma
T4 DNA Ligase	NEB, MBI
Taq Polymerase	Peqlab, QIAGEN
Protease K	Böhringer

Die jeweiligen Enzyme wurden mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern verwendet.

### 2.2 Kits

QIAquick Gelextraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN

### 2.3 Nukleotide

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Peqlab
------------------------	--------

## 2.4 DNA–Größenstandards

1 kb plus DNA ladder	NEB
Gene Ruler 1 kb DNA ladder	MBI
100 bp DNA ladder	Gibco BRL
2-log DNA ladder	NEB

## 2.5 Oligonukleotide

Hersteller: MWG Biotech AG

Cameleon 2.0		
Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung (Anhang)
72-Hae-5	5'- CTT GTT TTT ATT GGC AC -3'	Inverse PCR

## 2.6 Sequenzierungen

Verwendetes Kit:

ABI PRISM™ *BigDye*™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit  
(PE Applied Biosystems)

Die Sequenzierungen wurden im vollautomatischen ABI 310 durchgeführt nach der Methode von F. Sanger (1977) durchgeführt.

## 2.7 Plasmide

pP{UAST}

Brand und Perrimon, 1993

## 2.8 Fliegenstämme

Die Aufzucht der Fliegenstämme erfolgte bei 18° C und 25° C. Die Stammhaltung wurde bei 18° C durchgeführt.

Linie	Beschreibung	erhalten von
17D	GAL4 Linie	Pfister, 1997
201y	GAL4 Linie	Yang et al., 1995
SG 18.1	GAL4 Linie	Shymala et al., 1999
GH146	GAL4 Linie	Stocker et al., 1997

Cameleon C2/6l	Cameleon 2.0	Dr. C. Schuster
Cam2.1/ 82	pUAST-Cameleon 2.1	Diegelmann et al., 2002
<i>Cyo/ Sco</i>	Markerlinie	Institut-Stammsammlung
CantonS	Wildtyp Stamm	Institut-Stammsammlung
$w^{1118}$	Wildtyp Stamm	Institut-Stammsammlung
$w^{1118}$ ; TM3 / TM6	Doppelbalancer für das 3. Chromosom	Institut-Stammsammlung

## 2.9 Medien

Eiablageplatten

30 g Agar in 1 l H<sub>2</sub>O lösen

33 g Saccharose in 330 ml Apfelsaft lösen  
nach Abkühlung Vereinigung der Lösungen  
und ausplattieren in Petrischalen

## 2.10 Lösungen

10x TBE

151,4 g TRIS base  
77,3 g Borsäure  
23,3 g EDTA  
in 2,5 l H<sub>2</sub>O lösen

Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)

192 ml Chloroform  
8 ml Isoamylalkohol

Kalium-Acetat 8 M

235,5 g Kaliumacetat  
mit H<sub>2</sub>O auf 300 ml auffüllen

Natrium-Acetat 3 M

40,82 g Natriumacetat  
lösen in 60 ml H<sub>2</sub>O

TE (pH 8,0)

50 ml 1 M Tris- HCl (pH 8,0)  
2 ml 1 M EDTA  
948 ml H<sub>2</sub>O

---

10 x PBS	75,97 g NaCl 12,46 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dihydrat) 4,68 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Dihydrat) Zugabe von 500 ml H <sub>2</sub> O pH einstellen auf 7,4 auffüllen mit H <sub>2</sub> O auf 1 l
10x Ligationsbuffer	2,5 ml 1 M Tris. HCL pH 7,6 0,5 ml 1 M DTT 0,4 ml 0,25 M rATP 0,5 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> 250 µl 10 mg/ml BSA 850 µl H <sub>2</sub> O
Stoppuffer 5x	15% Ficoll 5% SDS 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylencyanol
Homogenisierungspuffer	1 ml 5 M NaCl 2,5 ml 2 M Tris HCl pH 8,0 10 ml 0,25 M EDTA 1,25 µl 20% SDS mit H <sub>2</sub> O auffüllen auf 50 ml vor Gebrauch Zugabe von: 5,5 µl/ ml RNase A (10 mg/ ml) 20 µl/ ml Protease K (10 mg/ ml)
Injektionspuffer	5 mM KCl 0,1 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Injektionslösung	60 µg Transformationsvektor 20 µg Helferplasmid: pUChsπΔ2-3 in 100 µl Injektionspuffer

## 2.11 Imaging – Experimente

Die aufgeführten Chemikalien können von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, von MERCK VWR international, Darmstadt, Deutschland oder von AppliChem, Darmstadt, Deutschland bezogen werden.

### Lösungen

Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure, EGTA	versch. Konzentrationen
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub>	versch. Konzentrationen
Kaliumchlorid, KCl	versch. Konzentrationen
Hepes – KOH, pH = 7,4	100 mM

Ringer – Lösung nach Estes et al. (1996):

NaCl	130 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
Sucrose	36 mM
Hepes – NaOH , pH = 7,3	5 mM
Lösen in 100 ml dest. H <sub>2</sub> O	

### Düfte

Die verwendeten Düfte können von der SIGMA – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland bezogen werden.

Benzaldehyd (purum), 1-Butanol (purum), Ethylacetat (purum), Isoamylacetat (purum), 4-Methylcyclohexanol (purum), 1-Octanol (purum) und Propionsäure (purum).

Um verschiedene Verdünnungsstufen der Düfte anzusetzen, wird handelsübliches Mineralöl (SIGMA – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologie

#### 3.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1.1 Isolierung genomischer DNA

Die genomische DNA von jeweils ca. 50 adulten Fliegen wurde nach folgendem Schema isoliert:

1. Homogenisierung der Fliegen in 180  $\mu$ l PBS mittels eines eingeschliffenen Glaspotters bzw. motorgetriebenen Teflonstößels.
2. Zugabe von 20 $\mu$ l RNase A und Inkubation des Homogenats bei Raumtemperatur für 5 Minuten.
3. Zugabe von 25 $\mu$ l Proteinase K.
4. Durchführung der Schritte 3 – 9 des DNA Mini Kits von QIAGEN.

##### 3.1.1.2 Verdau genomischer DNA

Die gewonnene genomische DNA wurde je nach Experiment mit den jeweiligen Restriktionsenzymen nach folgendem Muster verdaut. Im Allgemeinen gilt, pro  $\mu$ g DNA 5 Units des Enzyms, wobei der Anteil des Enzyms am Gesamtvolumen 10% nicht übersteigen soll.

15  $\mu$ l gDNA (d.h. ca. 10 ng)

2  $\mu$ l Restriktionsenzym

2  $\mu$ l jeweiliger Puffer

1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

20  $\mu$ l Restriktionsansatz für 2h bei 37°C inkubiert

Nach dem Verdau können ca. 7  $\mu$ l entnommen werden für den Auftrag auf ein Testgel.

### **3.1.1.3 DNA – Fällung**

#### **Ethanol-fällung**

Diese Methode ist besonders geeignet für geringe DNA-Konzentrationen, dabei gilt allgemein: 1 Volumen + 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat + 2,5 Volumen Ethanol (100%)

1. Pipettieren der Lösung nach oben beschriebenen Muster
2. Fällung der DNA bei  $-20^{\circ}$  C für mindestens 90 Minuten oder über Nacht
3. Zentrifugation für mindestens 15 Minuten, danach Überstand entfernen
4. Waschen der DNA mit 1 Volumen Ethanol (70%)
5. Zentrifugation und Entfernung des Überstandes
6. Lufttrocknung und Resuspendieren der DNA in  $H_2O$  oder TE

#### **Isopropanol-fällung**

Diese Methode ist besonders geeignet bei hohem DNA – Anteil mit wenig RNA und Proteinen, dabei gilt allgemein: 1 Volumen + 0,7-0,8 Volumen Isopropanol

1. Pipettieren der Lösung nach oben beschriebenen Muster
2. Fällung der DNA bei RT für mindestens 10 Minuten
3. Zentrifugation für 30 Minuten, danach Überstand entfernen
4. Waschen der DNA mit 1 Volumen Ethanol (70%)
5. Zentrifugation und Entfernung des Überstandes
6. Lufttrocknung und Resuspendieren der DNA in  $H_2O$  oder TE

### **3.1.1.4 Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung**

Um DNA – Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen wurde das Verfahren der Gelelektrophorese angewandt. Die Konzentration der Gele variierte zwischen 0,8 und

1% und dient zur Auftrennung von DNA – Fragmenten zwischen 10 und 1kb. Dabei wurde die jeweilige Menge Agarose (2g für ein 200 ml großes Gel) in TBE – oder TAE – Puffer in der Mikrowelle gelöst. Nach der Abkühlung auf 60° C wird dem Gel die jeweilige Menge Ethidiumbromid (10mg/ml) zugegeben. Dabei gilt für ein kleines Gel (60 ml) 3 µl und für ein großes Gel (200 ml) die Menge 15 µl. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wird der Gelschlitten in die mit TBE oder TAE gefüllte Elektrophorese – Kammer überführt. Es wurde eine Spannung von 20 – 150 V angelegt.

### **3.1.1.5 Gelaufreinigung**

DNA – Fragmente, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, können durch diese Methode wieder aus dem Gel eluiert werden. Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe des QIAquick Gelextraction Kit. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt, lediglich der optionale Schritt wurde umgangen und die DNA in 30 µl dH<sub>2</sub>O aufgelöst.

### **3.1.1.6 PCR – Aufreinigung**

PCR – Fragmente können durch diese Methode aufgereinigt werden und weiterführenden Schritten zugeführt werden. Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt, lediglich der optionale Schritt wurde umgangen und die DNA in 30 µl dH<sub>2</sub>O aufgelöst.

### **3.1.1.7 Ligation von DNA – Fragmenten**

Mit Hilfe der Ligation können DNA – Fragmente in Vektoren ligiert oder im besonderen Fall selbstligiert werden. Dabei wurden ca. 50 ng der Vektor – DNA und ein ca. dreifacher molarer Überschuss an Insert – DNA verwendet. Ein Ligationsansatz enthielt allgemein:

linearer Vektor  
Insert-DNA  
2 µl 10x Ligationspuffer  
1 µl T4 Ligase  
20 µl Gesamtvolumen

### 3.1.1.8 DNA – Konzentrationsbestimmung

Gewonnene DNA wurde 1:50 verdünnt (98 µl H<sub>2</sub>O und 2 µl der Probe) und mit dem Eppendorf Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Als Referenzprobe wurde dabei 100 µl H<sub>2</sub>O verwendet. Die Umrechnung des gemessenen OD – Wertes auf die Konzentration der Probe erfolgte nach folgender Formel:

$$c = \text{Abs.-Wert} * 50df * 50 [ \mu\text{g/ml} ]$$

50 df = verwendeter Verdünnungsfaktor

50 µg/ml, dieser Wert gilt für Doppelstrang – DNA;

für Einzelstrang – DNA muss 33 µg/ml eingesetzt werden

### 3.1.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die durchgeführten PCR – Reaktionen wurden nach dem folgenden Schema durchgeführt, dabei gab es je nach benutzten Primerpaaren leichte Abänderungen vom Grundplan:

2,5 µl down Primer (20 µM, Ausgangskonzentration)

2,5 µl up Primer (20 µM, Ausgangskonzentration)

5,0 µl 10x PCR Puffer mit MgCl<sub>2</sub>

5,0 µl dNTPs (2 µM)

5,0 µl Enhancer Solution

2 bis 5 µl DNA template

0,5µl Taq DNA Polymerase

x µl bidest.H<sub>2</sub>O ( Gesamtvolumen 50µl )

Die Reaktion wurde danach mit 50 µl Mineralöl überschichtet, falls die Reaktion im Hybaid Thermocycler durchgeführt wurde. Für den Eppendorf – Gradienten – Thermocycler mit Deckelheizung ist diese Überschichtung nicht nötig. Die Inkubation erfolgte unter folgendem Programm:

- a) 94° C für 2 Minuten
- b) 30 Zyklen: 94° C für 30 Sekunden  
50° C bis 56° C für 30 Sekunden  
72° C für 1 – 4 Minuten (1Minute = 1 kb)
- c) 72° C für 3 Minuten

### 3.1.3 Sequenzierungen

Die jeweiligen Proben wurden mit dem ABI PRISM™ *BigDye*™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit sequenziert. Dieser Kit benutzt markierte Dideoxy – Nukleotide als Terminatoren, dadurch kommt es zu kontrollierten Abbrüchen in der DNA – Synthese. Ein spezielles Sequenzierungssystem ist dann in der Lage die Sequenz der Probe auszuwerten. Die Sequenzreaktion erfolgt in einem Thermocycler und beinhaltet folgende Komponenten:

2,0 µl *Big Dye*  
4,5 µl Primer 2 µM  
370 ng DNA template  
mit H<sub>2</sub>O auffüllen auf 10 µl Gesamtvolumen

Die Reaktion läuft nach folgenden Zyklen ab:

25 Zyklen von je: 96° C für 15 Sekunden  
50° C für 1 Sekunde  
60° C für 4 Minuten

Die Reaktion wurde dann dem Protokoll der ABI PRISM™ Ethanol-fällung folgend aufbereitet und danach durch den ABI 310 analysiert.

### 3.1.4 Inverse PCR

Die Methode folgt den im „Material und Methoden“ – Teil des Papers „An Inverse PCR Screen for the Detection of P-Element Insertions in Cloned Genomic Intervals in *Drosophila melanogaster*“ von Dalby et al. (1995).

Dabei wurden die verwendeten Primer dem pUAST – Vektor angepasst (Lage: siehe Anhang) und die einzelnen Schritte vereinzelt modifiziert.

1. genomische DNA der jeweiligen Fliegenlinie wurde nach der Methode im Punkt 2.1.1.1, d.h. mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit von QIAGEN isoliert
2. Verdau von insgesamt 30 µl der DNA mit den Enzymen HaeIII und HpaII in einem 50 µl Ansatz
3. Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65° C für 20 Minuten
4. Ligation unter Bedingungen, welche die Selbstligation der DNA fördert

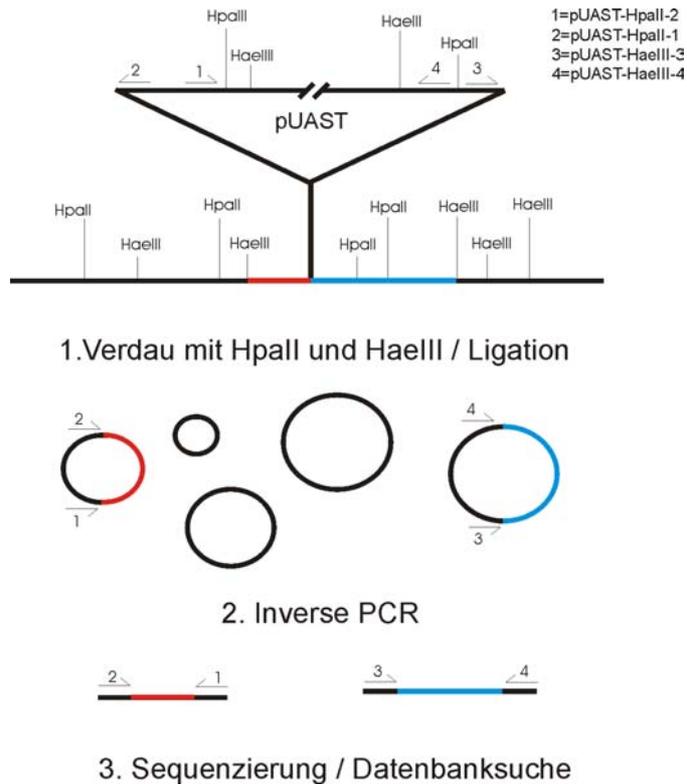
50 µl Verdau  
40 µl Ligasebuffer (10x)  
6 µl T4-Ligase  
304 µl dH<sub>2</sub>O  
400 µl Volumen

Die Ligation wurde für 16 Stunden bei 18° C durchgeführt.

5. Aufbereitung der DNA mittels Phenolisierung und Ethanol-fällung, Resuspendieren der DNA in 100 µl dH<sub>2</sub>O
6. Durchführung der Inversen PCR mit 20 µl DNA als Template, wie in Paragraph 3.1.2 ausgeführt
7. Gelauftrag der Proben und anschließende Gelaufreinigung des Amplifikats laut Protokoll des QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN (2.1.1.4)
8. Bestimmung des DNA – Gehalts und anschließende Sequenzierung des Produkts mit dem jeweiligen Primer

Die erhaltene Sequenz beinhaltet DNA aus dem direkt angrenzenden Bereich der Insertion. Durch Vergleich mit den Datenbanken kann so die genaue Lage der Insertion lokalisiert werden.

In der folgenden Abbildung ist die Methode schematisch dargestellt.



**Abb. 3.1** Schema der Inversen-PCR am pUAST-Vektor, übernommen von Sören Diegelmann (2004).

Die genomische DNA der zu untersuchenden Fliege wird mit den Enzymen HpaII und HaeIII in getrennten Ansätzen verdaut. Anschließend erfolgt eine Selbstligation der Fragmente. Die Produkte dieser Ligation stehen dann als Ausgangstemplate für eine PCR mit den jeweiligen Primern zur Verfügung. Erhaltene PCR-Produkte können dann mit den Primern ansequenziert und einer Datenbankanalyse zugeführt werden.

### 3.1.5 Keimbahntransformation

Um ein transposables Element in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* zu inserieren, wurde eine Keimbahntransformation durchgeführt. Dazu wurden Fliegen des Stammes  $w^{1118}$  vermehrt und ca. 3 Tage alte Fliegen zur Eiablage verwendet. Die Eiablageplatten wurden mit einem Pinselstrich Hefe versehen und die Fliegen für 30 bis 60 Minuten auf diese Platten gesetzt. Die Vorablage wurde verworfen und danach die Fliegen auf neue Ablageplatten transferiert. Mit den Eiern wurde sofort weitergearbeitet, da die Eier für die Injektion nicht älter als 90 Minuten sein sollten. Eventuelle Hefeanhaftungen wurden von den Eiern durch Wasser entfernt. Das Chorion wurde durch eine 90 sekundige Überschichtung der Eier mit 7% Na-Hypochlorid Lösung entfernt. Danach wurden die Embryonen auf ein Gitternetz zur Aufreihung überführt, dabei achtet man auf eine einheitliche Ausrichtung der posterioren Pole. Die aufgereihten Eier können auf einen beschichteten Objektträger überführt werden (n-Heptan) und stehen nach der Trocknung des Klebers (20 bis 30 Minuten in einer Trockenkammer) nun für die Injektion zur Verfügung. Dazu wurden die Embryonen mit Öl überschichtet und auf dem Mikroskopisch so ausgerichtet, dass die posterioren Pole in Richtung der Injektionsnadel (ausgezogene Bor-Silikat-

Glaskapillare) zeigen. Die Injektion erfolgt nur in Embryonen, welche noch keine Polzellen ausgebildet haben, dabei wurde darauf geachtet, dass nur eine geringe Menge Flüssigkeit in die Eier transferiert wurde. Injizierte Embryonen wurden danach in einer 18° C Feuchtekammer gehalten bis die Larven schlüpften. Diese wurden auf Breigläser transferiert und bei 25° C gehalten.

Entwickelte Fliegen wurden mit drei Fliegen des Ausgangsstammes gekreuzt und die Nachkommenschaft auf das Auftreten des veränderten Augenphänotyps untersucht. Pigmentierte Fliegen wurden zur Verbreiterung mit dem Ausgangsstamm gekreuzt.

## 3.2 *in – vitro* Cameleon 2.1 – Funktionsanalyse

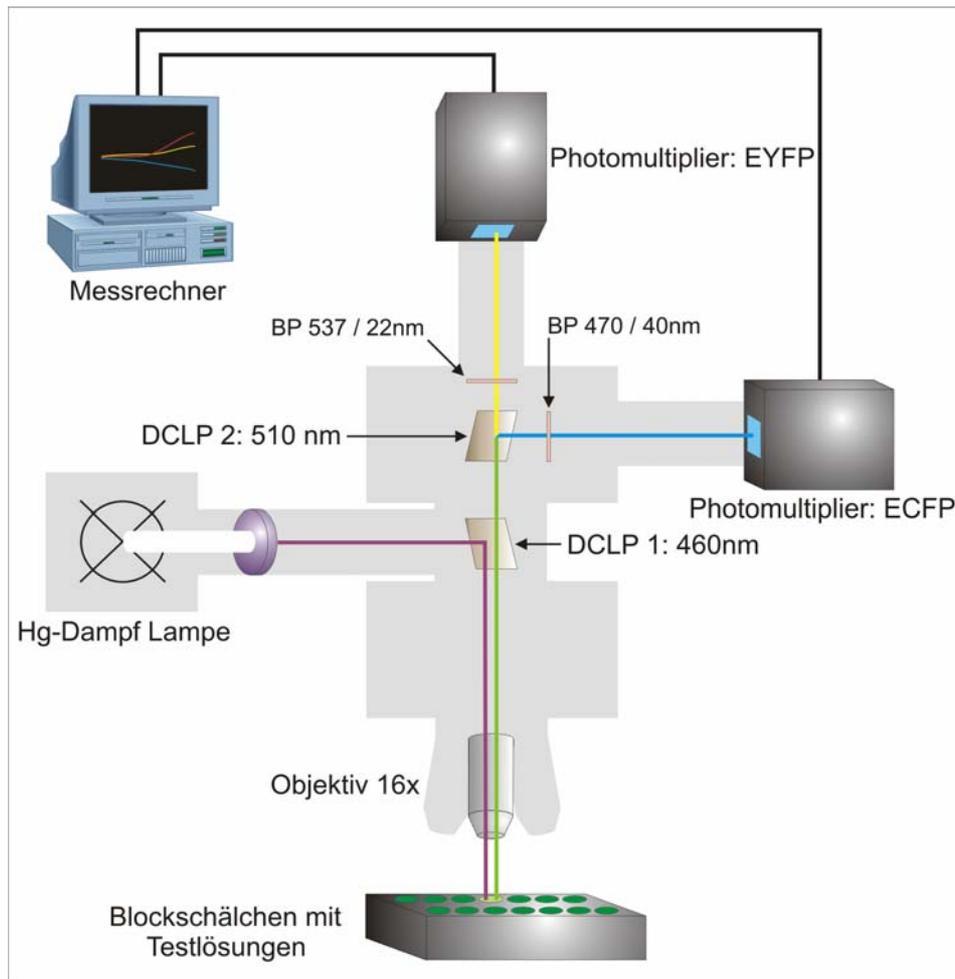
### 3.2.1 Herstellung von rekombinantem His – Tag – Cameleon 2.1 – Protein

Die cDNA von Cameleon 2.1 wurde im pKS – Vektor (pBluescript II KS (+/-), Stratagene) von Sören Diegelmann erhalten. Das Konstrukt wurde über die *NotI* – Schnittstelle in den Vektor pET-28b (+) (Novagen) subkloniert und die Orientierung des Konstrukts mittels *SacI* – Verdau und anschließender Ansequenzierung überprüft. Der Vektor wurde in BL21 – Zellen (Novagen) eingebracht. Die Bakterienflüssigkultur wurde durch IPTG (Roth) – Zugabe induziert, die Zellen nach 3 h Inkubation abzentrifugiert und im Puffer ( 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 300mM NaCl / 10mM Imidazol / Protease – Inhibitor – Tablette (Böhringer) / pH = 8,0 (NaOH)) lysiert. Das Lysat wurde mit Lysozym für 30 min auf Eis inkubiert, sonifiziert, und danach durch einen Filter (45µm – Maschenweite) gepresst. Nach Abzentrifugation (10000g, 20 – 30 min, 4°C) wurde das rekombinante Protein mit 50% Ni – NTA – Material (nach Protokoll des Herstellers, Quiagen) aufgereinigt und lag anschließend als deutlich grün leuchtendes Protein im Elutionspuffer vor. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde eine Messung nach Bradford (Bollag et al., 1996) (BSA – Eichreihe: 2, 5, 10, 15, 20 µg/ml) mittels eines Photometers (BioPhotometer, Eppendorf) durchgeführt.

### 3.2.2 Messapparatur

Die Messapparatur zur Funktionsanalyse des Cameleon 2.1 – Proteins (Abb. 3.2) besteht aus fünf Komponenten: Aufrechtes Mikroskop, Lichtquelle, Filter, zwei Fluoreszenzdetektoren (Photomultiplier) und ein Computer mit eigenhändig programmierter Turbo – Pascal Software (s.a. Anhang, Kapitel 9.4) zur Datenaufnahme, grafischen Darstellung und Weiterverarbeitung der Daten.

Eine Hg – Dampf Lampe mit nachgeschaltetem Anregungsfilter liefert das Anregungslicht von 433nm. Es wird über einen dichroitischen Langpassfilter (DCLP 1: 460nm) auf die Analyselösung geleitet. Die emittierte Fluoreszenz der Probe wird von einem 16x Luftobjektiv gesammelt und passiert DCLP 1. Der zweite dichroitische



**Abb. 3.2** Schema der Messapparatur zur *in – vitro* Cameleon 2.1 – Funktionsanalyse

Eine Hg-Dampf Lampe mit nachgeschaltetem Anregungsfilter liefert das Anregungslicht von 433 nm. Ein dichroitischer Langpassfilter ( DCLP 1: 460nm) leitet das Anregungslicht auf die Analyselösung. Die emittierte Fluoreszenz gelangt über ein 16x Luftobjektiv zurück ins Mikroskopgehäuse, passiert DCLP 1 und wird mittels eines zweiten dichroitischen Langpassfilters (DCLP 2: 510nm) in ihre beiden Komponenten EYFP ( 535nm) und ECFP (485nm) getrennt. Die beiden Wellenlängen werden durch zwei Bandpassfilter (BP EYFP: 537/22nm, BP ECFP: 470/40nm) geleitet und von den entsprechenden Photomultipliern simultan (PM: EYFP, PM; ECFP) detektiert. Die Photomultiplierdaten werden von einem Computer aufgenommen, die Ratio (EYFP/ECFP) berechnet und alle Daten grafisch dargestellt.

Langpassfilter (DCLP 2: 510nm) dient als Strahlungsteiler für die beiden emittierten Wellenlängen des Cameleon 2.1 – Proteins (EYFP: 535nm, ECFP: 485nm): Die EYFP – Fluoreszenz passiert DCLP 2 und gelangt über einen Bandpassfilter (BP EYFP: 537/22nm) zum Fluoreszenzdetektor (Photomultiplier). Simultan wird die ECFP – Fluoreszenz von DCLP 2 auf einen zweiten Bandpassfilter (BP ECFP: 470/40nm) abgeleitet und von einem zweiten Photomultiplier detektiert. Die Photomultiplierdaten werden mittels eines Computers aufgenommen, die Ratio

(EYFP – Fluoreszenz / ECFP – Fluoreszenz) berechnet, und alle Daten grafisch dargestellt.

### **Komponenten der Messapparatur:**

- Mikroskop: Dialux 20, Leitz, Wetzlar, Deutschland
- Objektiv: 16x Luftobjektiv FLUOTAR (16/0,45), Leitz, Wetzlar, Deutschland
- Lichtquelle: Hg-Dampf Lampe (HBO 103W/2)
- Anregungsfilter: Doppel Interferenz Linienfilter, 433nm, HW = 10nm, Schott, Mainz, Deutschland
- Dichroitischer Langpassfilter 1 (DCLP 1): 460nm, AHF Analysetechnik, Thübingen, Deutschland
- Dichroitischer Langpassfilter 2 (DCLP 2): 510 nm, Leitz, Wetzlar, Deutschland
- Bandpassfilter EYFP: 537/22nm, Leitz, Wetzlar, Deutschland
- Bandpassfilter ECFP: 470/40nm, Leitz, Wetzlar, Deutschland
- Photomultiplier EYFP: PM 270C, International Light Inc., Newburyport, USA
- Photomultiplier ECFP: H7712, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland
- Messrechner: 386DX, ESCOM, Schweinfurt, Deutschland

### **3.2.3 Erstellung der Analyselösungen und Messung**

Bei der Herstellung von rekombinantem His – Tag – Cameleon 2.1 – Protein (s.a. Kapitel 3.2.1) ergab sich nach der Aufreinigung eine Ausbeute von 1,1µg Cameleon 2.1 - Protein / 1µl Elutionspuffer. Die im Folgenden verwendeten Volumina an Cameleon 2.1 beziehen sich auf diese Protein / Elutionspuffer – Lösung.

Zur Erstellung der Analyselösungen wurde alternativ 0,85µl, 1,7µl, 3,4µl Cameleon 2.1 eingesetzt. Als Lösungsmittel diente HEPES-Puffer. Zur Kontrolle der Cameleon 2.1 – Funktion wurden Messreihen mit steigenden  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentrationen in den Analyselösungen durchgeführt. Zur Kontrolle der Reversibilität der  $\text{Ca}^{2+}$ - Bindung an

das Protein wurde in jeder Messreihe eine Probe mit 1µl EGTA versetzt. Endvolumen aller Analyselösungen war 50µl.

### Beispiel einer Messreihe mit 6 Analyselösungen:

Probe 1: 0,85µl Cameleon 2.1 + 49,15µl HEPES-Puffer

Probe 2: 0,85µl Cameleon 2.1 + 48,15µl HEPES-Puffer + 1µl CaCl<sub>2</sub> (0,01mM Endkonzentration)

Probe 3: 0,85µl Cameleon 2.1 + 48,15µl HEPES-Puffer + 1µl CaCl<sub>2</sub> (0,1mM Endkonzentration)

Probe 4: 0,85µl Cameleon 2.1 + 48,15µl HEPES-Puffer + 1µl CaCl<sub>2</sub> (1mM Endkonzentration)

Probe 5: 0,85µl Cameleon 2.1 + 48,15µl HEPES-Puffer + 1µl CaCl<sub>2</sub> (10mM Endkonzentration)

Probe 6: 0,85µl Cameleon 2.1 + 47,15µl HEPES-Puffer + 1µl CaCl<sub>2</sub> (10mM Endkonzentration)  
+ 1µl EGTA (10mM Endkonzentration)

Die Analyselösungen einer Messreihe wurden in einem schwarzen Blockschälchen (Abb. 3.2) angesetzt. Das Blockschälchen wurde auf dem Mikroskopisch platziert und jede Probe einer Messreihe für zwei Sekunden vermessen. Die Messung einer Probe lieferte ca. 150 Datenpunkte für EYFP und 150 für ECFP. Der Mittelwert aus den jeweiligen 150 Datenpunkten stellt den Messwert für die Probe dar.

### 3.2.4 Berechnung und Darstellung der Daten

Die Rohdaten der EYFP – und ECFP – Fluoreszenz werden von den beiden Photomultiplier (Abb. 3.2) geliefert. Die Ratio wird als EYFP – Fluoreszenz / ECFP – Fluoreszenz berechnet. Änderungen in der EYFP – und ECFP – Fluoreszenz werden als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt. Dabei ist  $\Delta F$  die Differenz aus der aktuellen Fluoreszenz der Probe minus der Fluoreszenz der Probe “Cameleon 2.1 + HEPES-Puffer“, die als Basisfluoreszenz der Analyselösungen angenommen wird. Demnach ist  $\Delta F = F_{\text{aktuell}} - F_{\text{Basis}}$ . Änderungen der Ratio werden als  $\Delta R/R$  [%] dargestellt. Dabei ist  $\Delta R$  die Differenz aus der aktuellen Ratio der Probe minus der Ratio der Probe “Cameleon 2.1 + HEPES-Puffer“. Demnach ist  $\Delta R = R_{\text{aktuell}} - R_{\text{Basis}}$ .

### **3.3 *in – vivo* Imaging von Calcium – Signalen in den Antennalloben und Calyces von *Drosophila melanogaster* mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1**

Die Antennalloben – und Calyxexperimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Giovanni Galizia am Lehrstuhl für Neurobiologie der Freien Universität Berlin, Deutschland, durchgeführt.

#### **3.3.1 Erstellung der UAS: Cameleon 2.1 – Fliegen**

Das Konstrukt für die Vorgängerversion, Cameleon 2.0 (Miyawaki et al., 1997), wurde von Dr. Christoph Schuster, Tübingen, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Die Erstellung von transgenen Fliegen, die Cameleon 2.1 unter UAS – Kontrolle exprimieren, erfolgte wie beschrieben (Diegelmann et al., 2002). Für alle Experimente wurde die Linie UAS: Cameleon 2.1/82 verwendet; sie zeigt die stärkste Cameleon 2.1 – Expression (Diegelmann et al., 2002). Jungfrauen der UAS – Linie wurden mit Männchen der GAL4 – Linie GH146 (Stocker et al., 1997), oder umgekehrt, verpaart. Die resultierende Filialgeneration besitzt Cameleon 2.1 – exprimierende Projektionsneurone.

#### **3.3.2 *in – vivo* Präparation der Fliegen**

2 – 14 Tage alte Fliegen werden auf Eis immobilisiert und in einem Acrylblock befestigt. Für die Antennallobenmessungen werden die Fliegen am Nacken fixiert und die Antennen werden mit einem sehr dünnen Metalldraht nach vorne gezogen und in dieser Position gehalten. Anschließend wird eine Polyethylenfolie mit Silikon auf den Kopf geklebt. Dabei ist es wichtig, dass die Antennen nicht mit dem Silikon in Kontakt kommen und intakt bleiben. Auf die Folie wird ein Tropfen Ringerlösung (mM: Hepes 5, NaCl 130, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, Sucrose 36, pH = 7,3, aus Estes et al., 1996) aufgebracht. Mittels eines Rasierklingensplitters wird ein Loch in die Folie und in die Kutikula der Schädelkapsel geschnitten, die dorsalen Luftsäcke und weitere störende Tracheen werden entfernt, so dass ein optischer Zugang zu den

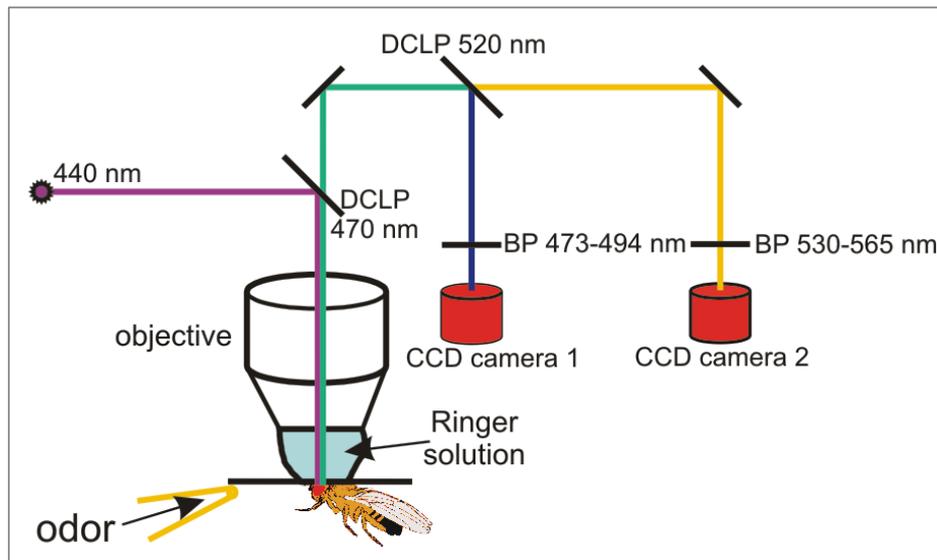
Antennalloben hergestellt ist. Die so präparierte Fliege kann unter dem Mikroskop platziert und gemessen werden.

Für die Calyxmessungen wird ein Loch in ein Plastikdeckglas gestanzt und eine dünne Polyethylenfolie auf das Deckglas aufgeklebt. Mit einem Dentalkleber (Protemp II, ESPE, Seefeld, Deutschland) werden der Fliegenkopf und der Thorax mitsamt den Flügeln auf die Folie aufgeklebt. Dabei dient eine Minutiennadel zwischen Kopf und Thorax als Fixierung für die Antennenposition. Wichtig ist auch hier, dass die Antennen nicht mit dem Kleber in Kontakt geraten und intakt bleiben. Damit sich die Fliege während der Messung nicht aus dem Kleber befreien kann, werden die Beine abgeschnitten. Anschließend wird, wie bei den Antennallobenmessungen auch, ein Tropfen Ringerlösung auf die Folie aufgebracht und ein Loch in Folie und Schädelkapsel geschnitten. Die dorsalen Luftsäcke und weitere störende Tracheen werden entfernt, so dass auch hier ein optischer Zugang zu den Calyces hergestellt ist. Vor Beginn der Messungen, werden 10 $\mu$ l Philanthotoxin (1 mM in der Ringerlösung) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in den Ringertropfen injiziert. Es vermindert die Muskelkontraktion (Karst et al., 1991; Benson et al., 1992) und reduziert so bewegungsinduzierte mechanische Messartefakte.

Korrelationen zwischen Fliegenalter und Signalintensitäten wurden nicht untersucht.

### **3.3.3 Imaging – Apparatur**

Die Imaging – Apparatur von TILL Photonics (Gräfeling, Deutschland) besitzt eine Xenon – Lampe und einen Monochromator als Lichtquelle (Abb. 3.3). Zwei CCD – Kameras nehmen simultan die EYFP – und ECFP – Fluoreszenz von Cameleon 2.1 auf. Für die Antennallobenmessungen wurde das Mikroskop (Olympus BX 50) mit einem 20 – fach Wasserimmersionsobjektiv (NA 0,5) bestückt, für die Calyxmessungen kam ein 60 – fach Wasserimmersionsobjektiv (NA 0,9) zum Einsatz. Das Binning der CCD – Kamera – Chips war so gewählt, dass die Auflösung für die Antennalloben 1  $\mu$ m / Pixel ist (Bildgröße = 160 x 120 Pixel, das entspricht 160 x 120  $\mu$ m), und für die Calyces 0,66  $\mu$ m / Pixel (Bildgröße = 80 x 60 Pixel, das entspricht 53 x 40  $\mu$ m). Die Frequenz der Bildaufnahme war 3 Hz. Die Anregungs –



**Abb. 3.3** Schematische Darstellung der Cameleon 2.1 – Imaging Apparatur.

Monochromator liefert Cameleon 2.1 – Anregungslicht der Wellenlänge 440nm. Es wird von einem dichroitischen Langpassfilter (DCLP 470nm) auf das Fliegenhirn gerichtet. Die emittierte Fluoreszenz passiert ein Wasserimmersionsobjektiv und DCLP 470nm. Ein zweiter dichroitischer Langpassfilter (DCLP 520nm) trennt die EYFP – (535nm) von der ECFP – Fluoreszenz (485nm). Die getrennten Strahlengänge passieren Bandpassfilter zur Reduktion von Störlicht (EYFP: BP 530 – 565nm, ECFP: BP 473 – 494nm). Die Bilder der beiden Wellenlängen werden simultan von den zwei CCD – Kameras aufgenommen. Die Duftgabe ist durch den Pfeil symbolisiert.

wellenlänge betrug 440 nm bei Belichtungszeiten von 80 – 110 ms für die Antennalloben und 160 – 220 ms für die Calyces. Das Anregungslicht wird vom ersten dichroitischen Spiegel (DCLP 470 nm) auf das freigelegte Gehirnareal geleitet. Die emittierte Cameleon 2.1 – Fluoreszenz hat eine höhere Wellenlänge (ECFP: 485nm, EYFP: 535nm) als das Anregungslicht und kann den ersten dichroitischen Langpassfilter passieren. Ein zweiter dichroitischer Langpassfilter (DCLP 520 nm) trennt die Chameleon 2.1 – Fluoreszenz in ihre beiden Komponenten, die EYFP - (535 nm) und ECFP – Strahlung (485nm) auf. Damit eine exakte Detektion der beiden Wellenlängen möglich ist, wird evtl. vorhandenes Störlicht aus den beiden getrennten Strahlungsgängen herausgefiltert: Der ECFP – Strahlengang passiert einen 473 – 494 nm Bandpassfilter, der EYFP – Strahlengang einen 530 – 565 nm Bandpassfilter. Die beiden nachgeschalteten CCD – Kameras nehmen die ECFP – und EYFP – Bilder des Fliegenhirns auf und der mit der Imaging – Apparatur verbundene Messrechner berechnet die Ratiobilder aus EYFP – Bild / ECFP – Bild.

### 3.3.4 Duftgabe und verwendete Düfte

Eine handelsübliche Pasteurpipette dient als Duftapplikator. Ihre Spitze wird im Abstand von ca. 5 mm vor den Antennen der Fliege platziert. Ein von einer Aquariumpumpe gelieferter konstanter Luftstrom wird durch diese Pasteurpipette geleitet und dient als Trägermedium für die zu applizierenden Düfte. Die unverdünnten Duftstoffe werden mit Mineralöl 1 zu 100 verdünnt; das entspricht einer Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$ . Ein mit 4  $\mu$ l Duftlösung getränktes Stück Filterpapier wird in eine zweite Pasteurpipette eingebracht. Diese zweite Pipette wird durch ein seitlich angebrachtes Loch in die erste Pipette hineingesteckt. Mittels eines vom Messrechner gesteuerten Duftrelais (Lee Company, Essex, UK) kann der Duftstimulus über den Zeitraum von 1 Sekunde hinweg in den konstanten Luftstrom eingeblasen werden. Die Duftkonzentration im konstanten Luftstrom oder vor der Antenne wurde nicht bestimmt. Die Luft – Durchflussraten lagen bei 1 ml/s. Individuelle Fliegenmessungen dauerten bis zu 2 Stunden, wobei die Intervalle zwischen den einzelnen Duftgaben 2 – 5 Minuten betragen.

Die sechs verwendeten Duftstoffe sind: Benzaldehyd (BEA), Ethylacetat (ETA), Isoamylacetat (IAA), 1 – Octanol (OCT), 1 – Butanol (BUT) und Propionsäure (PRO). Mineralöl (MOL) (Lösungsmittel für die Duftlösungen) und reine Luft dienten als Negativkontrolle. Die Düfte wurden in einer pseudo randomisierten Abfolge appliziert.

### 3.3.5 Datenauswertung

Die von den CCD – Kameras aufgenommen EYFP – und ECFP – Bilder wurden mit einer selbst programmierten IDL Software (Research Systems, Boulder, Colorado) analysiert. Für die Antennalloben wurden 18 weibliche Fliegen gemessen, für den Calyx 41. Die Fliegen, die mehrmals echte Calciumsignale (auf den Duftstimulus steigt die EYFP – Fluoreszenz an und die ECFP – Fluoreszenz sinkt ab) auf die pseudo randomisierten Düfte zeigten, wurden genauer analysiert. Für die Antennalloben wurden 61 Duftstimulationen von 9 – 12 Fliegen analysiert (in 3 Fliegen fehlte einer oder mehrere Düfte). Für die Calyces wurden 171 Duftstimulationen von 10 Fliegen analysiert.

Um das Rauschen zu vermindern, wurden die aufgenommenen Bilder beider CCD – Kameras mit Hilfe eines Median Filters bearbeitet (Median – Filter Größe: 3 Pixel horizontal, 3 Pixel vertikal). Außerdem wurde eine Mexican – hat Funktion (Durchmesser: 50 $\mu$ m) angewendet um Lichtbrechungseffekte zu reduzieren. Danach wurden die so bearbeiteten EYFP – Bilder durch die ECFP – Bilder geteilt um die entsprechenden Ratiobilder zu erhalten.

Zur Erstellung der Graphen wurden die arithmetischen Mittelwerte aus einem 3 x 3 Pixel großen Areal in den EYFP – und ECFP – Bildern als Funktion der Zeit berechnet. Die Nummerierung der Bilder einer Duftmessung orientiert sich am Beginn des Duftstimulus: Bild 0 entspricht dem Beginn des Duftstimulus, später aufgenommene Bilder werden mit positiven Zahlen durchnummeriert, Bilder vor dem Duftstimulus werden mit negativen Zahlen durchnummeriert. Die Zeitverläufe der EYFP – und ECFP – Fluoreszenzänderungen werden als  $\Delta F/F \times 100$  dargestellt, dabei ist F der Mittelwert aus den Bildern -4 bis -2 vor dem Duftstimulus. Die Ratiographen werden als  $(EYFP / ECFP) \times 100$  berechnet. Alle Graphen werden zum Zeitpunkt 0 (= Beginn des Duftstimulus) auf 0 gesetzt.

Um das Calciumsignal einer Duftmessung vom Hintergrund zu trennen und optisch in einem sog. “Ratiosignal – Bild“ (= Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster) darzustellen, wird der Mittelwert der Ratiobilder -3 bis -1 (Bilder vor dem Duftstimulus) vom Mittelwert der Ratiobilder 2 bis 4 (Bilder während des Duftstimulus) abgezogen. Das so erhaltene Differenzbild (Ratiosignal – Bild) spiegelt das räumliche Muster und die Intensität des Calciumsignals für die entsprechende Duftmessung wider. Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird nur der Begriff “Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster“ verwendet. Der Begriff “Ratiosignal – Bild“ soll an dieser Stelle nur verdeutlichen, dass die dargestellten räumlichen Aktivitätsmuster aus den Ratiobildern der entsprechenden Messung berechnet wurden.

Um Abweichungen im zeitlichen Verlauf der Ratiosignale zu korrigieren, wird der Mittelwert der Bilder -8 bis -6 vom Mittelwert der Bilder -3 bis -1 abgezogen und das Ergebnis vom Mittelwert der Bilder 2 bis 4 minus dem Mittelwert der Bilder -3 bis -1 abgezogen.

### 3.3.6 Darstellung der Calciumsignale als Filme

Die in Abb. 4.8 D und 4.9 E in Zeitserien dargestellten Calciumsignale sind auf der beigefügten CD – ROM als Filme einsehbar.

**Filme “BEA\_AL“, “IAA\_AL“ und “OCT\_AL“:** Duftinduzierte räumlich – zeitliche  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster in den Antennalloben.

Die Filme repräsentieren die in Zeitserien dargestellten Messungen von Abb. 4.8 D. Die Einzelbilder wurden mit einer Frequenz von 3 Hz aufgenommen und danach in Filme konvertiert. Ratiowerte  $> 0$  sind falschfarbencodiert dargestellt und auf die Morphologie der beiden Antennalloben gelegt. Der Duftstimulus wird durch ein rotes Quadrat in der linken oberen Ecke des Filmes symbolisiert. Über den Filmen ist die Zeit in Sekunden angegeben, mit  $t = 0$  Sek. bei Beginn des Duftstimulus. Film “BEA\_AL“ zeigt das Calciumsignal auf Benzaldehyd, Film “IAA\_AL“ das Calciumsignal auf Isoamylacetat und Film “OCT\_AL“ das Calciumsignal auf Octanol. Diese Filme können auf der CD – ROM über den Pfad: “Filme / Exp\_olfaktorische Codierung / AL“ eingesehen werden.

**Filme “BEA\_CX“, “IAA\_CX“ und “OCT\_CX“:** Duftinduzierte räumlich – zeitliche  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster im Calyx.

Die Filme repräsentieren die in Zeitserien dargestellten Messungen von Abb. 4.9 E. Die Einzelbilder wurden mit einer Frequenz von 3 Hz aufgenommen und danach in Filme konvertiert. Ratiowerte  $> 0$  sind falschfarbencodiert dargestellt und auf die Calyx – Morphologie gelegt. Der Duftstimulus wird durch ein rotes Quadrat in der linken oberen Ecke des Filmes symbolisiert. Über den Filmen ist die Zeit in Sekunden angegeben, mit  $t = 0$  Sek. bei Beginn des Duftstimulus. Film “BEA\_CX“ zeigt das Calciumsignal auf Benzaldehyd, Film “IAA\_CX“ das Calciumsignal auf Isoamylacetat und Film “OCT\_CX“ das Calciumsignal auf Octanol. Diese Filme können auf der CD – ROM über den Pfad: “Filme / Exp\_olfaktorische Codierung / CX“ eingesehen werden.

### **3.4 *in vivo* Imaging von Calcium – Signalen im lateralen Protocerebrum von *Drosophila melanogaster* mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1**

#### **3.4.1 Erstellung von homozygoten Cameleon 2.1/82 – GH146 – Fliegen durch Rekombination**

Bei der Kreuzung des UAS – Fliegenstamms Cameleon 2.1/82 (homozygot, P – Element Insertion auf dem II. Chromosom, linker Arm, Region 26F) mit dem GAL4 – Fliegenstamm GH146 (homozygot, P – Element Insertion auf dem II. Chromosom, rechter Arm, Region 51B - C) erhält man heterozygote Cameleon 2.1/82 / GH146 Fliegen. Sie exprimieren eine Kopie der Cameleon 2.1 – cDNA. Um die Expression zu verstärken, wurden diese Fliegen durch Rekombination homozygot gemacht (Abb. 3.4). Sie enthalten dann zwei Kopien der Cameleon 2.1 – cDNA im Genom.

Abbildung 3.4 A zeigt das Kreuzungsschema der Rekombination. Als Parentalgeneration dienen die beiden Fliegenstämme Cameleon 2.1/82 (homozygot, rote Augen) und GH146 (homozygot, rote Augen). Die gesamte Filialgeneration 1 besteht aus heterozygoten Cameleon 2.1/82 / GH146 – Fliegen. Jungfrauen der F1 werden mit Männchen des CyO / Sco – Markerstamms (CyO = CurlyO: gewellte Flügel; Sco = Scutoid: reduzierte oder fehlende Borsten auf dem Thorakalschild. Weiße Augen) verpaart. Bei den Jungfrauen der F1 kann es während diesem Schritt zur Rekombination der Gene kommen.

Um evtl. auftretende Rekombinationsereignisse auf dem II. Chromosom zu erkennen, werden die aus dieser Kreuzung hervorgegangenen Larven im 3. Larvenstadium unter einem Fluoreszenz – Binokular (Zeiss, Deutschland) mit entsprechenden Filterspezifikationen zur Anregung und Emission der Cameleon 2.1 – Fluoreszenz – Filter, gescreent (Abb. 3.4 B). Nur die Larven, bei denen eine Rekombination auftrat (Cameleon 2.1/82 – GH146 / CyO oder Sco), zeigen eine starke Fluoreszenz in den Speicheldrüsen (Duffy, 2002). Alle anderen (GH146 / CyO, GH146 / Sco, Cameleon 2.1-82 / CyO, Cameleon 2.1/82 / Sco) zeigen nur die schwache Autofluoreszenz des Integuments.

**A**

$$\text{♀ } \frac{w^-}{w^-}; \frac{GH146}{GH146}; III \quad \times \quad \text{♂ } \frac{w^-}{Y}; \frac{Cam2.1/82}{Cam2.1/82}; III$$



$$\text{♀ } \frac{w^-}{w^-}; \frac{Cam2.1/82}{GH146}; III \quad \times \quad \text{♂ } \frac{w^-}{Y}; \frac{CyO}{Sco}; III$$



**Rekombination und Larvenscreen (Abb. B)**

$$\frac{Cam2.1/82 - GH146}{CyO \text{ od. } Sco}$$

**fluoreszierende Larven**



$$\text{♀ } \frac{w^-}{w^-}; \frac{Cam2.1/82 - GH146}{CyO}; III \quad \times \quad \text{♂ } \frac{w^-}{Y}; \frac{CyO}{Sco}; III$$

**(Einzelkreuzung)**



$$\text{♀ } \frac{w^-}{w^-}; \frac{Cam2.1/82 - GH146}{CyO}; III \quad \times \quad \text{♂ } \frac{w^-}{Y}; \frac{Cam2.1/82 - GH146}{CyO}; III$$

**(Geschwisterkreuzung)**



$$\frac{Cam2.1/82 - GH146}{Cam2.1/82 - GH146}$$



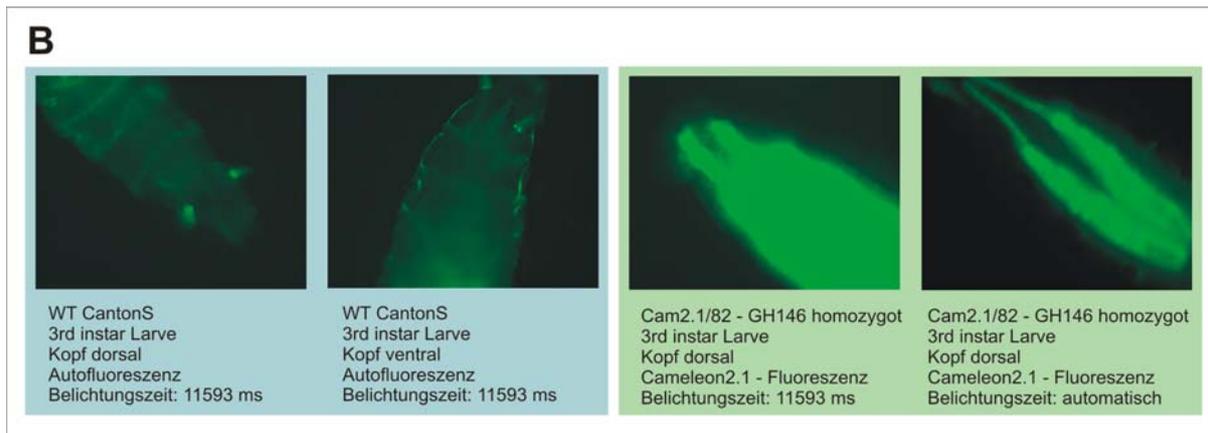
**homozygoter Cam2.1/82 - GH146 - Stamm**

GH146	GH146
CyO	Sco
Cam2.1/82	Cam2.1/82
CyO	Sco

**Verwerfen der nicht fluoreszierenden Larven**

Cam2.1/82 - GH146	CyO
CyO	CyO
<b>letal</b>	

**Verwerfen**



**Abb. 3.4** Rekombination der heterozygoten Cameleon2.1/82 / GH146 – Fliegen

**A** Kreuzungsschema: Parentalgeneration: Fliegenstämme Cameleon2.1/82 (homozygot, rote Augen) und GH146 (homozygot, rote Augen). Die gesamte Filialgeneration 1 besteht aus heterozygoten Cameleon2.1/82 / GH146 – Fliegen. Jungfrauen der F1 werden mit Männchen des CyO / Sco – Markerstamms (CyO = CurlyO: gewellte Flügel; Sco = Scutoid: reduzierte oder fehlende Borsten auf dem Thorakalschild. Weisse Augen) verpaart. Bei den Jungfrauen der F1 kann es während dieses Schrittes zur Rekombination kommen. Um Rekombinationsereignisse zu erkennen, werden die 3rd instar Larven unter einem Fluoreszenz – Binokular (Zeiss, Deutschland) nach fluoreszierenden Speicheldrüsen gescreent (Abb. 3.4 B). Nur die Larven, bei denen eine Rekombination auftrat (Cameleon2.1/82 – GH146 / CyO oder Sco), zeigen eine starke Fluoreszenz in den Speicheldrüsen. Alle anderen (GH146 / CyO, GH146 / Sco, Cameleon2.1-82 / CyO, Cameleon2.1-82 / Sco) werden verworfen. In Einzelkreuzungen werden die rekombinanten Cameleon2.1/82 – GH146 / CyO Jungfrauen mit CyO / Sco – Männchen verpaart. Innerhalb der erhaltenen Einzellinien werden Geschwisterkreuzungen durchgeführt; verpaart werden Cameleon2.1/82 – GH146 / CyO Jungfrauen mit Cameleon2.1/82 – GH146 / CyO Männchen (beide rote Augen, gewellte Flügel). Man erhält die homozygoten Cameleon2.1/82 – GH146 – Fliegen (rote Augen, Flügel normal), aus denen der neue homozygote Stamm gebildet wird. Cameleon2.1/82 – GH146 / CyO – Tiere (rote Augen, gewellte Flügel) werden verworfen, homozygote CyO – Tiere sind letal.

**B** Screen nach rekombinierten 3rd instar Larven anhand der Speicheldrüsenfluoreszenz. Nur die Larven, bei denen eine Rekombination auftrat (Cameleon2.1/82 – GH146 / CyO oder Sco), zeigen eine starke Fluoreszenz in den Speicheldrüsen. Alle anderen (GH146 / CyO, GH146 / Sco, Cameleon2.1-82 / CyO, Cameleon2.1-82 / Sco) zeigen nur die schwache Autofluoreszenz des Integuments. Autofluoreszenz des Larveninteguments: Bilder 1 und 2: dorale und ventrale Aufsicht auf den Kopfbereich von 3rd instar Larven des Wildtypstamms CantonS. Die Belichtungszeit für beide Bilder ist 11593ms. Cameleon2.1 – Fluoreszenz in den Speicheldrüsen von rekombinierten Larven: Bild 3: Belichtungszeit = 11593ms, Bild 4: Gleiches Tier, automatische Belichtungszeit. Bei automatischer Belichtungszeit sind die fluoreszierenden deutlich Speicheldrüsen zu erkennen, bei der Belichtungszeit von 11593ms, mit der auch die CantonS – Larvenbilder aufgenommen wurden, zeigt das Bild die sehr viel stärkere Fluoreszenz des Cameleon2.1 - Proteins.

Abbildung 3.4 B illustriert den Fluoreszenz – Screen. Um die schwache Autofluoreszenz des Larveninteguments zu verdeutlichen, sind zwei Bilder des Kopfbereiches von 3rd instar Larven des Wildtypstamms CantonS abgebildet. Die Belichtungszeit für beide Bilder ist 11593ms. Im Gegensatz dazu, zeigen die

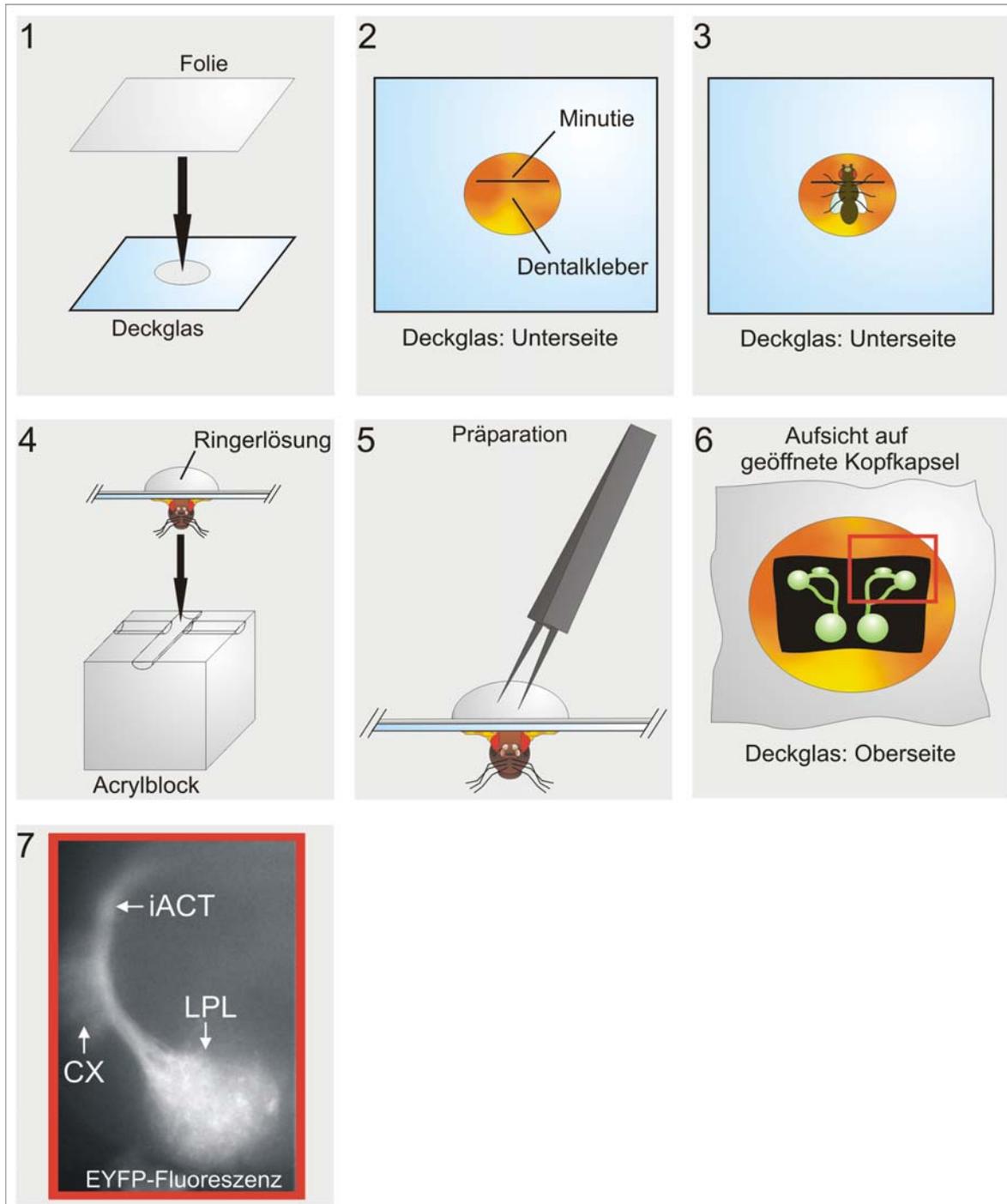
rekombinierten Cameleon 2.1/82 – GH146 – Tiere eine starke Fluoreszenz in den Speicheldrüsen. Um den starken Fluoreszenzunterschied darzustellen, ist das Bild der rekombinierten Larve einmal mit der “wildtypischen“ Belichtungszeit von 11593ms, und einmal mit automatischer Belichtungszeit aufgenommen worden. Bei automatischer Belichtungszeit sind die fluoreszierenden Speicheldrüsen zu erkennen, bei der Belichtungszeit von 11593ms, mit der auch die CantonS – Larvenbilder aufgenommen wurden, zeigt das Bild die sehr viel stärkere Fluoreszenz des Cameleon2.1 - Proteins.

Die fluoreszierenden Larven werden abgesammelt und für den nächsten Schritt nur die rekombinierten Jungfrauen mit dem CyO – Marker verwendet. In Einzelkreuzungen werden diese Jungfrauen erneut mit CyO / Sco – Männchen verpaart. So erhält man Einzellinien, die sich im Rekombinationsereignis unterscheiden. Für jede so etablierte Einzellinie wird eine Geschwisterkreuzung durchgeführt; verpaart werden Cameleon 2.1/82 – GH146 / CyO Jungfrauen mit Cameleon 2.1/82 – GH146 / Cyo Männchen (beide rote Augen, gewellte Flügel). Man erhält die homozygoten Cameleon 2.1/82 – GH146 – Fliegen (rote Augen, Flügel normal), aus denen der neue homozygote Stamm gebildet wird. Cameleon 2.1/82 – GH146 / CyO – Tiere (rote Augen, gewellte Flügel) werden verworfen, homozygote CyO – Tiere sind letal. Der so erhaltene Stamm von homozygoten Cameleon 2.1/82 – GH146 – Fliegen zeigt in den Imagingexperimenten keine deutlichen Intensitätssteigerungen für die EYFP – und ECFP – Werte. Die aufgenommenen EYFP – und ECFP – Bilder zeigen jedoch eine feinere, detailliertere Morphologie.

### **3.4.2 *in – vivo* Präparation**

Um *in – vivo* Calcium Imaging an Gehirnarealen von transgenen *Drosophila melanogaster* durchzuführen, war es notwendig eine Fliegenpräparation zu entwickeln (Abb. 3.5), die drei Voraussetzungen erfüllt: Es muss ein optischer Zugang zum zu messenden Gehirnareal geschaffen werden, die Fliege muss nach der Präparation noch physiologisch und morphologisch intakt sein und, um mechanischen Artefakten vorzubeugen, muss die Fliege so fixiert werden, dass sie sich während der Messung nicht bewegen kann.

Zur Vorbereitung auf die Präparation wird die Fliege (es wurden nur Weibchen präpariert) für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Die Abkühlung dient als Narkose, immobilisiert die Fliege und hat im Gegensatz zu CO<sub>2</sub> keine nachteiligen Effekte auf das Nervensystem. In die Mitte eines 2 x 2cm großen Plastikdeckglases wird ein 5mm (Durchmesser) großes Loch eingestantzt. Auf das Deckglas wird mit Nagellack eine Plastikfolie aufgeklebt (Abb. 3.5 1). Bevor mit der Präparation fortgefahren wird, lässt man die Folie für ca. 30 Minuten antrocknen. Während der Antrocknungszeit verdunstet das Lösungsmittel im Nagellack, und der für Duftexperimente kritische Eigengeruch des Nagellacks verschwindet. Das Deckglas wird auf die Seite mit der angeklebten Folie gedreht und eine Minutiennadel in die entstandene Kammer gelegt. Anschließend wird ein Tropfen des Dentalklebers über die Minutiennadel gegeben und in der Kammer flach gestrichen (Abb. 3.5 2). Bei dem Dentalkleber handelt es sich um einen Dreikomponentenkleber, der vor dem Auftragen frisch angerührt werden muss. Die Verarbeitungszeit beträgt je nach Verhältnis der Komponenten zwischen 3 bis 7 Minuten. Der Kleber ist geruchsneutral und schließt so Messartefakte aufgrund des Eigengeruchs aus. Die Fliege wird mit der dorsalen Seite in den Kleber gedrückt, so dass die Minutiennadel zwischen Thorakalsegment 1 und Kopf zum Liegen kommt (Abb. 3.5 3). Die Minutiennadel überstreckt dabei den Kopf und positioniert ihn so, dass seine dorsale Seite im Kleber liegt, die Antennen jedoch frei bleiben. Hierzu eignen sich handelsübliche Uhrmacherpinzetten. Danach lässt man den Kleber trocknen und erhält so die fixierte Fliege. Jetzt besteht auch die Möglichkeit die Fliegenbeine zu entfernen (nicht abgebildet). Das Entfernen hat den Vorteil, dass sich die Fliege während der Messung nicht mit ihren Beinen aus dem Kleber befreien kann. Das Deckglas mit der angeklebten Fliege wird herumgedreht und mit Dentalkleber oder Knete auf einer Präparationskammer befestigt (Abb. 3.5 4). Die Präparationskammer ist ein 2 x 2 x 2cm großer Acrylblock, der eine zentrale Bohrung enthält, in der die Fliege positioniert wird. Die zentrale Bohrung ist nach Vorne hin offen, so dass später Düfte auf die Antennen appliziert werden können. Weiterhin gehen von der zentralen Bohrung zwei weitere Bohrungen zur Seite ab, so dass sich die applizierten Düfte nicht in der zentralen Bohrung anstauen können. Auf die Oberseite der angeklebten Folie wird ein Tropfen Ringerlösung (ca. 300µl) gegeben (Abb. 3.5 5) um die Fliege während der folgenden Präparation vor Austrocknung zu schützen. Mit einem Rasierklingenbruchstück (kann in einem Rasierklingenhalter arretiert werden) wird durch Folie und Schädelkapsel ein Fenster



**Abb. 3.5** *In – vivo* Präparation von *Drosophila melanogaster*

**1** In die Mitte eines Plastikdeckglases wird ein 5mm großes Loch gestanzt. Auf das Deckglas wird mit Nagellack eine Plastikfolie aufgeklebt.

**2** Das Deckglas wird auf die Seite mit der angeklebten Folie gedreht und eine Minutiennadel in die entstandene Kammer gelegt. Ein Tropfen Dentalklebers wird auf die Minutiennadel gegeben und in der Kammer flach gestrichen.

**3** Die Fliege wird mit der dorsalen Seite in den Kleber gedrückt, so dass die Minutie zwischen Thorakalsegment 1 und Kopf zum Liegen kommt. Die Minutienadel überstreckt dabei den Kopf und positioniert ihn so, dass seine dorsale Seite im Kleber liegt, die Antennen jedoch frei bleiben.

- 4 Das Deckglas mit der angeklebten Fliege wird herumgedreht und mit Dentalkleber oder Knete auf der Präparationskammer (Acrylblock) befestigt.
- 5 Auf die Folienoberseite wird ein Tropfen Ringerlösung gegeben. Mit einem Rasierklingenbruchstück wird durch Folie und Schädelkapsel ein Fenster in die dorsale Seite des Fliegenkopfes geschnitten.
- 6 Das ausgeschnittene Folienstück und die Chitinplatte werden entfernt. Aus der geöffneten Schädelkapsel werden die dorsalen Luftsäcke und weitere störende Tracheen entnommen, so dass ein ungehinderter optischer Zugang zum Gehirn besteht. Schematisch abgebildet ist das Expressionsmuster der GAL4 – Linie GH146.
- 7 Die Präparationskammer wird mitsamt der Fliege unter dem Mikroskop der Imaging – Apparatur positioniert und auf das zu vermessende Gehirnareal fokussiert. Exemplarisch abgebildet ist ein EYFP – Morphologiebild der Fliegenlinie Cameleon2.1/82 – GH146 (homozygot). LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt.

in die dorsale Seite des Fliegenkopfes geschnitten. Das ausgeschnittene Folienstück und die Chitinplatte werden entfernt. Außerdem werden aus der geöffneten Schädelkapsel die dorsalen Luftsäcke und weitere störende Tracheen entnommen, so dass ein ungehinderter optischer Zugang zum Gehirn besteht (Abb. 3.5 6). Es empfiehlt sich hierzu Uhrmacherpinzetten zu verwenden. Um einem Bleichen des Cameleon 2.1 – Proteins vorzubeugen, wird die Präparation unter Rotlicht durchgeführt. Die Präparationskammer wird mitsamt der Fliege unter dem Mikroskop der Imaging – Apparatur positioniert und auf das zu vermessende Gehirnareal fokussiert (Abb. 3.5 7).

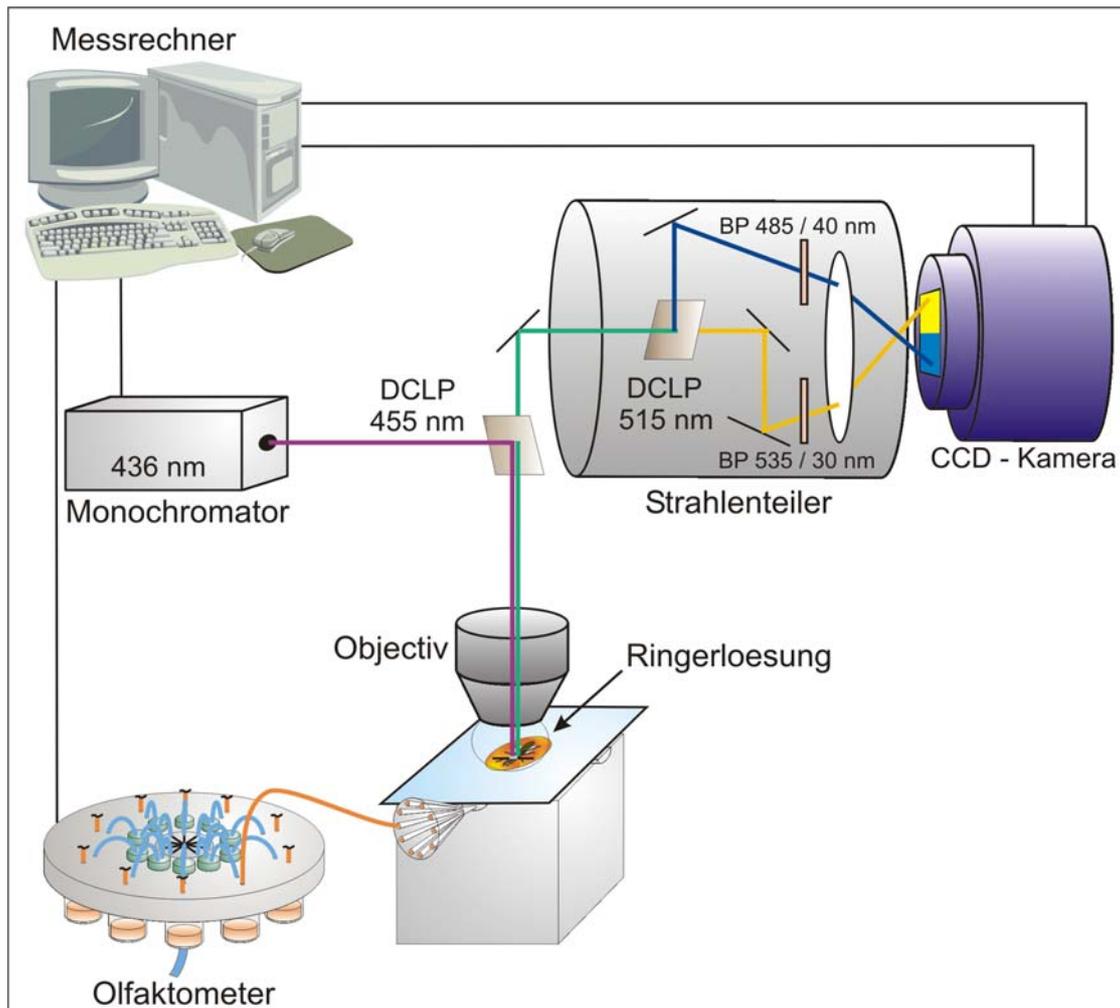
#### **Materialien der *in – vivo* Präparation:**

- Plastikdeckglas, 2 x 2 cm, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Polypropylenfolie, z.B. CD – Hüllen
- Präparationskammer: Acrylblock, 2 x 2 x 2 cm, mit entsprechenden Bohrungen, Werkstatt des Instituts für Genetik und Neurobiologie, Universität Würzburg, Deutschland
- Dentalkleber, Protemp II, ESPE, Seefeld, Deutschland
- Rasierklingenhalter, # 10053 – 13, Fine Science Tools, Foster City, CA
- Brechbare Rasierklingen, # 10050 – 00, Fine Science Tools, Foster City, CA
- Uhrmacherpinzetten (Dumont # 5), # 11252 – 20, Fine Science Tools, Foster City, CA
- Minutiennadeln, # 26002 – 10, Fine Science Tools, Foster City, CA

### 3.4.3 Imaging – Apparatur

Die Calcium – Imaging Apparatur (Abb. 3.6) wurde als Komplettsystem von der Firma Visitron Systems (Puchheim, Deutschland) bezogen und im Rahmen dieser Doktorarbeit etabliert. Sie besteht aus sechs Komponenten: Einem aufrechten Mikroskop, einem Monochromator als Lichtquelle, einer CCD – Kamera (charge – coupled device), einem Strahlenteiler, einem z-stepper, und einem Messrechner. Die mitgelieferte Software (Universal Imaging, Downington, PA) umfasst die Programme *MetaFluor* und *MetaMorph*. *MetaFluor* dient der Datenaufnahme, d.h. der Kommunikation zwischen Messrechner und Monochromator, CCD – Kamera und weiteren beliebigen externen Geräten, wie z.B. einer Duftgabenapparatur zum Zwecke der Stimulation olfaktorischer neuronaler Netzwerke. *MetaMorph* dient hauptsächlich der Datenauswertung.

Die präparierte Fliege wird unter dem Mikroskop platziert und Ringerlösung zwischen dem 40 x Wasserimmersionsobjektiv und der geöffneten Schädelkapsel eingebracht (Abb. 3.6) Der Monochromator liefert das Anregungslicht von 436nm für die Cameleon 2.1 – Fluoreszenz und ein dichroitischer Langpassfilter (455 – 470nm) richtet das Anregungslicht auf das präparierte Fliegenhirn. Die emittierte Cameleon 2.1 – Fluoreszenz hat eine höhere Wellenlänge (ECFP: 485nm, EYFP: 535nm) als das Anregungslicht und kann den dichroitischen Langpassfilter passieren und gelangt in den Strahlenteiler. Hier trennt ein zweiter dichroitischer Langpassfilter (505 – 515nm) die Chameleon 2.1 – Fluoreszenz in ihre beiden Komponenten, die EYFP – (535 nm) und ECFP – Strahlung (485nm) auf. Damit eine exakte Detektion der beiden Wellenlängen möglich ist, wird evtl. vorhandenes Störlicht aus den beiden Strahlungsgängen herausgefiltert: Der ECFP – Strahlengang passiert einen 485/40nm Bandpassfilter, der EYFP – Strahlengang einen 535/30nm Bandpassfilter. Der Chip (max. Auflösung: 1392 x 1040 Pixel) der nachgeschalteten CCD – Kamera ist virtuell geteilt. Eine Hälfte des Chips nimmt die aktuellen ECFP – Bilder des Fliegenhirns auf, die zweite Hälfte simultan die EYFP – Bilder. Um eine deutliche Reduktion des thermischen Rauschens (auf dem CCD – Chip bilden sich auch ohne Lichteinfall, einfach durch Wärme, Elektronen, die sich mit den Elektronen der eigentlichen Bildinformation vermischen) der elektronischen Baugruppen der Kamera



**Abb. 3.6** Schematische Darstellung der Cameleon 2.1 – Imaging Apparatur.

Monochromator liefert Cameleon 2.1 – Anregungslicht der Wellenlänge 436nm. Es wird von einem dichroitischen Langpassfilter (DCLP 455nm) auf das Fliegenhirn gerichtet. Die emittierte Fluoreszenz passiert ein 40x Wasserimmersionsobjektiv und DCLP 455nm. Im Strahlenteiler trennt DCLP 515nm die EYFP – (535nm) von der ECFP – Fluoreszenz (485nm). Die getrennten Strahlengänge passieren Bandpassfilter zur Reduktion von Störlicht (EYFP: BP 535/30nm, ECFP: BP 485/40nm). Die Bilder der beiden Wellenlängen werden simultan auf einer der beiden virtuellen Chiphälften der CCD – Kamera aufgenommen. Der Messrechner kontrolliert den Monochromator, die CCD – Kamera und die Duftgabenapparatur (Olfaktometer).

zu erzielen, ist sie auf  $-30^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die Umlenkspiegel des Strahlenteilers sind so justiert, dass ECFP – und EYFP – Bilder symmetrisch zu einer gedachten Mittelachse des Chips liegen. Dies gewährleistet die Deckungsgleichheit beider Bilder und ist die Voraussetzung zur Berechnung der Ratiobilder aus EYFP – Bild / ECFP – Bild. Das abgebildete Olfaktometer appliziert einen beliebigen Duft auf die Antennen der präparierten Fliege und stimuliert so ihre olfaktorischen Neurone. Es wird im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.

## Komponenten der Imaging Apparatur

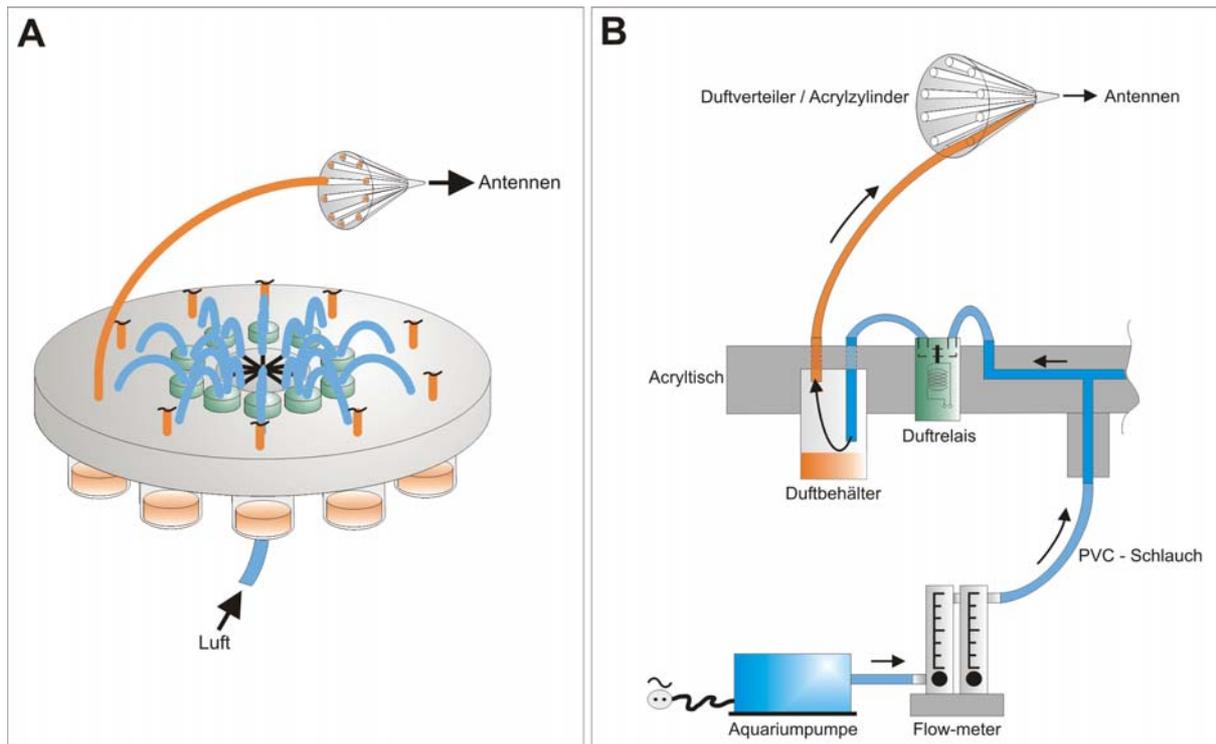
- Mikroskop: Axioscope 2FS plus, Zeiss, Deutschland
- Objektiv: Wasserimmersionsobjektiv, 40x, Achroplan, Zeiss, Deutschland
- Lichtquelle: Visichrom high-speed polychromator system: Xenon Bogenlampe 75 W, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland
- CCD – Kamera: CoolSnap HQ, Auflösung: 1280 x 960 Pixel, Roper Scientific, Tucson, USA
- Dichroitischer Langpassfilter 455 – 470nm, *Chroma, Brattleboro, VT*
- Strahlenteiler, bestehend aus einem dichroitischen Langpassfilter 505 – 515nm, einem 485/40nm Emissionsfilter und einem 535/30nm Emissionsfilter, Optical Insights, Santa Fe, USA
- z – stepper: NV 40/1CL, Piezosystem Jena, Jena, Deutschland
- Software: MetaFluor, MetaMorph, Universal Imaging, Downington, PA
- Messrechner, Lynx, 1 GHz, Reutlingen, Deutschland

### 3.4.4 Olfaktometer

#### 3.4.4.1 Aufbau und Funktion

Das Olfaktometer (Abb. 3.7) wurde komplett neu entwickelt und in Zusammenarbeit mit der Werkstatt des Lehrstuhles für Genetik und Neurobiologie der Universität Würzburg gebaut.

Es bietet die Möglichkeit der Applikation von 10 verschiedenen Düften auf die Antennen der präparierten Fliege. Abbildung 3.7 A zeigt eine Übersichtsskizze der Apparatur. Ein runder Acryltisch trägt die zehn Duftkanäle. Sie sind sternförmig angeordnet, d.h. der Duftweg bis zur Antenne, ist für alle Düfte gleich. Abbildung 3.7 B erlaubt einen genaueren Blick auf einen der zehn Duftkanäle: Die Luftversorgung der gesamten Apparatur übernimmt eine handelsübliche Aquariumpumpe. Die Stärke des Luftstromes (Durchflussrate) kann direkt über ein Potentiometer an der Pumpe geregelt werden oder an einem zwischengeschalteten Flow – Meter, das auch zur Kontrolle der Durchflussrate dient. Als Träger des Luft- oder Duftstromes dienen PVC



**Abb. 3.7** Schematische Darstellung des Olfaktometers

**A** Aufbau des Olfaktometers: Übersicht über die Apparatur mit sternförmiger Anordnung der zehn Duftgabenkanäle.

**B** Querschnitt durch einen Duftkanal: Eine Aquariumpumpe liefert den Luftstrom für die gesamte Apparatur, ein Flow – Meter dient zur Durchflusskontrolle des Luftstromes. Der Acryltisch trägt je Kanal ein vom Messrechner steuerbares Duftrelais und den nachfolgenden Duftbehälter. Die zehn Duftkanäle vereinigen sich im Duftverteiler / Acrylzylinder, der mit einer aufgesetzten Pasteurpipette (nicht abgebildet) als Duftapplikator dient.

– Schläuche. Nach dem Eintritt des Luftstromes in den Acryltisch, wird er sternförmig auf die zehn Duftkanäle verteilt. Je Duftkanal folgt nun ein Duftrelais. Alle Duftrelais können unabhängig voneinander vom Messrechner (Software *MetaFluor*) der Cameleon 2.1 – Imaging Apparatur geöffnet und geschlossen werden. Der Öffnungsstatus des Relais bestimmt, ob der nachfolgende Duftbehälter (Plastik – Szintillationsgefäß) mit Luft geflutet wird. Der Duftbehälter selbst beinhaltet eine beliebige Duftlösung. Da der Behälter abgeschlossen ist, genügt der Partialdruck der Duftlösungen aus um ihn mit Duftmolekülen in der gasförmigen Phase zu sättigen. Diese Duftmoleküle werden vom Luftstrom mitgerissen und gelangen dann in den Duftverteiler. Der Duftverteiler ist ein Acrylzylinder mit zehn Bohrungen, die sich an seiner Spitze vereinigen. Auf die Verteilerspitze wird eine handelsübliche

Pasteurpipette als Duftapplikator aufgesetzt (nicht abgebildet). So erreicht der gewünschte Duft schließlich die Antennen der zu messenden Fliege.

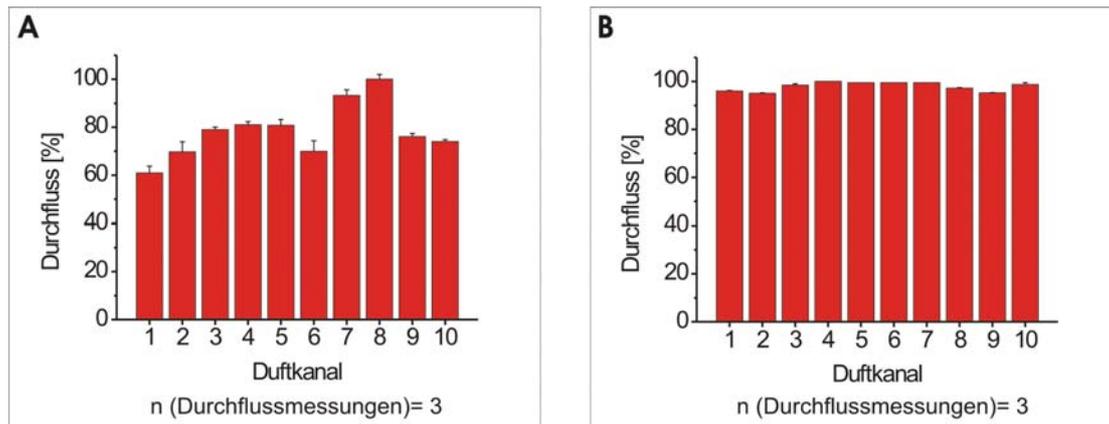
Um einer Kontamination des Messlabors mit Duftmolekülen vorzubeugen, wird das Olfaktometer unter einer Acrylglocke mit Abluft betrieben. Weiterhin wird der applizierte Duftstoff hinter der zu messenden Fliege, d.h. nach Anstrom der Antennen, wieder abgesaugt (keine Abbildung).

#### **Komponenten des Olfaktometers:**

- Acryltisch mit Bohrungen für zehn Duftkanäle, Werkstatt des Lehrstuhls für Genetik und Neurobiologie, Universität Würzburg, Deutschland
- Acrylzylinder / Duftverteiler, Werkstatt des Lehrstuhls für Genetik und Neurobiologie, Universität Würzburg, Deutschland
- PVC - Schläuche, 2 mm Durchmesser, Pfister & Pfrang, Waldbüttelbrunn, Deutschland
- Aquariumpumpe: Power Air Pump 400, Rondex, Vertrieb durch Dennerle GmbH, Münchweiler, Deutschland
- Flow – Meter, Werkstatt des Lehrstuhls für Genetik und Neurobiologie, Universität Würzburg, Deutschland
- Duftrelais, The Lee Company, Essex, CT
- Duftbehälter: Plastikmessflaschen für Szintillationszähler, Durchmesser 27 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Duftapplikator: Pasteurpipette, Länge 230 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

#### **3.4.4.2 Durchflussraten und Fehlerbehebung**

Vorraussetzung für die Duftmessungen mit dem Olfaktometer ist, dass alle zehn Duftkanäle die Düfte mit dem gleichen Druck auf die Antennen des zu messenden Tieres applizieren um mechanische Artefakte auszuschließen. Um einheitliche Durchflussraten zu gewährleisten, wurde die Apparatur mit Hilfe des Flow – Meters getestet. Dazu wurde das Flow – Meter nicht wie in Abb. 3.7 dargestellt hinter der Aquariumpumpe installiert, sondern direkt am Ausgang des Duftverteilers / Acrylzylinder-



**Abb. 3.8** Durchflussraten der 10 Duftkanäle des Olfaktometers

**A** Durchflussraten [%] der 10 Duftkanäle vor Fehlerbehebung.  
**B** Durchflussraten [%] der 10 Duftkanäle nach Fehlerbehebung.  
 Abgebildet ist der Standardfehler.

ders, und dort die Durchflussraten der zehn Duftkanäle bestimmt. Abbildung 3.8 A zeigt die Durchflussraten [%] der 10 Duftkanäle vor der Fehlerbehebung.  $n$  (Durchflussmessungen / Kanal) = 3. Hier zeigen sich deutliche Unterschiede in den Durchflussraten für die verschiedenen Kanäle, mit einem Maximum für Kanal 8 und einem Minimum für Kanal 1. Die Reduktion des Durchflusses von Kanal 1 im Vergleich zu Kanal 8 beträgt ca. 40 %.

Für die unterschiedlichen Durchflussraten gibt es zwei Hauptfehlerquellen:

1. Die einzelnen Komponenten der Apparatur, wie z.B. Duftverteiler / Acrylzylinder oder die Bohrungen des Acryltisches sind mit kleinen Acrylspänen verstopft.
2. Die Apparatur besitzt undichte Stellen. Dies führt zu Druckverlust in den einzelnen Kanälen. Verantwortlich hierfür sind gealterte PVC – Schläuche (Elastizitätsverlust) und undichte Relaisstopfen ( jedes Duftrelais besitzt einen Einlass und zwei Auslässe. Da nur ein Auslass benötigt wird, ist der zweite mit einem kurzen Stück eines PVC – Schlauchs, welches an seiner Spitze zusammengesmolzen wurde, abgedichtet. Diese “Relaisstopfen“ können undicht sein).

Folgende Fehlerkorrekturen wurden durchgeführt:

1. Die einzelnen Acryl - Komponenten der Apparatur werden mit Ethanol ausgewaschen und anschließend mit Druckluft ausgeblasen.
2. Alte PVC – Schläuche und Relaisstopfen durch neue ersetzen.

Abbildung 3.8 B zeigt die Durchflussraten [%] der 10 Duftkanäle nach der Fehlerbehebung.  $n$  (Durchflussmessungen / Kanal) = 3. Die Durchflussraten sind nun in einem hohen Maß gleichwertiger, mit einem Maximum für Kanal 4 und einem Minimum für Kanal 2. Die Reduktion des Durchflusses von Kanal 2 im Vergleich zu Kanal 4 beträgt ca. 5 %.

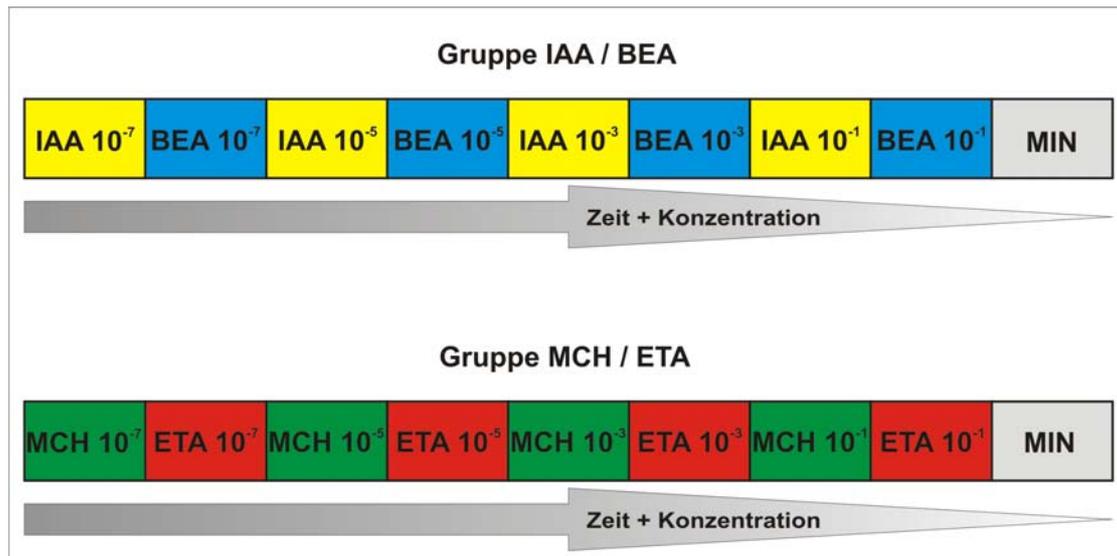
### **3.4.5 Datenaufnahme**

#### **3.4.5.1 Experimente zur olfaktorischen Codierung**

##### 3.4.5.1.1 Experimenteller Aufbau

Die Calciumsignale im lateralen Protocerbrum von GH146 – Cameleon2.1/82 homozygoten Tieren wurden gemessen. Aufgrund ihres größeren Gehirnvolumens wurden nur weibliche Tiere eingesetzt. Der Volumenunterschied bedingt eine höhere Menge an gebildetem Cameleon 2.1 – Protein in den Neuronen. Weiterhin lassen sie sich aufgrund ihrer Größe leichter präparieren.

Zum Einsatz kommen vier verschiedene Düfte: Isoamylacetat (IAA), Benzaldehyd (BEA), Ethylacetat (ETA) und Methylcyclohexanol (MCH). Jeder Duft wird in einer logarithmischen Verdünnungsreihe dargeboten. Der höchsten Duftkonzentration entspricht eine Verdünnung von  $10^{-1}$ , ausgehend von der 100% Duftlösung. Weitere Verdünnungsstufen sind:  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ . Als Lösungsmittel dient Mineralöl (Abb. 3.9). Je 3ml dieser Duftlösungen werden in den Duftbehältern des Olfaktometers vorgelegt.



**Abb. 3.9** Schemadarstellung der Messreihen für beide Fliegengruppen

Zu messende Fliegen in zwei Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1: Fliegen, die gegen die Isoamylacetat- und Benzaldehydverdünnungsstufen getestet werden. Gruppe 2: Fliegen, die gegen die Methylcyclohexanol- und Ethylacetatverdünnungsstufen getestet werden. Für die IAA/BEA – Gruppe besteht die Messreihe aus der Applikation von Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA) in je vier logarithmischen Verdünnungsstufen. Für die MCH/ETA – Gruppe besteht die Messreihe aus der Applikation von Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA) in je vier logarithmischen Verdünnungsstufen. Die Düfte werden abwechselnd dargeboten, beginnend mit der höchsten Verdünnungsstufe und endend mit der niedrigsten Verdünnungsstufe. Am Ende jeder Messreihe erfolgt die Negativprobe mittels Mineralöl (MIN). Zwischen den einzelnen Duftmessungen einer Messreihe vergehen zwei Minuten.

Da das Olfaktometer nur für 10 verschiedene Duftproben Platz bietet, wurden die zu testenden Fliegen in zwei Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1 besteht aus Fliegen, die gegen die Isoamylacetat – und Benzaldehydverdünnungsstufen getestet wurden. Gruppe 2 besteht aus Fliegen, die gegen die Methylcyclohexanol – und Ethylacetatverdünnungsstufen getestet wurden. Die Messung einer Fliege besteht also aus der Applikation zweier Düfte, in je vier Verdünnungsstufen. Die Düfte werden abwechselnd dargeboten, beginnend mit der höchsten Verdünnungsstufe, und endend mit der niedrigsten Verdünnungsstufe. Am Ende jeder Messreihe erfolgt die Negativprobe mittels Mineralöl (MIN), das ebenfalls in einem der zehn Duftbehälter des Olfaktometers vorgelegt wurde. Zwischen den einzelnen Duftmessungen einer Messreihe vergehen zwei Minuten. Abhängig von der Güte der Präparation, kann eine Fliege mehrere Messungen durchlaufen. Zwischen den Messungen wird ein zwanzigminütiges Zeitfenster zur Regeneration des Cameleon 2.1 – Proteins und zur Vermeidung von Adaptionseffekten eingehalten. Das gesamte

Experiment besteht also aus einer variablen Anzahl von sich wiederholenden Messungen.

#### 3.4.5.1.2 Messprotokoll, Soft – und Hardwareeinstellungen

### **Grundbegriffe für das Arbeiten mit CCD – Kameras und Einstellungen**

**Auflösung:** Auflösung bedeutet die Anzahl von möglichen Bildpunkten (Pixel). Die für diese Arbeit verwendete Kamera besitzt eine Auflösung von 1392 x 1040 Pixeln, d.h. der Chip der Kamera besitzt eine horizontale Pixelreihe aus 1392 Pixeln und eine vertikale Pixelreihe aus 1040 Pixeln. Arbeitet der vorgeschaltete Strahlenteiler im “split – view” – Modus, ist der CCD - Chip virtuell geteilt. Eine Hälfte des Chips nimmt das EYFP – Bild auf, die andere Hälfte das ECFP – Bild. Die Bildgröße ist also je Bild 696 x 1040 Pixel. Arbeitet der Strahlenteiler im “full – view” – Modus wird der ganze Chip für die Einzelbildaufnahme verwendet. Das Bild hat dann die maximale Größe von 1392 x 1040 Pixeln.

**Bittiefe:** Das Signal (Licht), das ein CCD-Chip empfängt, ist ein so genanntes analoges Signal, d.h. das Signal ist nicht abgestuft, sondern kann kontinuierlich beliebige Werte annehmen. Jeder Computer arbeitet aber mit digitalen, also abgestuften Werten. Die Umwandlung des analogen – in ein digitales Signal übernimmt ein so genannter Analog – Digital Konverter. Abhängig vom technischen Aufwand und der Qualität eines Analog – Digitalwandler kann er das Licht nun in verschiedene Abstufungen umwandeln. Unterscheidet er nur schwarz und weiß ist es ein 1bit Wandler. Wandelt er in 8 bit ergibt das 256 Graustufen von schwarz bis weiß, wandelt er in 12 bit ergibt dies bereits 4096 Graustufen, wandelt er in 16 bit ergibt das über 65 536 Graustufen und wandelt er in 24 bit ergibt das über 16 Millionen Graustufen (homepage der Baader Planetarium GmbH, 2003). Die EYFP – und ECFP – Bilder, die von der hier verwendeten Kamera aufgenommen werden, sind 12 bit – Bilder (4096 Graustufen). Die aus dem Quotienten von EYFP – Bild und ECFP – Bild errechneten Ratiobilder sind 8 bit – Bilder (256 Graustufen), deren Graustufen in einem sog. “Pseudocolor” – Bild dargestellt werden, d.h. den Graustufen wird das Farbband des sichtbaren Lichtes zugeordnet. Man spricht auch von “Falschfarbenskalierung”.

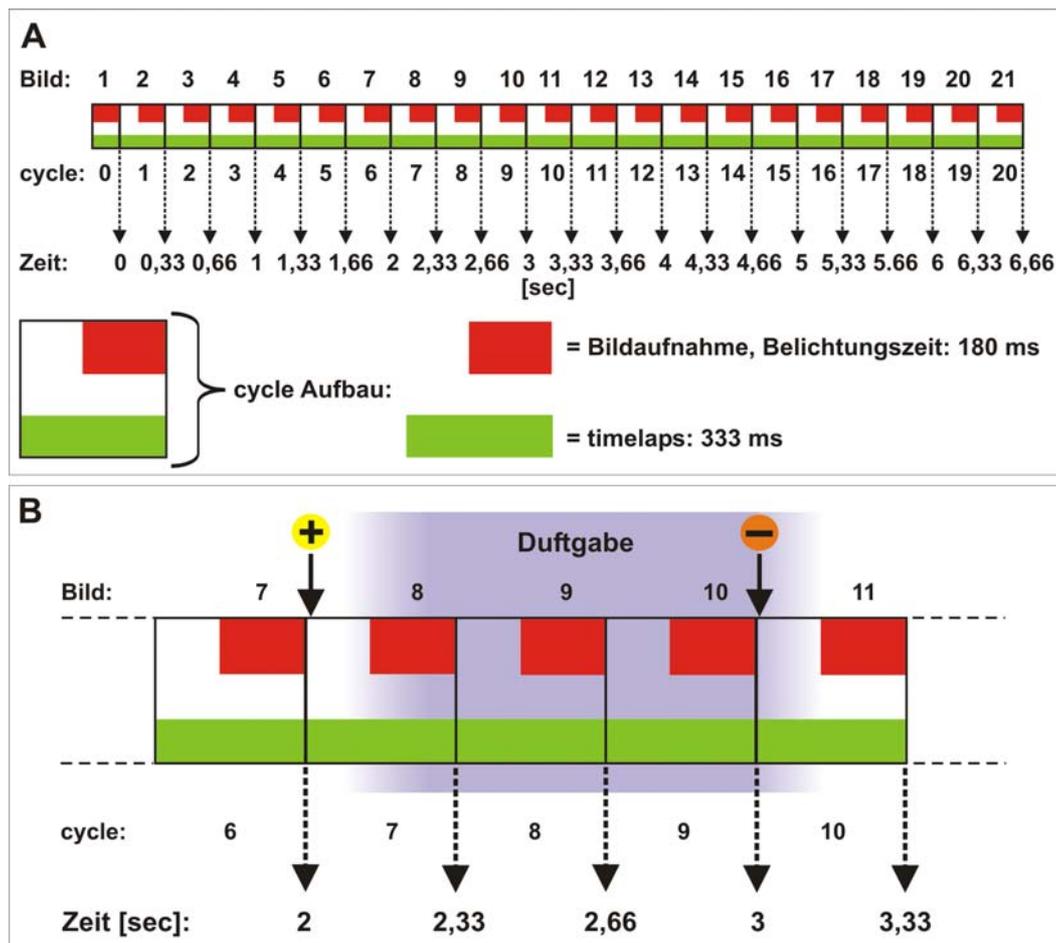
**Transfer speed** (Übertragungsgeschwindigkeit oder Ausleserate): Dies ist die Geschwindigkeit, mit der der Chip der CCD – Kamera ausgelesen wird. Die Ausleserate war bei allen Experimenten auf 20 MHz eingestellt, das entspricht einer Ausleserate von 20.000.000 Byte / Sekunde.

**Binning:** Ist die Möglichkeit über die Software Einzelpixel zu Pixelblöcken zusammenzufassen. Die hier verwendete CCD – Kamera, zusammen mit der Software, kann 1x1, 2x2, 3x3, 4x4, 8x8 Binnings ausführen. Am Beispiel des 4x4 Binnings bedeutet das, dass 4 Pixel vertikal und 4 Pixel horizontal zu einem Einzelbildpunkt verrechnet werden. Binning bedeutet also eine Änderung des Abbildungsmaßstabes, die Bildgröße wird nicht verändert. Ein 696 x 1040 Pixel großes Bild, das mit einem 4fach – Binning aufgenommen wurde, besteht also aus 174 x 260 Bildpunkten. Mit steigendem Binning erhöht sich die Empfindlichkeit der Pixel (Intensitätsverstärkung von schwach fluoreszierenden Proben) auf Kosten der Bildauflösung.

### **Messprotokoll**

Das Programm *MetaFluor* (Universal Imaging, Downington, PA) steuert die Datenaufnahme. Es kommuniziert mit der CCD – Kamera, dem Monochromator und dem Olfaktometer. So wird die Belichtungszeit der Kamera, die Frequenz der Bildaufnahme, die Wellenlänge des vom Monochromator gelieferten Anregungslichtes (436 nm), der Monochromator – Shutter und die Duftgabe durch das Olfaktometer gesteuert und synchronisiert.

Wie bereits erklärt, besteht eine Messreihe aus acht Duftmessungen. Jede Duftmessung läuft nach demselben Messprotokoll ab. Im Messprotokoll (Abb. 3.10) sind alle Messparameter festgelegt. Die Erstellung des Messprotokolls erfolgt in *MetaFluor*: Die einzelnen Messparameter werden in sog. "journals" festgelegt und die entworfenen "journals" in einer sog. "sequence" zusammengefasst. Diese sequence ist das Messprotokoll.



**Abb. 3.10** 3 Hz – Messprotokoll und Duftgabe

**A** 3 Hz – Messprotokoll. Es ist aus 21 cycles aufgebaut. Die cycle – Länge beträgt 333 ms. Am Ende jedes cycles wird ein EYFP –, ECFP – Bildpaar aufgenommen. Die Belichtungszeit der CCD – Kamera beträgt 180 ms. cycle 0 ist genauso lang wie die Belichtungszeit für das erste Bildpaar, nämlich 180 ms. Die nachfolgenden cycles sind alle 333 ms lang. Daraus resultiert, dass Bild n immer gleich cycle n – 1 ist. Die gesamte Messdauer beträgt 6,66 Sekunden.

**B** Duftgabe. Zu Beginn von cycle 7 (Messzeitpunkt: 2 Sekunden) wird das Duftrelais eines gewünschten Duftes geöffnet (+). Zu Beginn von cycle 11 (Messzeitpunkt: 3 Sekunden) wird dieses Duftrelais wieder geschlossen (-). Der Duftkanal ist also für 1 Sekunde geöffnet.

Das Messprotokoll (Abb. 3.10 A) ist aus 21 sich wiederholenden Einheiten aufgebaut, den sog. “cycles“. Die cycle – Länge wird durch die Einstellung in “timelaps“ bestimmt und beträgt 333 ms. In jedem cycle wird simultan ein EYFP – und ein ECFP – Bild vom virtuell geteilten Chip der CCD – Kamera aufgenommen. Die Bilder werden mit einem 4 x 4 Binning aufgenommen. Die Belichtungszeit ist so gewählt, dass die entstehenden Bilder eine genügend starke Intensität aufweisen, und beträgt 180 ms. Das Ende der Bildaufnahme fällt immer mit dem cycle – Ende zusammen. Aus diesen Einstellungen resultiert eine Bildaufnahmefrequenz von 3 Hz.

Die Nummerierung der cycles beginnt mit 0, und im Gegensatz zu den folgenden cycles, ist cycle 0 nur genauso lang wie die Belichtungszeit für das erste Bildpaar, nämlich 180 ms. Die nachfolgenden cycles sind alle 333 ms lang. Daraus resultiert, dass Bild  $n$  immer gleich cycle  $n - 1$  ist. Am Ende der Aufnahme von Bildpaar 1 wird die Zeit auf 0 gesetzt. Am Ende der Aufnahme von Bildpaar 2 sind 0,33 Sekunden vergangen, usw.. Die gesamte Messdauer beträgt also 6,66 Sekunden.

Die Duftgabe (Abb. 3.10 B) erfolgt über das Olfaktometer (s.a. Kapitel 3.4.4). Ein Duftbehälter des Olfaktometers ist mit Luft gefüllt, d.h. es gibt einen Luftkanal, dessen Duftrelais zu Beginn der Messung geöffnet ist, sodass nur Luft auf die Antennen der Fliege geblasen wird. Zu Beginn von cycle 7 (Messzeitpunkt: 2 Sekunden) wird dieses "Luftrelais" geschlossen und gleichzeitig das Duftrelais eines gewünschten Duftes geöffnet. Zu Beginn von cycle 11 (Messzeitpunkt: 3 Sekunden) wird dieses Duftrelais wieder geschlossen und das Luftrelais wieder geöffnet. Der Duftkanal ist also für 1 Sekunde geöffnet. Messungen ergaben, dass der Duftstrom ca. 100 – 200 ms benötigt, um vom Duftbehälter, über die PVC – Schläuche, den Duftverteiler und die aufgesetzte Pasteurpipette, bis zu den Antennen der Fliege zu gelangen. Der Duft kann also frühestens nach ca. 2,1 – 2,2 Sekunden Messzeit an der Antenne sein. Daher wurde der Stimulusstart bei 2,33 Sekunden festgelegt. Weiterhin endet der Duftstimulus auch nicht abrupt mit dem Schließen des Duftrelais: Nach dem Schließen des Duftrelais befinden sich noch Duftmoleküle in der Pasteurpipette (Totvolumen). Diese werden nach dem Umschalten vom Duft – auf das Luftrelais bei 3 Sekunden Messzeit, durch den Luftstrom auf die Antennen geblasen. Ein genauer Zeitpunkt für das Ende des Duftstimulus ist somit nicht festzulegen.

#### 3.4.5.1.3 Zusammenfassung der Experimente zur olfaktorischen Codierung

- Fliege: *GH146 – Cameleon2.1/ 82* homozygot, Weibchen
- Fokus: Laterales Protocerebrum
- Objektiv: 40x Wasserimmersion
- CCD – Kamera: Binning: 4 x 4  
Transfer speed: 20 MHz
- Messprotokoll: 3 Hz, Duftgabe bei 2,33 Sekunden, Messdauer: 6,66 Sek.

- Duftreihe: IAA  $10^{-7}$ , BEA  $10^{-7}$ , IAA  $10^{-5}$ , BEA  $10^{-5}$ , IAA  $10^{-3}$ ,  
BEA  $10^{-3}$ , IAA  $10^{-1}$ , BEA  $10^{-1}$ , MIN  
oder:  
MCH  $10^{-7}$ , ETA  $10^{-7}$ , MCH  $10^{-5}$ , ETA  $10^{-5}$ , MCH  $10^{-3}$ ,  
ETA  $10^{-3}$ , MCH  $10^{-1}$ , ETA  $10^{-1}$ , MIN

### 3.4.5.2 Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid

#### 3.4.5.2.1 Experimenteller Aufbau

Bei den Experimenten zur Depolarisation dient Kaliumchlorid [1M] als Stimulus. 10 $\mu$ l werden in den Tropfen Ringerlösung zwischen Objektiv und Fliegenpräparat mittels einer Pipette injiziert. Es hat die Eigenschaft die Neuronenmembranen zu depolarisieren und führt so zu einem massiven Einstrom von Calcium – Ionen in die Zellkörper. Das dort exprimierte Cameleon 2.1 – Protein kann diesen Einstrom messen.

Für die Messungen wird das gleiche Messprotokoll verwendet wie für die Duftmessungen (s.a. Kapitel 3.4.5.1.2). Allerdings besitzt es kein definiertes Ende, sondern wird manuell beendet, sodass das gesamte Calcium – Signal aufgenommen werden kann.

Da die Injektion der Kaliumchloridlösung manuell erfolgt, ist der Injektionszeitpunkt variabel. Nach der Injektion diffundiert die Kaliumchloridlösung zum Fliegengehirn und löst die Depolarisation und somit das Calciumsignal aus.

#### 3.4.5.2.2 Zusammenfassung Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid

- Fliege: *GH146 – Cameleon2.1/82* homozygot, Weibchen
- Fokus: Laterales Protocerebrum
- Objektiv: 40x Wasserimmersion
- CCD – Kamera: Binning: 4 x 4  
Transfer speed: 20 MHz
- Messprotokoll: 3 Hz, Endlosprotokoll

- Stimulus: Injektion von 10µl 1M Kaliumchloridlösung in den Ringertropfen zwischen Objektiv und Fliegenpräparat

### 3.4.5.3 Erstellung der Morphologiebilder

Die abgebildeten Morphologiebilder für die Experimente zur olfaktorischen Codierung und Depolarisation mit Kaliumchlorid sind reine EYFP – Bilder der Cameleon2.1 – Fluoreszenz. Die EYFP – Morphologiebilder können mittels zweier verschiedener Methoden erstellt werden:

- Die EYFP – Bilder werden direkt aus der Bilderserie des entsprechenden Experiments herausgenommen. Das CCD – Kamera – Binning beträgt 4 x 4 (s.a. Abschnitt 3.4.5.1.2), sodass die resultierenden 12 bit – Bilder eine Auflösung von 174 x 260 Bildpunkten besitzen.
- Nach Ende eines jeden Experiments wurde vom lateralen Protocerebrum ein z – stack (z – stepper: NV 40/1CL, Piezosystem Jena, Jena, Deutschland) angefertigt. Dabei arbeitete der Strahlenteiler im “full – view“ – Modus und das CCD – Kamera – Binning war 1x1, sodass die aufgenommenen 12 bit – EYFP – Bilder eine maximale Auflösung von 1392 x 1040 Pixel besitzen. Die Belichtungszeit betrug 2 Sekunden. Der Ebenenabstand innerhalb des stacks war 1µm, die Anzahl an aufgenommenen Ebenen war 50. Zum Einsatz kam nicht das Cameleon2.1 – Filter set – up, sondern ein FITC – Filter - Würfel (Anregung: Bandpass 450 – 490 nm, dichroitischer Langpass 510 nm, Emission: Bandpass 515 – 565 nm, Zeiss, Deutschland). Aus diesem Stack wird Ebene 25 herauskopiert und als Morphologiebild verwendet.

## 3.4.6 Datenauswertung

### 3.4.6.1 Experimente zur olfaktorischen Codierung

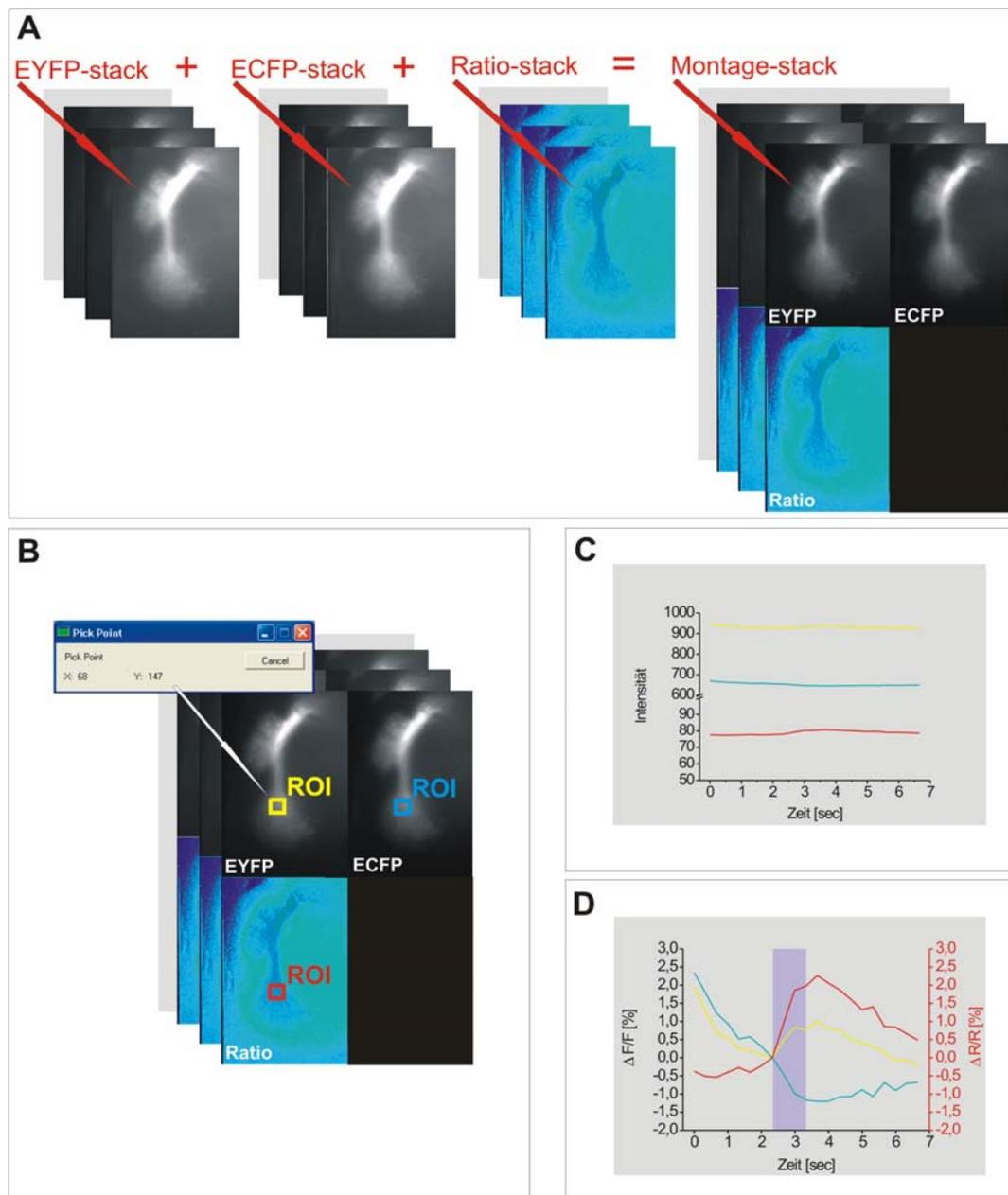
#### 3.4.6.1.1 Erstellung der Graphen

Die Erstellung der EYFP –, ECFP – und Ratiographen erfolgt in *MetaMorph*. Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit der Firma *VisitronSystems* (Puchheim, Deutschland) ein Ablauf von Bearbeitungsschritten etabliert, der es ermöglicht alle drei Graphen gleichzeitig in einem Diagramm darzustellen. Es besteht die Möglichkeit wiederholt sog. “regions of interest“ (ROIs) von variabler Größe auf eine beliebige Serie von EYFP –, ECFP – und Ratiobildern eines Experiments zu legen, und die entsprechenden Intensitäten aus diesen Regionen auszulesen. So können also EYFP –, ECFP – und Ratiointensitäten beliebiger Bereiche des gemessenen Areal als Graphen dargestellt werden.

Im Folgenden wird die Erstellung der Graphen (Abb. 3.11) näher erläutert:

Jede Duftmessung besteht wie bereits erklärt aus 21 EYFP –, 21 ECFP – und 21 Ratiobildern (s.a. Kapitel 3.4.5.1.2). Mit dem journal “StackMontage“ werden die Bilderserien eingelesen und zu einem “Stack“ zusammengefasst (Abb. 3.11 A). Aus den 21 einzelnen EYFP – Bildern entsteht so ein zusammenhängender EYFP – Stack. Aus den 21 einzelnen ECFP – Bildern entsteht ein ECFP – Stack. Und aus den 21 einzelnen Ratiobildern entsteht ein Ratio – Stack. Diese drei Stacks werden nun wiederum in einen einzigen Stack montiert, wobei der ehemalige EYFP – Stack oben links, der ehemalige ECFP – Stack oben rechts und der ehemalige Ratio – Stack unten links zum Liegen kommt (Abb 3.11 A). Dieser “Montage – Stack“ beinhaltet nun die gesamte Information über die EYFP –, ECFP – und Ratiodatensätze der Duftmessung.

Mit dem journal “ROI20x20pixel“ besteht die Möglichkeit ein 20 x 20 Pixel großes Quadrat als “region of interest“ (ROI) innerhalb des Montage – Stacks zu platzieren. Wichtig ist dabei, dass die ROI nur innerhalb des EYFP – Kompartiments beliebig platziert werden kann (gelbes Quadrat in Abb. 3.11 B). Das Programm zeigt dabei



**Abb. 3.11** Erstellung der EYFP –, ECFP – und Ratiographen in *MetaMorph*

**A** Das journal “StackMontage“ fasst EYFP –, ECFP – und Ratio – Stack zum Stack “Stackmontage“ zusammen. Er beinhaltet die gesamten Daten einer Duftmessung.

**B** Mit dem journal “ROI20x20pixel“ kann ein 20 x 20 Pixel großes Quadrat als ROI innerhalb des EYFP – Kompartiments des Montage – Stacks platziert werden (gelbes Quadrat). Es wird positionsgenau in das ECFP – und Ratio – Kompartiment übertragen und dient dort ebenfalls als ROI (blaues und rotes Quadrat).

**C** Das journal “Graph Intensities“ errechnet aus den drei ROIs die EYFP –, ECFP – und Ratiowerte für die gesamte Messung und stellt sie grafisch dar. Nur bei den EYFP – und ECFP – Werten handelt es sich um Rohdaten. Die Ratiowerte werden mit einem programminternen Faktor errechnet. Aufgetragen ist die Intensität gegen die Zeit. EYFP gelb, ECFP cyan, Ratio rot.

**D** Zur Darstellung der Graphen wird die Ratio als  $EYFP / ECFP$  neu berechnet. EYFP (gelb) und ECFP (rot) werden als  $\Delta F/F$  [%], die Ratio (rot) als  $\Delta R/R$  [%] dargestellt. Der blaue Balken symbolisiert den Duftstimulus. Zu Beginn des Duftstimulus werden alle drei Graphen auf 0 gesetzt.

die x – und y – Koordinaten des Quadrats an, so dass eine genaue Lokalisation der ROI möglich ist. Ist die EYFP - ROI platziert, berechnet das Journal die exakte Position für die ECFP – ROI (blaues Quadrat in Abb. 3.11 B) und die Ratio – ROI (rotes Quadrat in Abb. 3.11 B), und platziert sie im ECFP – und Ratio – Kompartiment des Montage – Stacks an genau derselben Position wie im EYFP – Kompartiment. Für die Auswertung der Duftmessungen wurden 20 x 20 Pixel große Quadrate als ROIs verwendet und im proximalen Bereich des lateralen Protocerebrums platziert. Es besteht darüber hinaus jedoch die Möglichkeit beliebige ROIs zu kreieren und einzusetzen.

Nach der Auswahl der ROI, öffnet sich das Dialogfenster “Open Data Log“ (nicht abgebildet). Hier besteht die Möglichkeit den Datentransfer zu *Excel* oder *Origin* (Datenverwaltungs- und – darstellungsprogramme) zu aktivieren.

Das Journal “Graph Intensities“ errechnet aus den drei ROIs im Montage – Stack die Graphen für EYFP, ECFP und Ratio. Jedes Einzelbild des Montage – Stacks liefert dabei drei Messwerte für den entsprechenden Messzeitpunkt: Je einen für EYFP, ECFP und Ratio. Die Messwerte stellen das arithmetische Mittel der verschiedenen Intensitätswerte innerhalb der ROI dar. Bei der grafischen Darstellung der Messwerte gegen die Zeit (Abb. 3.11 C), ist zu beachten, dass es sich nur bei den EYFP – und ECFP – Daten (Intensitäten) um Rohdaten handelt. Da *MetaMorph* zu jedem Quotienten aus EYFP – Bild und ECFP – Bild einen programmimmanenten Faktor addiert um das entstehende Ratiobild in einer angemessenen Weise grafisch darstellen zu können, handelt es sich bei den dargestellten Ratiowerten (Abb. 3.11 C) nicht mehr um Rohdaten. Daher werden zur Erstellung der Graphen die Ratiowerte neu berechnet:

$$\text{Ratio} = \text{EYFP – Rodaten} / \text{ECFP – Rohdaten}.$$

Änderungen in der EYFP – und ECFP – Fluoreszenz werden als  $\Delta F/F \times 100$ , also prozentual, dargestellt (Abb. 3.11 D). Dabei ist  $\Delta F$  die Differenz aus dem aktuellen Intensitätswert minus dem Mittelwert der Intensitätswerte 3 – 5 der Duftmessung (= Basisfluoreszenz). Demnach ist  $\Delta F = F_{\text{aktuell}} - F_{\text{Basis}}$ . Änderungen der Ratio werden als  $\Delta R/R$  [%] dargestellt. Dabei ist  $\Delta R$  die Differenz aus dem

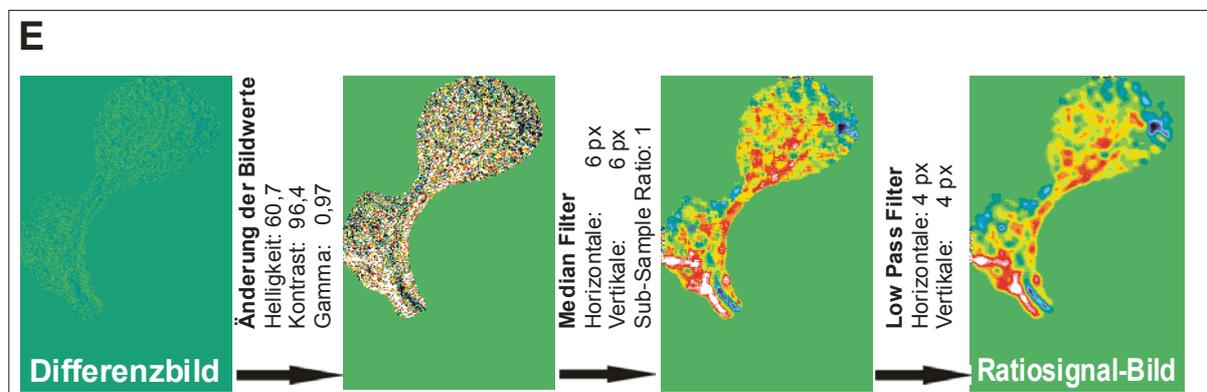
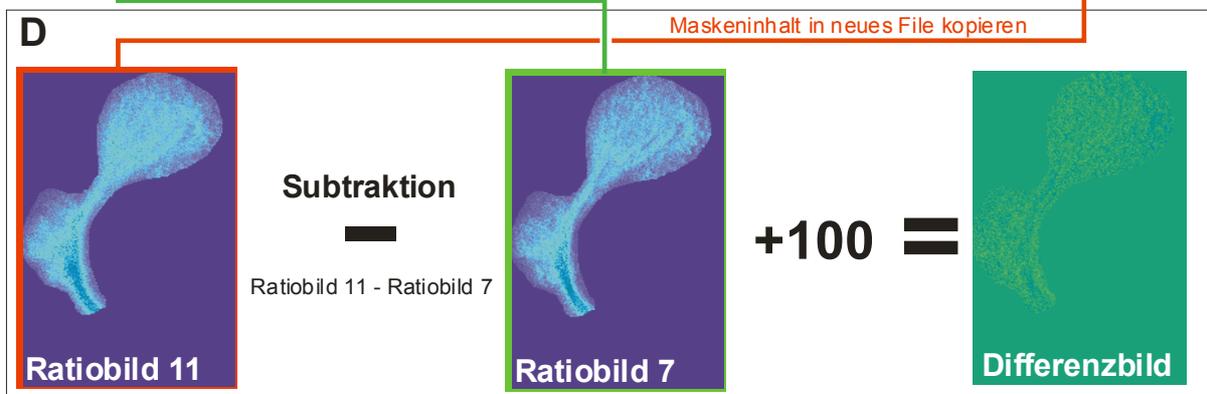
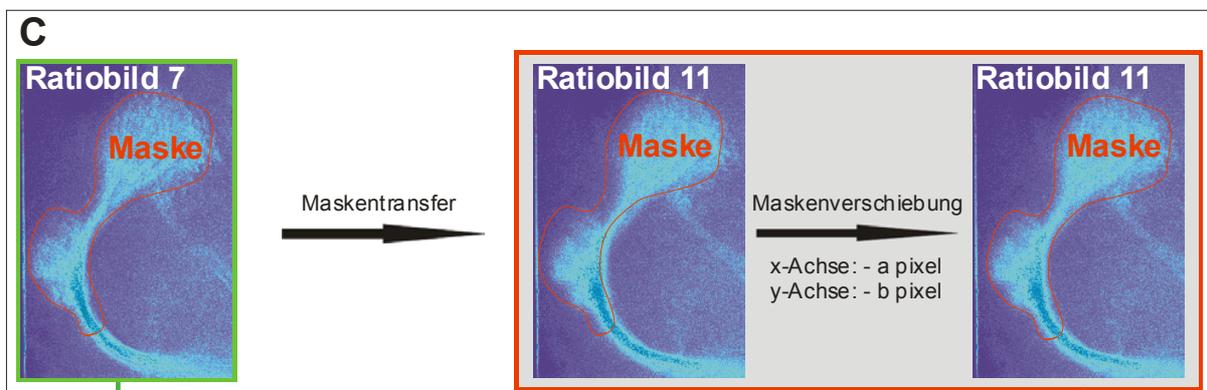
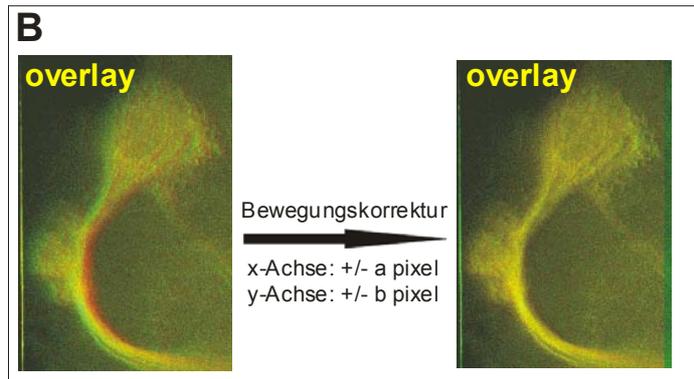
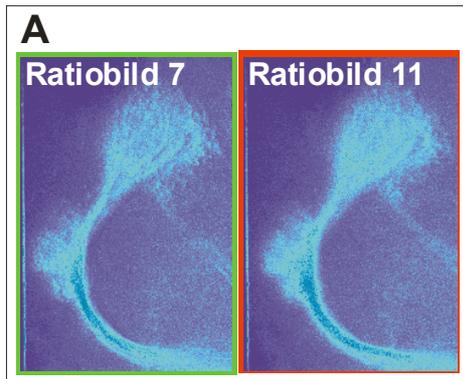
aktuellen Ratiowert minus dem gemittelten Ratiowert für die Messwerte 3 – 5 (= Basis – Ratiowert). Demnach ist  $\Delta R = R_{\text{aktuell}} - R_{\text{Basis}}$ . Die drei Graphen werden zu Beginn der Duftgabe (Messzeitpunkt = 2,33 Sekunden) auf 0 gesetzt. Ein blauer Balken in den Diagrammen symbolisiert die Duftgabe.

#### 3.4.6.1.2 Erstellung und Skalierung der $\text{Ca}^{2+}$ – Aktivitätsmuster

##### **Erstellung der Ratiosignal – Bilder ( $\text{Ca}^{2+}$ – Aktivitätsmuster)**

Um die Veränderung der Ratiowerte innerhalb des gemessenen Areal optisch darstellen zu können, genügt es bei den Duftexperimenten nicht, die Ratiobilder ohne vorherige Bearbeitung zu betrachten. Dies liegt daran, dass sich die Ratio EYFP – / ECFP – Fluoreszenz bei einem Duftstimulus nur um wenige Prozent ändern und, dass diese geringfügige Veränderung in den unbearbeiteten Ratiobildern nicht zu erkennen ist. In Folge dessen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Ablauf von Bildbearbeitungsschritten etabliert, um die sog. “Ratiosignal – Bilder“ zu erstellen: Das Prinzip der Erstellung der Ratiosignal – Bilder ist der Abzug eines vor dem Duftstimulus aufgenommenen Ratiobildes von einem während des Duftstimulus aufgenommenen Ratiobildes. Das resultierende Differenzbild (= Ratiosignal – Bild) zeigt das verbleibende Ratiosignal, das dem Duftstimulus zuzuschreiben ist. Dieses Bild repräsentiert also die duftinduzierten Calciumsignale und dient als Maß für die räumliche neuronale Aktivität (Ratiosignal – Bild = “ $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster“). Jede Duftmessung besteht wie bereits erklärt aus 21 Ratiobildern (s.a. Kapitel 3.4.5.1.2). Bei allen abgebildeten Ratiosignal – Bildern des lateralen Protocerebrums wurde das Ratiobild 7 vom Ratiobild 11 abgezogen. Ratiobild 7 (Messzeitpunkt: 2 Sekunden) ist das letzte Bild vor dem Duftstimulus. Ratiobild 11 (Messzeitpunkt: 3,33 Sekunden) liegt im cycle, in dem der Duftstimulus beendet wird. Die Erstellung der Ratiosignal – Bilder erfolgt in *MetaMorph*. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte näher erläutert (Abb. 3.12):

Obwohl die geöffnete Schädelkapsel der Fliege fixiert ist, kann sich das Fliegengehirn während der Messung bewegen. Wurde die Fliege während der Präparation stark traumatisiert, kann es zu rhythmischen Muskelkontraktionen und in



**Abb. 3.12** Erstellung der Ratiosignal – Bilder ( $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster) in *MetaMorph*

**A** Ratiobilder 7 und 11 einer Duftmessung.

**B** Bewegungskorrektur. Ratiobild 7 (grün) und Ratiobild 11 (rot) werden mit “Overlay Images” übereinander gelegt (gelb). Die grünen und roten Ränder zeigen, dass die beiden Bilder nicht deckungsgleich sind. Bild 11 wird auf Bild 7 verschoben, sodass die Ränder verschwinden und ein einheitlich gelbes Überlagerungsbild entsteht. Man erhält die Verschiebungskordinaten für die x – Achse: +/- a Pixel und die y – Achse: +/- b Pixel.

**C** Maskenerstellung und Transfer. Mit “Region tools” wird eine Maske um das gewünschte Areal (laterales Protocerbrum, Calyx und innerer Antennocerebraltrakt) von Bild 7 gezogen. Mit der Option “Transfer regions” wird die Maske unter Beibehaltung ihrer Position auf Bild 11 übertragen. Mit der Option “Move all regions” wird die Maske in Bild 11 um die Verschiebungskordinaten x: -a Pixel und y: -b Pixel, d.h. mit umgedrehten Vorzeichen, verschoben.

**D** Erstellung Differenzbild. Der Maskeninhalte von Bild 7 und 11 aus **C** wird kopiert und jeweils in ein neues File eingefügt. Mit der Option “Arithmetic” erfolgt die Bildsubtraktion von Ratiobild 11 minus Ratiobild 7. Damit bei der Subtraktion keine negativen Zahlen auftreten und, damit das entstehende Differenzbild im mittleren 8 bit – range liegt, wird 100 addiert.

**E** Bildbearbeitung. Mit “Adjust Digital Contrast” werden die Bildattribute Helligkeit, Kontrast und Gammawerte geändert. Es wird ein Median Filter mit der Fenstergröße von 6 x 6 Pixeln angewandt und danach ein Low Pass Filter mit der Fenstergröße von 4 x 4 Pixeln.

Zuge dessen, zu mehr oder weniger starken Pumpbewegungen der Gehirnflüssigkeit kommen. Diese Pumpbewegungen können das Gehirn in x –, y – und z – Richtung auslagern. Die Ratiobilder 7 und 11 einer Duftmessung (Abb. 3.12 A) sind also nur mehr oder weniger deckungsgleich. Bevor das Differenzbild erstellt werden kann, müssen die beiden Bilder bewegungskorrigiert werden. Die Bewegungskorrektur ist nur in x – und y – Richtung möglich, z – Bewegungen bleiben unkorrigiert. Die Bewegungskorrektur (Abb. 3.12 B) erfolgt mit der Option “Overlay images“. Beide Ratiobilder werden übereinander gelegt, wobei Bild 7 mit einem Grünfilter und Bild 11 mit einem Rotfilter dargestellt wird. Die Bereiche der Bildüberlagerung sind gelb. Wie man in Abb. 3.12 B deutlich sieht, kommt es bei der Überlagerung von nicht deckungsgleichen Bildern zu roten und grünen Rändern. Zur Bewegungskorrektur wird Bild 11 auf Bild 7 so verschoben, dass die Ränder verschwinden und ein einheitlich gelbes Überlagerungsbild entsteht. Man erhält die Verschiebungskordinaten für die x – Achse: +/- a Pixel und die y – Achse: +/- b Pixel.

Um Ratiobild 11 um die erhaltenen Verschiebungskordinaten zu korrigieren, wird mit der Option "Region tools" eine Maske um das gewünschte Areal (laterales Protocerbrum, Calyx und innerer Antennocerebraltrakt) von Bild 7 gezogen (Abb. 3.12 C). Mit der Option "Transfer regions" wird diese Maske unter Beibehaltung ihrer Position auf Bild 11 übertragen. Mit der Option "Move all regions" wird die Maske in Bild 11 um die Verschiebungskordinaten  $x: -a$  Pixel und  $y: -b$  Pixel, d.h. mit umgedrehten Vorzeichen, verschoben. Bsp.: Waren die Verschiebungskordinaten der Bewegungskorrektur  $x: +5$ ,  $y: +3$ , so wird die Maske um  $x: -5$ ,  $y: -3$  Pixel verschoben.

Der Maskeninhalte von Bild 7 wird kopiert und in ein neues File eingefügt (Abb. 3.12 D). Der Maskeninhalte von Bild 11 wird ebenfalls kopiert und in ein neues File eingefügt. Das neu entstandene Ratiobild 11 ist jetzt bewegungskorrigiert. Mit der Option "Arithmetic" erfolgt die eigentliche Bildsubtraktion von Ratiobild 11 minus Ratiobild 7. Damit bei der Subtraktion keine negativen Zahlen auftreten und, damit das entstehende Differenzbild im mittleren 8 bit – range liegt, wird 100 addiert.

Das resultierende Differenzbild muss noch drei weitere Bearbeitungsschritte durchlaufen bevor das Ratiosignal optisch hervorgehoben erscheint (Abb. 3.12 E). Zuerst werden die Bildattribute verändert. Folgende Einstellungen werden im Dialogfenster "Adjust Digital Contrast" vorgenommen:

- Helligkeit: 60,7
- Kontrast: 96,4
- Gamma: 0,97

Anschließend wird ein Median Filter auf das Bild angewandt (Menü: "Process"). Der Median Filter entfernt Pixel, deren Graustufenwerte (Achtung: Das Differenzbild ist immer noch ein Graustufenbild, die Graustufen sind lediglich falschfarbencodiert!) sich wesentlich von denen benachbarter Pixel unterscheiden. So bleiben die Bilddetails erhalten und das Rauschen wird reduziert. Der Filter arbeitet nach dem "sliding window" – Prinzip, d.h. ein definiertes Fenster von horizontalen und vertikalen Pixeln wandert über jedes Pixel des Bildes und ersetzt den Wert des zentralen Pixels mit dem Median des Fensters. Der Median ist definiert als der Wert

einer aufsteigenden Zahlenreihe, der dieselbe Anzahl an größeren und kleineren Werten als er selbst um sich hat.

Beispiel: Das Fenster besteht aus 3 Pixeln horizontal und 3 Pixeln vertikal:

6	2	0
3	97	4
19	3	10

x	x	X
x	4	X
x	x	X

**Fenster vor der Medianfilterung:**

Zentraler Pixel hat die Intensität 97  
Die Zahlenreihe lautet: 0, 2, 3, 3, 4, 6, 10, 15, 96  
Der Median ist 4

**Fenster nach der Medianfilterung:**

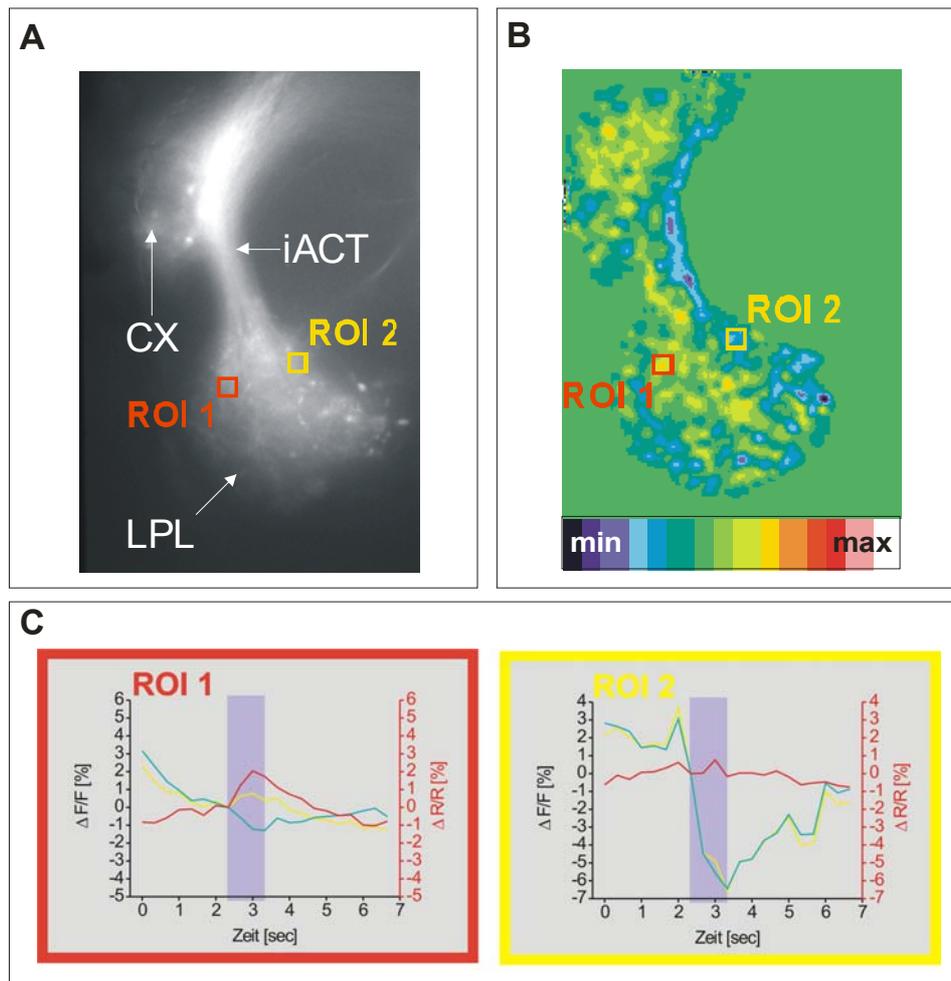
Dem zentralen Pixel wurde der Median des Fensters zugewiesen.

Bei der Erstellung der Ratiosignal – Bilder kommt ein Median Filter mit der Fenstergröße 6 x 6 Pixel zum Einsatz. Da die aufsteigende Zahlenreihe also aus 36 Werten besteht, gibt es keinen Wert, der genau in der Mitte liegt. Für diesen Fall einer geraden Anzahl von Werten, ist der Median der Mittelwert der beiden mittleren Werte der Zahlenreihe.

Zum Abschluss der Bildbearbeitung wird ein Low Pass Filter auf das Ratiosignal – Bild angewendet (Menü: “Process“). Er arbeitet ebenfalls nach dem “sliding – windows“ – Prinzip und reduziert Intensitätsunterschiede in den Graustufen der einzelnen Pixel. Das Low Pass Filter – Fenster wandert über das Bild und bildet den Durchschnitt (average) der Pixelintensitäten. Das Bild erfährt so eine Glättung der “Ecken“. Die Fenstergröße ist 4 Pixel horizontal und 4 Pixel vertikal.

### Skalierung der Ratiosignal – Bilder

Die in diesem Kapitel beschriebenen Änderungen der Bildattribute und Fenstergrößen der Filter wurden empirisch so ausgewählt, dass die entstehenden Ratiosignal – Bilder die Ratioänderungen optisch möglichst gut widerspiegeln. Abbildung 3.13 dient als Nachweis für die Verlässlichkeit dieser Skalierung: Abgebildet ist eine Isoamylacetat – Messung der Verdünnungsstufe  $10^{-3}$ . Der Fokus



**Abb. 3.13** Skalierung der Ratiosignal – Bilder am Bsp. einer IAA  $10^{-3}$  – Messung

**A** EYFP – Morphologiebild. Innerhalb der zwei ROIs wird die Fluoreszenzänderung gemessen. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt.

**B** Ratiosignal – Bild. Die beiden ROIs aus **A** sind positionsgenau übertragen. Abgebildet ist der Skalierungsbalken für die Falschfarbencodierung des Ratiosignals. In ROI 1 liegt ein orangener Spot. Er steht für ein Calciumsignal. In ROI 2 liegt ein dunkelblaues Areal. Hier tritt kein Calciumsignal auf.

**C** EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratiographen (rot) aufgetragen gegen die Zeit. Die Graphen für ROI 1 zeigen ein duftinduziertes Calciumsignal mit steigendem EYFP – Graph, fallendem ECFP – Graph und steigender Ratio. In ROI 2 tritt kein Calciumsignal auf, die Ratio bleibt flach. Der blaue Balken symbolisiert die Duftgabe. Die Spuren weisen nach, dass die Falschfarbenskalierung der Ratiosignal – Bilder richtig gewählt ist.

der Messung liegt auf dem lateralen Protocerebrum (Abb. 3.13 A). Es sind zwei ROIs ausgewählt, die auch im Ratiosignal – Bild eingezeichnet sind (Abb. 3.13 B). In ROI 1 wird ein deutliches Calciumsignal auf den Duft hin detektiert (Abb. 3.13 C). In ROI 2 hingegen tritt kein Calciumsignal auf. Dieser Unterschied ist im Ratiosignal – Bild

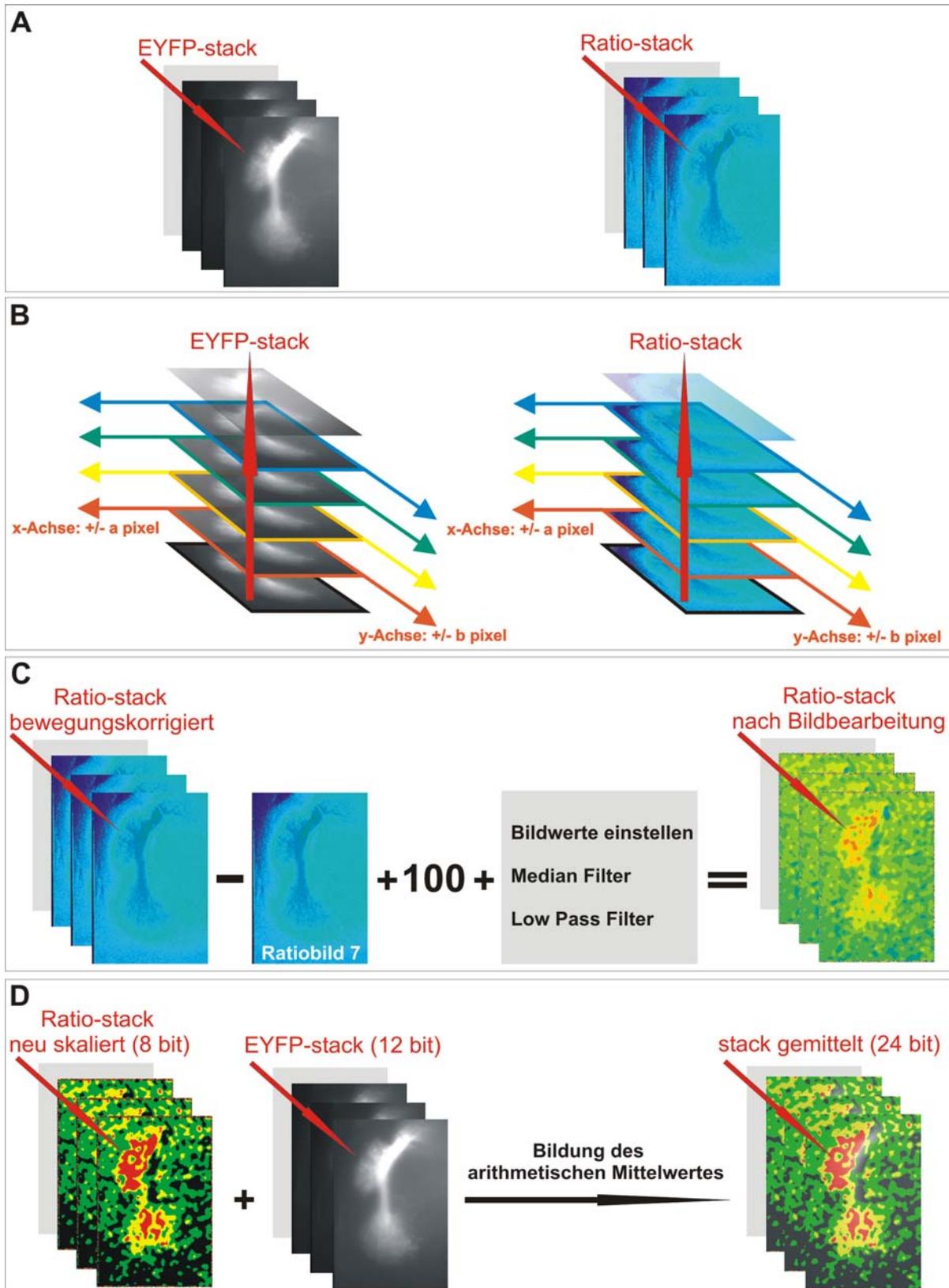
deutlich erkennbar: Das Areal in ROI 1, das ein duftinduziertes Calciumsignal zeigt, ist als orangener Spot zu erkennen. Das Areal von ROI 2, das keine Duftantwort zeigt, ist dunkelblau dargestellt. Der Skalierungsbalken in Abb. 3.13 B zeigt ganz allgemein die Falschfarbencodierung der Ratiosignal – Bilder. Der mit “min“ bezeichnete Bereich der Skala (Schwarz und Blautöne) steht für Bildareale, in denen kein Calciumsignal auftritt. Im mittleren Bereich der Skala (Grüntöne) beginnen die Calciumsignale und erfahren im mit “max“ gekennzeichneten Bereich (Rottöne und Weiß) ihr Maximum.

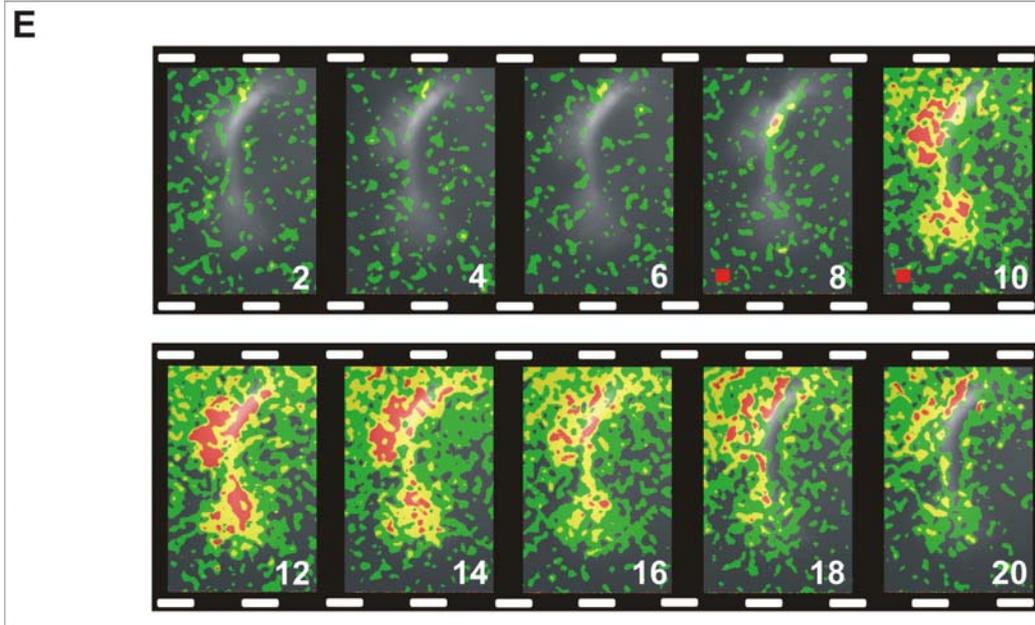
Zur Erstellung der Graphen für Abb. 3.13 wurden 10 x 10 Pixel große Quadrate als ROI eingesetzt. 20 x 20 Pixel ROIs sind so groß, dass immer ein Ratiosignal – lieferndes Areal miteinbezogen würde. Somit könnte der Nachweis von Arealen ohne Signal nicht geführt werden.

#### 3.4.6.1.3 Darstellung der Calciumsignale als Filme

Neben den Ratiosignal – Bildern wurden für einige Duftmessungen auch Ratiosignal – Filme erstellt. Im Gegensatz zu den Ratiosignal – Bildern vermitteln sie nicht nur einen optischen, sondern auch ein zeitlichen Eindruck der Calciumsignale. Die Ratiosignal – Filme wurden in *MetaMorph* erstellt. Dazu war es nötig, eine Serie von Bearbeitungsschritten zu entwickeln, die im Folgenden näher erläutert werden (Abb. 3.14):

Mit der Option “Build stack numbered extensions“ wird der EYFP – Stack einer beliebigen Duftmessung gebildet (Abb 3.14 A). Er besteht wie bereits erklärt aus 21 EYFP – Bildern (s.a. Kapitel 3.4.5.1.2). Mit der Option “Build stack numbered names“ wird der Ratio – Stack der selben Duftmessung gebildet. Er besteht auch aus 21 Bildern. Wie bei der Erstellung der Ratiosignal – Bilder, ist es auch bei der Erstellung der Ratiosignal – Filme eine Bewegungskorrektur der einzelnen Stackbilder nötig (Abb. 3.14 B). Mit der Option “align stack“ können die einzelnen Bilder eines Stacks so verschoben werden, dass sie deckungsgleich werden. Dabei dient Bild 1 des Stacks als Referenzbild, auf das alle anderen Bilder korrigiert werden. Man erhält für jedes korrigierte EYFP – Bild die Verschiebungskordinaten: x – Achse: +/- a Pixel, y – Achse: +/- b Pixel. Die Korrektur des Ratio – Stacks erfolgt mit den selben Koordi -





**Abb. 3.14** Erstellung der Ratiosignal – Filme für die Experimente zur olfaktorischen Codierung in *MetaMorph*

**A** Mit “Build stack numbered extensions” und “Build stack numbered names” werden EYFP – und Ratio – Stack einer Duftmessung gebildet.

**B** Bewegungskorrektur. Mit “align stack” werden die Bilder des EYFP – Stacks verschoben und mit dem Referenzbild (Bild 1 des EYFP – Stacks) zur Deckung gebracht. Die Bewegungskorrektur des Ratio – Stacks erfolgt mit den erhaltenen Verschiebungskordinaten x – Achse: +/- a Pixel, y – Achse: +/- b Pixel aus der EYFP – Stack – Korrektur.

**C** Subtraktion und Bildbearbeitung des bewegungskorrigierten ratio - Stacks. Mit “Arithmetic” wird das bewegungskorrigierte Ratiobild 7 des Stacks von allen Ratiobildern des bewegungskorrigierten Ratio – Stacks abgezogen und je Bild 100 addiert. Bildbearbeitung: Mit “Adjust Digital Contrast” werden die Bildattribute Helligkeit (60,7), Kontrast (96,4) und Gammawert (0,97) der Bilder des Differenz – Stacks geändert. Es wird ein Median Filter mit der Filtergröße von 6 x 6 Pixeln angewandt und danach ein Low Pass Filter mit der Filtergröße von 4 x 4 Pixeln.

**D** Bildung des arithmetischen Mittelwertes von Ratio – und EYFP – Stack. Die Falschfarbendarstellung des 8 bit Ratio – Stacks wird neu skaliert, sodass alle Bildwerte unterhalb des Calciumsignals mit der Farbe Schwarz, das ansteigende Calciumsignal mit den Farben Grün, Gelb und Rot belegt sind. Beide Stacks werden mit “color combine” zu 24 bit Stacks gemacht und mit “Arithmetic” zu einem 24 bit – Stack gemittelt.

**E** Erstellung des Ratiosignal – Filmes. Mit “Make Movie” wird der gemittelte Stack zu einem Film im .AVI – Format konvertiert. Die gewählte Abspielzeit des Filmes beträgt 333 ms / Bild und entspricht somit der Realgeschwindigkeit der experimentellen Bildaufnahme. Abgebildet ist ein exemplarischer Ausschnitt aus einem Ratiosignal – Film. Jedes zweite Bild ist abgebildet, d.h. der Abstand zwischen den Bildern beträgt 0,66 Sekunden. In Bildern 2 – 6 dominiert die Morphologie des gemessenen Areals (laterales Protocerebrum, Calyx, innerer Antennocerebraltrakt). Sie ist in Graustufen dargestellt und entspricht dem ehemaligen EYFP – Stack. Über der Morphologie liegt das falschfarbencodierte Ratiosignal: Bilder 2 – 6 zeigen nur Rauschen, das sich über die gesamten Bilder verteilt. Bei Bild 8 beginnt der Duftstimulus, Bild 12 zeigt das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum und Calyx, Bilder 14 – 20 zeigen die stetige Abnahmen des Calciumsignal nach dem Ende der Duftgabe. Rotes Viereck in Bildern 8 und 10 symbolisiert die Duftgabe.

naten, da der Ratio – Stack aus der gleichen Duftmessung stammt, und somit die selbe Verschiebung der Einzelbilder aufweist.

Damit das Ratiosignal des Filmes dem Ratiosignal des Ratiosignal – Bildes entspricht, muss wie bei der Erstellung der Ratiosignal – Bilder, Ratiobild 7 von allen Bildern das Ratiostacks abgezogen und 100 addiert werden (Abb. 3.14 C, s.a. Kapitel 3.4.6.1.2). Dafür wird Ratiobild 7 aus dem bereits bewegungskorrigierten Ratio – Stack verwendet. Die Bildsubtraktion und Addition von 100 wird mit der Option “Arithmetic“ vorgenommen. Der so erhaltene Ratio – Differenz – Stack muss noch drei weitere Bearbeitungsschritte durchlaufen bevor das Ratiosignal optisch hervorgehoben erscheint. Zuerst werden die Bildattribute verändert. Folgende Einstellungen werden im Dialogfenster “Adjust Digital Contrast“ vorgenommen:

- Helligkeit: 60,7
- Kontrast: 96,4
- Gamma: 0,97

Anschließend wird ein Median Filter mit der folgenden Filtergröße auf die Bilder angewandt (Menü: “Process“):

- Horizontale Pixelanzahl: 6
- Vertikale Pixelanzahl: 6
- Sub – Sample – Ratio: 1

Anschließend wird ein Low Pass Filter mit der folgenden Filtergröße auf die Bilder angewandt (Menü: “Process“):

- Horizontale Pixelanzahl: 4
- Vertikale Pixelanzahl: 4

Die vorgenommenen Änderungen der Bildattribute und Filtereinstellungen entsprechen denen der Ratiosignal – Bilder.

Um im Film nur Calciumsignale zu sehen, müssen die Falschfarben des erhaltenen Ratio – Stacks neu skaliert werden. Hierzu besteht in *MetaMorph* die Möglichkeit einen neuen “Look – Up – Table“ (LUT) zu entwerfen. Alle Bildwerte unter 100 (100 wurde bei der Subtraktion von Ratiobild 7 vom Ratio – Stack addiert!), d.h. die schwarzen und blauen Areale der Ratio – Stack – Bilder werden im neuen LUT mit der Farbe Schwarz belegt. Die Pixel mit Werten 100 und größer, werden mit steigender Intensität mit den Farben Grün, Gelb und Rot belegt (Abb. 3.14 D). Der so erhaltene neu skalierte Ratio – Stack (8 bit) und der EYFP – Stack (12 bit) werden mit der Option “color combine“ (“single image“ aktivieren) zu 24 bit – Stacks gemacht. Die beiden Stacks werden mit der Option “average“ im Dialogfenster “Arithmetic“ zu einem gemittelten 24 bit – Stack verrechnet (Abb. 3.14 D). Zur besseren Darstellung wurden die Bildattribute der gemittelten Stacks aller Duftmessungen mit der Option “Adjust Digital Contrast“ wie folgt verändert:

- Helligkeit: 64
- Kontrast: 54
- Gammawert: 1,05

Nach der Einstellung der Bildattribute muss im Dialogfenster “Adjust Digital Contrast“ der “fix contrast“ – button gedrückt werden, da sonst die Bildeinstellungen bei der Erstellung des “.AVI“ – Files (Filmformat) verloren gehen. Als Symbol für die während der Messung gegebene Duftgabe, wird in Bild 8, 9 und 10 des gemittelten Stacks, im linken untere Eck, ein 15 x 15 Pixel großes rotes Quadrat eingefügt. Mit der Option “Make Movie“ wird aus dem gemittelten Stack der Ratiosignal – Film erstellt. Das Filmformat ist “.AVI“, die Abspielgeschwindigkeit / Bild wird als “10 / 30 th of a second“, also 333ms / Bild gewählt (Frequenz: 3 Hz). Die Abspielgeschwindigkeit entspricht also der Realgeschwindigkeit der experimentellen Bildaufnahme. Abbildung 3.14 E zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus einem Ratiosignal – Film. Es ist jedes zweite Bild abgebildet, d.h. der Abstand zwischen den Bildern beträgt 0,66 Sekunden. In Bildern 2 – 6 dominiert die Morphologie des gemessenen Areals (laterales Protocerebrum, Calyx, innerer Antennocerebraltrakt). Sie ist in Graustufen dargestellt und entspricht dem ehemaligen EYFP – Stack. Über der Morphologie liegt das falschfarbencodierte Ratiosignal. In Bildern 2 – 6 ist nur Rauschen zu erkennen, das sich über die gesamten Bilder verteilt. Bei Bild 8 beginnt der Duftstimulus (rotes

Viereck in der linken unteren Bildecke), Bild 12 zeigt das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum und Calyx, und Bilder 14 – 20 zeigen die stetige Abnahmen des Calciumsignal nach dem Ende der Duftgabe.

Die Filme zur olfaktorischen Codierung von Düften im lateralen Protocerebrum, können auf der beigefügten CD – ROM über den Pfad: "Filme / Exp\_olfaktorische Codierung / LPL" eingesehen werden.

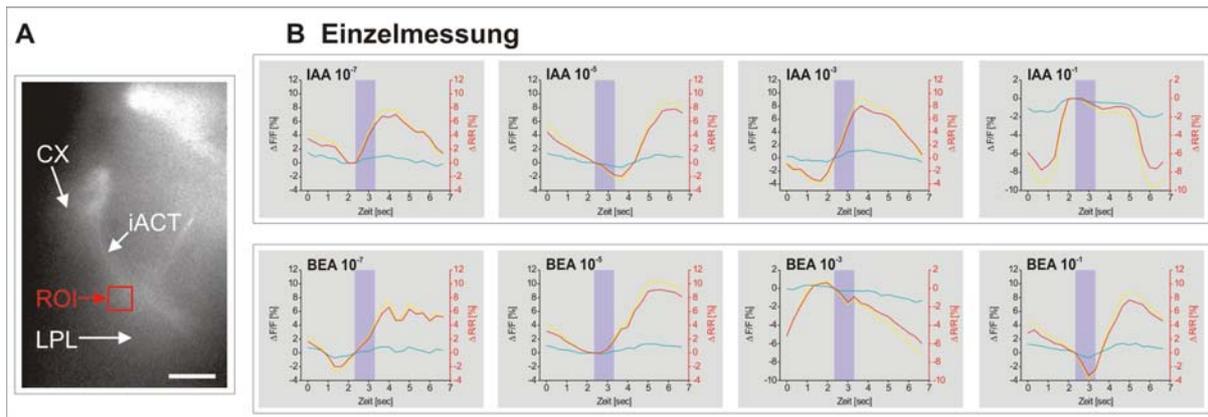
#### 3.4.6.1.4 Kriterien zur Auswahl gemessener Individuen

Für die Duftexperimente wurden ca. 50 weibliche Fliegen präpariert. Nur 12 davon wurden gegen den IAA / BEA – Konzentrationsgradienten, 9 gegen den MCH / ETA – Konzentrationsgradienten getestet. Die anderen 29 Fliegen wurden entweder bei der Präparation stark beschädigt, oder zeigten schon zu Beginn der Messung keine Signale; diese Fliegen wurden sofort verworfen. Von den 21 getesteten Fliegen wurden 8 für den Ergebnisteil ausgewertet, die anderen 13 Fliegen wurden aus folgenden Gründen aus der Statistik herausgenommen:

##### 1. Zu starke Bewegung des Fliegengehirns:

Obwohl die geöffnete Schädelkapsel der Fliege fixiert ist, kann sich das Fliegengehirn während der Messung bewegen. Wurde die Fliege während der Präparation traumatisiert, kann es zu rhythmischen Muskelkontraktionen und in Zuge dessen zu Pumpbewegungen der Gehirnflüssigkeit kommen. Diese Pumpbewegungen können das Gehirn in x –, y – und z – Richtung auslagern. Sind die Bewegungen sehr stark, ist eine Auswertung der Fliege nicht möglich.

Abbildung 3.15 stellt exemplarisch eine Einzelmessung mit sehr starker Bewegung vor. Schon die Unschärfe das EYFP – Morphologiebildes (Abb. 3.15 A) verdeutlicht die starke Bewegung. Die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratiographen (rot) der Messung gegen den Isoamylacetat (IAA) – und Benzaldehyd (BEA) – Konzentrationsgradienten zeigen den zeitlichen Verlauf der starken Bewegung (Abb. 3.15 B). Über den gesamten Verlauf der Messung zeigt die Fliege starke rythmische Bewegungen, die zu allen möglichen Zeitpunkten der Messung auftreten und keine



**Abb. 3.15** Exemplarische Darstellung von starker Bewegung des Fliegengehirns

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **B** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25 $\mu$ m.

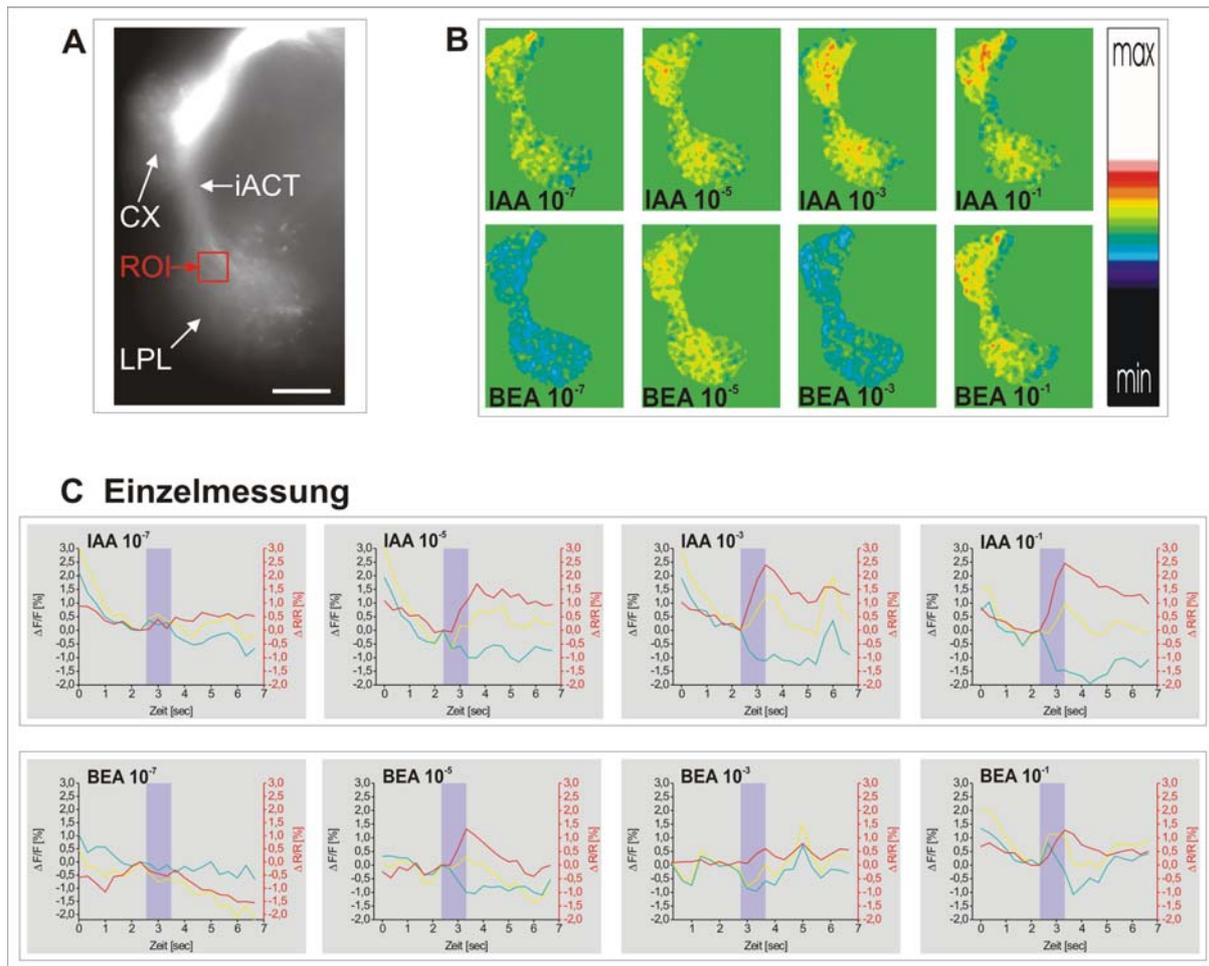
**B** Zeitlicher Verlauf der EYFP (gelb) – ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) auf die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP/ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

Reaktion auf die Duftgabe darstellen. Die Ratioänderung erreicht Maxima von bis zu 9% und Minima von bis zu – 8%. Hochkonzentrierte Düfte (Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ ) erzielen unter normalen Umständen einen Anstieg der Ratio um ca. 3%, d.h. duftinduzierte Signaländerungen können bei der abgebildeten Fliege nicht erkannt werden, sie sind durch die starke Bewegung überlagert. Eine Bewegungskorrektur der Ratiobilder ist hier nicht mehr möglich. Dementsprechend konnten keine Ratiosignal – Bilder erstellt werden.

## 2. Fliege liefert schwankende Signale:

Durch die Präparation ist die Fliege möglicherweise so traumatisiert, dass die Signale auf die verschiedenen Verdünnungsstufen der Düfte über das gesamte Experiment schwanken. So ergeben sich ungewöhnliche Resultate, wie in Abbildung 3.16 exemplarisch dargestellt:

Die  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster (Ratiosignal – Bilder) für die Isoamylkonzentrationsreihe zeigen einen normalen Anstieg der Signalstärke mit steigender Duftkonzentration. In den Aktivitätsmustern für die Benzaldehydkonzentrationsreihe wird die Schwankung deutlich (Abb. 3.16 B): Obwohl BEA  $10^{-3}$  höher konzentriert ist wie BEA  $10^{-5}$ , zeigt



**Abb. 3.16** Exemplarische Darstellung einer schwankenden Einzelmessung

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

**B**  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster der Einzelmessung. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C** Zeitlicher Verlauf der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) auf die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP/ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

das Aktivitätsmuster für  $\text{BEA } 10^{-5}$  ein starkes Ratiosignal, das Aktivitätsmuster für  $\text{BEA } 10^{-3}$  jedoch überhaupt kein Signal. Auch die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) bestätigen die starke Schwankung in der abgebildeten Einzelmessung (Abb. 3.16 C): Der zeitliche Verlauf der Ratioänderung für die Isoamylkonzentrationsreihe zeigt einen normalen Anstieg der Signalstärke mit steigender Duftkonzentration. In der Benzaldehydkonzentrationsreihe zeigt  $\text{BEA } 10^{-5}$

das stärkste, BEA  $10^{-3}$  gar kein und BEA  $10^{-1}$  ein schwaches Signal. Diese Schwankungen spiegeln keine normalen Antworten wider.

### 3. Fliege liefert sehr schwache Signale

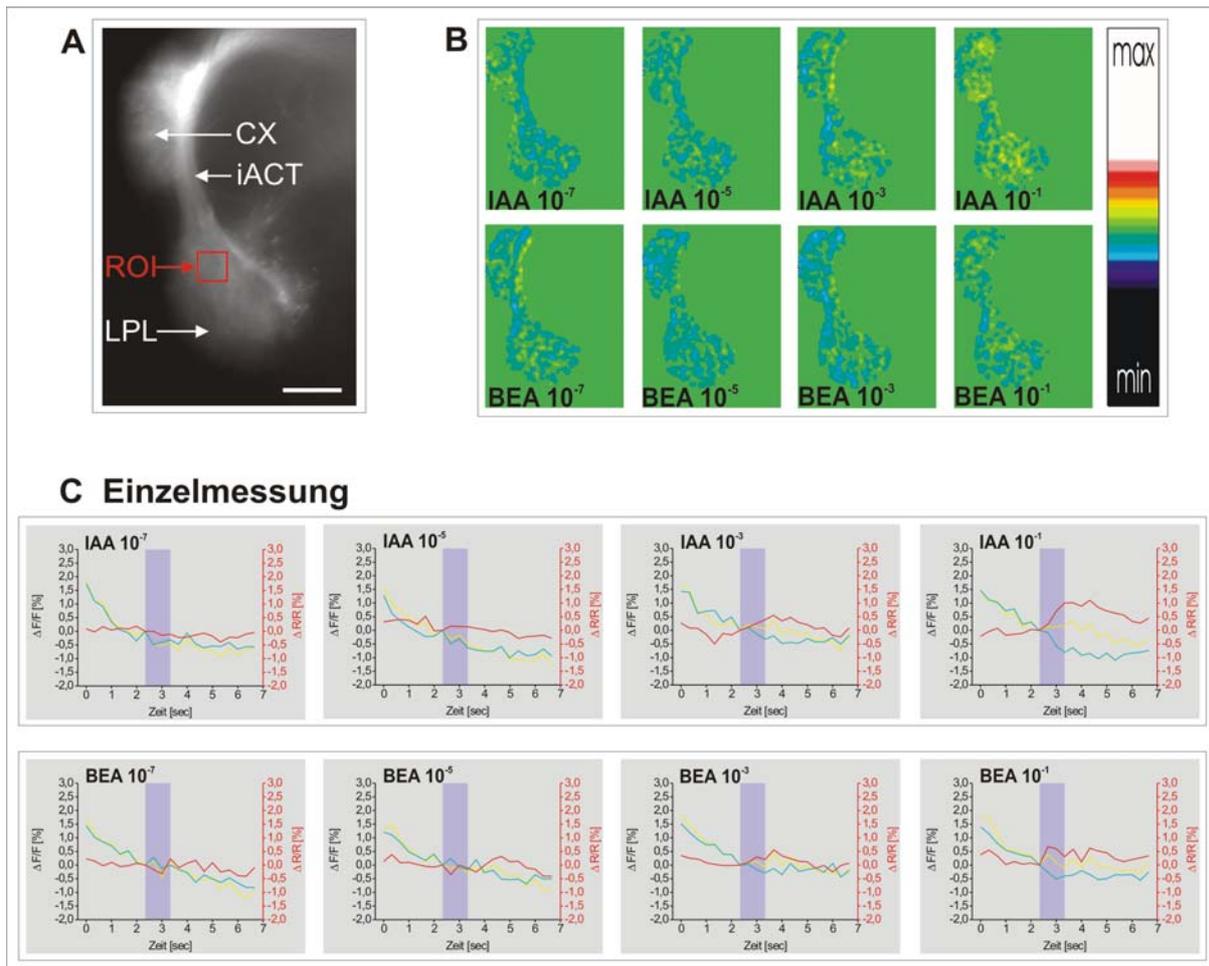
Durch die Präparation ist die Fliege möglicherweise so traumatisiert, dass die Calciumsignale auf die verschiedenen Verdünnungsstufen der Düfte sehr schwach sind oder ganz ausbleiben. Bis zum Ende des Experiments laufen die Signale aus, die Fliege stirbt. Abbildung 3.17 stellt eine solche Messung exemplarisch dar:

Die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster für die Isoamylkonzentrationsreihe zeigen nur für IAA  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  ganz schwache Calciumsignale, in den Aktivitätsmustern für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  treten keine Signale auf. In den Aktivitätsmustern für die Benzaldehydkonzentrationsreihe tritt nur für die Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  ein sehr schwaches aber dennoch deutliches Calciumsignal auf. Die Aktivitätsmuster für alle anderen Verdünnungsstufen beinhalten nur kaum erkennbare Signale (Abb. 3.17 B). Die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) bestätigen die Aussagen der  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster (Abb. 3.17 C): Für die Isoamylkonzentrationsreihe zeigen nur die Ratio – Intensitäten der IAA  $10^{-3}$  – Messung (Ratiosignal: ca. 0,5%) und der  $10^{-1}$  – Messung (Ratiosignal: ca. 1%) ganz schwache Signale. In den Graphen für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  treten keine Signale auf. Die Benzaldehydkonzentrationsreihe zeigt für alle Verdünnungsstufen nur sehr schwache Anstiege der Ratio (ca. 0,5%) auf. Es wird deutlich, dass die Fliege nicht mehr in der Lage ist, die verschiedenen Verdünnungsstufen zu diskriminieren und, dass die applizierten Düfte nur ganz schwache Calciumsignale evoltieren. Hochkonzentrierte Düfte (Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ ) würden in einer intakten Fliege einen Anstieg der Ratio um ca. 3% erzielen.

#### 3.4.6.2 Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid

##### 3.4.6.2.1 Erstellung der Graphen

Die Erstellung der EYFP –, ECFP – und Ratiographen für die Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid erfolgt wie für die Experimente zur olfaktorischen



**Abb. 3.17** Exemplarische Darstellung der Einzelmessung einer sterbenden Fliege

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25 $\mu$ m.

**B** Ca<sup>2+</sup>– Aktivitätsmuster der Einzelmessung. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C** Zeitlicher Verlauf der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) auf die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP/ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

Codierung (s.a. Kapitel 3.4.6.1.1). Unterschiede liegen in der größeren Bildanzahl der aufgenommenen Stacks. Da zur Erstellung der Daten ein 3 Hz – Endlosprotokoll (s.a. Kapitel 3.4.5.2) verwendet wurde, unterscheiden sich die Stacks der Depolarisationsexperimente untereinander ebenfalls in ihrer Größe. Wie bei den Duftexperimenten wurden 20 x 20 Pixel große Quadrate als ROI verwendet und im proximalen Bereich des lateralen Protocerebrums platziert.

Ein weiterer Unterschied liegt in der Prozessierung der EYFP – und ECFP – Rohdaten:

$$\text{Ratio} = \text{EYFP – Rodaten} / \text{ECFP – Rohdaten.}$$

Änderungen in der EYFP – und ECFP – Fluoreszenz werden als  $\Delta F/F \times 100$ , also prozentual, dargestellt. Dabei ist  $\Delta F$  die Differenz aus dem aktuellen EYFP – oder ECFP – Intensitätswert minus dem Mittelwert der EYFP – oder ECFP – Intensitätswerte 5 – 15 der Messung. Diese Werte liegen vor der Injektion des Kaliumchlorids und dienen als Basisfluoreszenz. Demnach ist  $\Delta F = F_{\text{aktuell}} - F_{\text{Basis}}$ . Die Änderung der Ratio EYFP / ECFP wird als  $\Delta R/R$  [%] dargestellt. Dabei ist  $\Delta R$  die Differenz aus dem aktuellen Ratiowert minus dem gemittelten Ratiowert für die Messwerte 5 – 15 (= Basis – Ratiowert). Demnach ist  $\Delta R = R_{\text{aktuell}} - R_{\text{Basis}}$ . EYFP –, ECFP – und Ratiographen werden zu Beginn des Calciumsignals auf 0 gesetzt. Eine schwarze Linie im Diagramm symbolisiert die Kaliumchloridinjektion.

Um die zeitlichen Verläufe der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten der einzelnen Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid verschiedener Fliegen arithmetisch zu mitteln, müssen die Daten aufgrund des variablen Ablaufes der einzelnen Experimente einheitlich gestaltet werden:

- Es gehen nur die ersten 20 EYFP –, ECFP – und Ratiowerte vor dem auf 0 gesetzten Wert in die Berechnung der Mittelwerte ein.
- Es gehen nur die folgenden 98 EYFP –, ECFP – und Ratiowerte nach dem auf 0 gesetzten Wert in die Berechnung der Mittelwerte ein.

Aus den Datenreihen der einzelnen Experimente werden also jeweils zu Beginn und am Ende Daten herausgenommen, sodass die resultierenden Datenreihen gleich lang sind und das jeweilige Calciumsignal zum selben Zeitpunkt beginnt.

#### 3.4.6.2.2 Erstellung der $\text{Ca}^{2+}$ – Aktivitätsmuster

Um die Kaliumchlorid – induzierte neuronale Aktivität optisch darstellen zu können, genügt es die Ratiobilder des entsprechenden Experiments ohne vorherige

Bearbeitung zu verwenden, da die Ratio hier um bis zu 20% ansteigt. Die unbearbeiteten Ratiobilder dienen also hier als räumliche  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster. Da die Stärke der induzierten Calciumsignale jedoch interindividuell stark variiert, mussten die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster unterschiedlicher Messungen unterschiedlich skaliert werden. Zur optischen Darstellung des Calciumsignals wurden für jedes Experiment 3 Ratiobilder ausgewählt: Ein Bild vom lateralen Protocerebrum vor dem Beginn des Calciumsignals, ein Bild, das das Signalmaximum darstellt und eins, das für das Ende des abklingenden Calciumsignals steht. In der folgenden Tabelle (Tab. 3.1) ist die Auswahl der Ratiobilder mitsamt den vorgenommenen Änderungen der Bildattribute für die 5 in dieser Arbeit aufgeführten Experimente abgebildet:

	Ratiobild			Bildattribute		
	vor Signal	Signalmax.	Signalende	Helligkeit	Kontrast	Gamma
<b>Fliege 1</b>	35	62	160	84	76	1
<b>Fliege 2</b>	37	75	196	76	81	1
<b>Fliege 3</b>	20	69	156	74	80	1
<b>Fliege 4</b>	31	57	127	72	86	1
<b>Fliege 5</b>	14	46	160	83	77	1

**Tab. 3.1** Linke Hälfte: Nummern der Ratiobilder vor dem Calciumsignal, am Signalmaximum und am Signalende für die 5 in dieser Arbeit beschriebenen Depolarisationsexperimente. Rechte Hälfte: Dazugehörige Veränderung der Bildattribute (Helligkeit, Kontrast, Gammawert).

#### 3.4.6.2.3 Darstellung der Calciumsignale als Filme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid eine Serie von Bearbeitungsschritten zur Erstellung von Filmen zur optischen und zeitlichen Darstellung der Calciumsignale in *MetaMorph* entwickelt. Für jedes Experiment wurde sowohl ein "Ratiosignal - Film", als auch ein "Morphologie – Film mit überlagertem Ratiosignal" erstellt. Die Filme können auf der beigefügten CD – ROM über den Pfad: "Filme / Exp\_Depolarisation" eingesehen werden.

**Ratiosignal – Filme:** Die Ratiosignale werden räumlich und zeitlich dargestellt

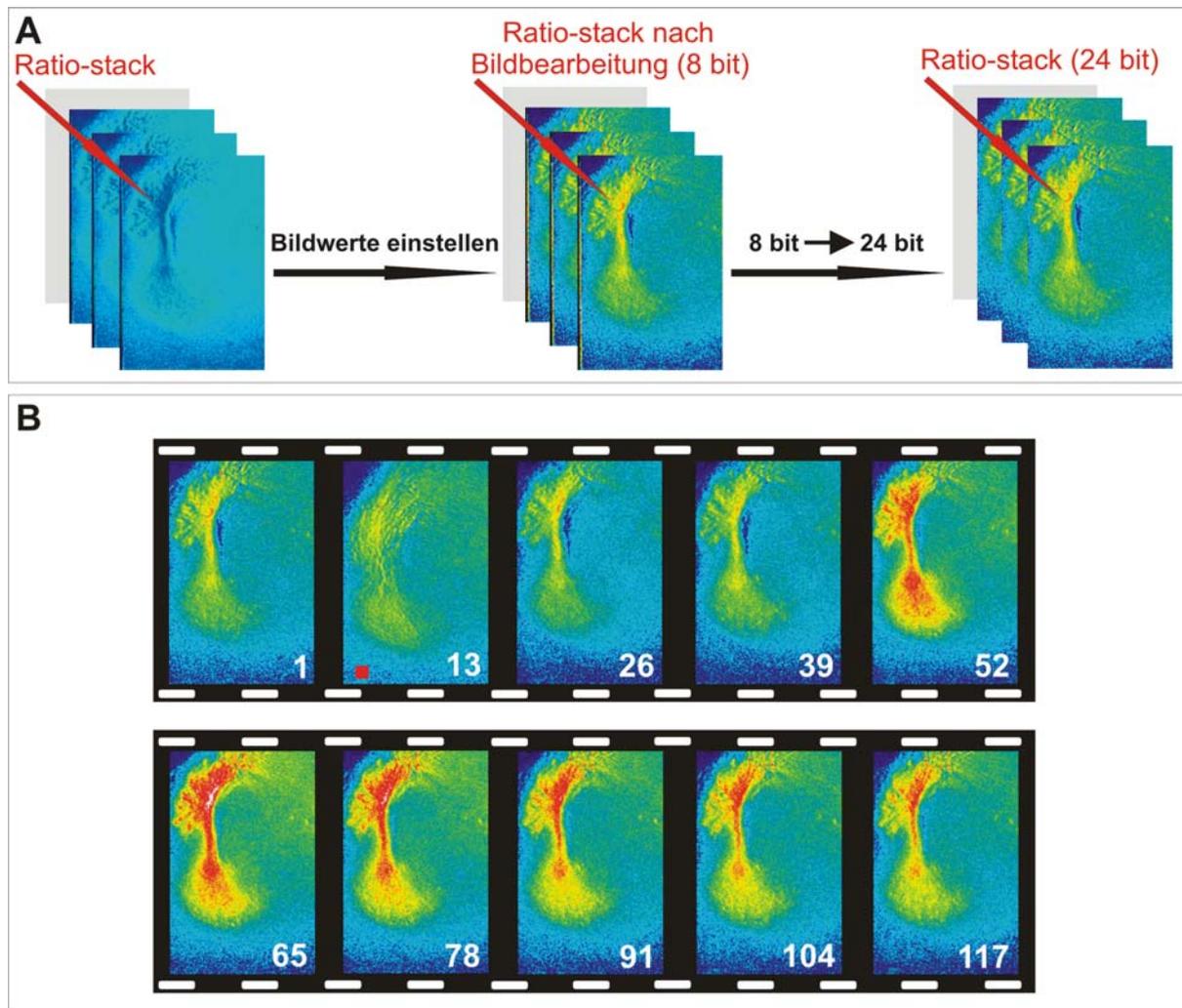
Zur Erstellung der Ratiosignal – Filme wird nur der Ratio – Stack des entsprechenden Experiments benötigt. Im Folgenden wird der Ablauf der Erstellung näher erläutert (Abb. 3.18):

Mit der Option “Build stack numbered names“ wird der Ratio – Stack eines Depolarisationsexperimentes gebildet und die Bildattribute des Stacks mit “Adjust Digital Contrast“ so geändert, dass das Calciumsignal deutlich sichtbar wird (Abb. 3.18 A). Tabelle 3.2 zeigt die Bildattributsänderungen für die fünf in dieser Arbeit aufgeführten Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid:

	<b>Bildattribute</b>		
	Helligkeit	Kontrast	Gamma
<b>Fliege 1</b>	84	76	1
<b>Fliege 2</b>	76	81	1
<b>Fliege 3</b>	74	80	1
<b>Fliege 4</b>	72	86	1
<b>Fliege 5</b>	83	77	1

**Tab. 3.2** Veränderung der Ratio – Stack – Bildattribute (Helligkeit, Kontrast, Gammawert) zur Erstellung der Ratiosignal – Filme, für die 5 in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid.

Nach der Einstellung der Bildattribute muss im Dialogfenster “Adjust Digital Contrast“ der “fix contrast“ – button gedrückt werden, da sonst die Bildeinstellungen bei der Erstellung des “.AVI“ – Files (Filmformat) verloren gehen. Nach der Bildbearbeitung wird aus dem 8 bit Ratio – Stack mit der Option “Color Combine“ (“single image“ aktivieren) ein 24 bit Stack gemacht (Abb. 3.18 A). Als Symbol für den Kaliumchloridstimulus, wird in die 7 Bilder nach der Injektion (entspricht einem Zeitraum von 2 Sekunden), ein 15 x 15 Pixel großes rotes Quadrat im linken unteren Eck eingefügt.



**Abb. 3.18** Erstellung der Ratiosignal – Filme für die Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid in *MetaMorph*.

**A** Mit “Build stack numbered names” wird der Ratio – Stack gebildet und die Bildattribute mit “Adjust Digital Contrast” individuell auf das Calciumsignal angepasst. Der 8 bit Ratio – Stack wird mit “Color Combine” in einen 24 bit Stack transferiert.

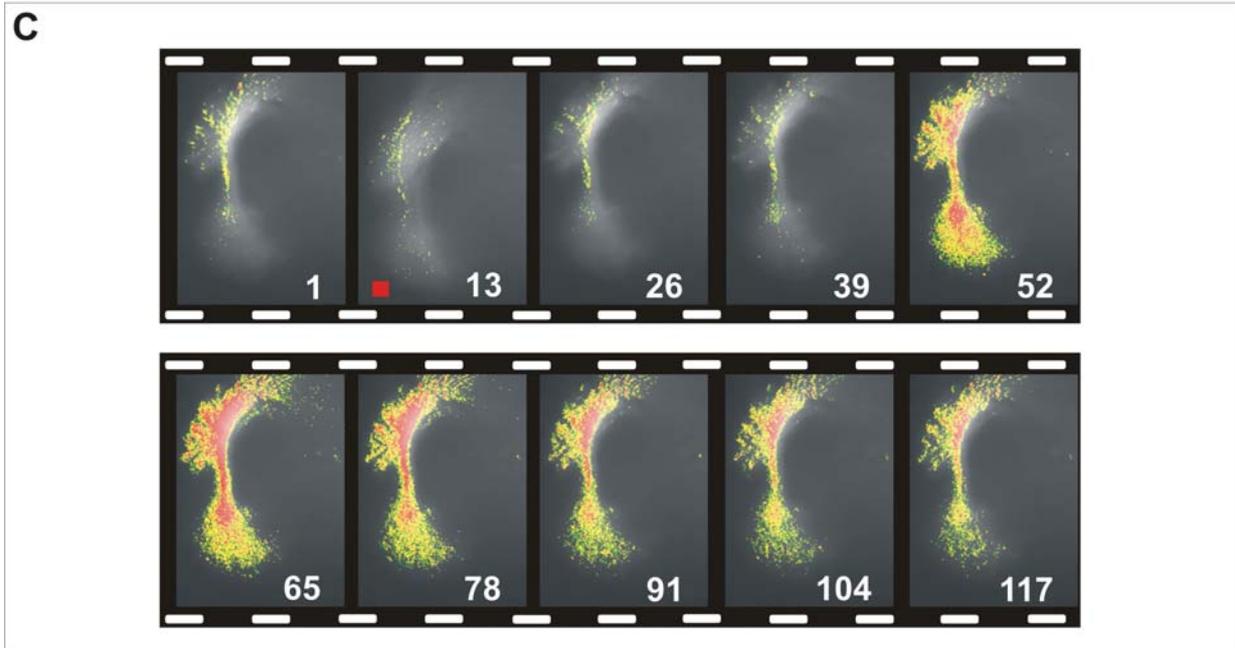
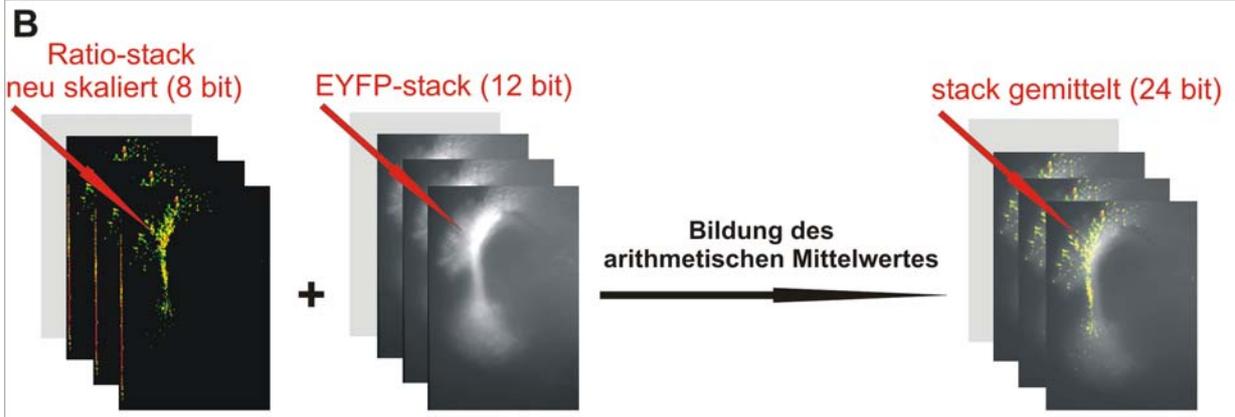
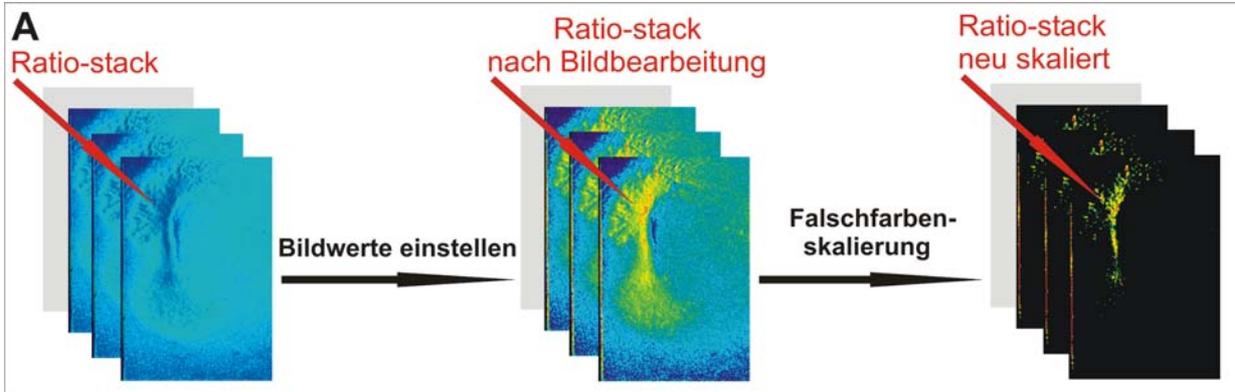
**B** Erstellung des Ratiosignal – Films. Mit “Make Movie” wird der 24 bit Stack zu einem Film im .AVI – Format konvertiert. Die Abspielgeschwindigkeit entspricht der dreifachen Realgeschwindigkeit. Abgebildet ist ein exemplarischer Ausschnitt aus einem Ratiofilm. Es ist jedes dreizehnte Bild abgebildet, d.h. der Abstand zwischen den Bildern beträgt 4,33 Sekunden. Ratiobild 1 zeigt die Morphologie (laterales Protocerebrum, Calyx, innerer Antennocerebraltrakt) vor der Kaliumchloridinjektion und Ratiobild 13 steht für die Injektion (rotes Viereck in der linken unteren Bildecke). Bild 65 zeigt das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum und Calyx und Bilder 78 – 117 zeigen die folgende Abnahme des Calciumsignals.

Mit der Option "Make Movie" wird aus dem 24 bit Ratio – Stack der Ratiosignal – Film erstellt. Das Filmformat ist ".AVI", die Abspielgeschwindigkeit / Bild wird als "3,33 / 30 th of a second" gewählt. Sie entspricht also der dreifachen Realgeschwindigkeit. Abbildung 3.18 B zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus einem Ratiosignal – Film. Es ist jedes dreizehnte Bild abgebildet, d.h. der Abstand zwischen den Bildern beträgt 4,33 Sekunden. Ratiobild 1 zeigt die Morphologie (laterales Protocerebrum, Calyx, innerer Antennocerebraltrakt) vor der Kaliumchloridinjektion und Ratiobild 13 steht für die Injektion (rotes Viereck in der linken unteren Bildecke). Bild 65 zeigt das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum und Calyx, und Bilder 78 – 117 zeigen die folgende, stetige Abnahme des Calciumsignals.

**Morphologie – Filme mit überlagertem Ratiosignal:** Morphologie und Ratiosignale werden räumlich und zeitlich dargestellt

Zur Erstellung dieser Filme wird der Ratio – Stack und der EYFP – Stack des entsprechenden Experiments benötigt. Aus der Bildung des Mittelwertes der beiden Stacks resultiert ein Stack, der sowohl die morphologische Information des EYFP – Stacks, als auch die Calciumsignale des Ratio – Stacks beinhaltet. Dieser gemittelte Stack stellt die Morphologie des gemessenen Areals in Graustufen dar, die überlagerten Ratiosignale sind falschfarben – codiert. Er kann zu einem Film konvertiert werden. Im Folgenden wird der Ablauf der Erstellung näher erläutert (Abb. 3.19):

Mit der Option "Build stack numbered names" wird der Ratio – Stack eines Depolarisationsexperimentes gebildet und die Bildattribute des Stacks mit "Adjust Digital Contrast" so geändert, dass das Calciumsignal deutlich sichtbar wird (Abb. 3.19 A). Tabelle 3.2 zeigt die Bildattributsänderungen für die fünf in dieser Arbeit aufgeführten Depolarisationsexperimente. Die Änderungen entsprechen denen zur Erstellung der Ratiosignal – Filme. Damit im Film nur Calciumsignale zu sehen sind, müssen die Falschfarben des erhaltenen Ratio – Stacks neu skaliert werden. Hierzu besteht in *MetaMorph* die Möglichkeit einen neuen "Look – Up – Table" (LUT) zu entwerfen. Die neue Skalierung der Falschfarben erfolgt so, dass alle Bildwerte (Pixelintensitäten) unterhalb des Calciumsignals, d.h. die schwarzen, blauen und dunkelgrünen Areale der Ratio – Stack – Bilder, mit der Farbe Schwarz belegt



**Abb. 3.19** Erstellung der Morphologie – Filme mit überlagertem Ratiosignal für die Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid in *MetaMorph*.

**A** Mit “Build stack numbered names“ wird der Ratio – Stack gebildet und seine Bildattribute (Helligkeit, Kontrast, Gammawert) mit “Adjust Digital Contrast“ individuell auf das Calciumsignal angepasst. Die Falschfarbendarstellung des Ratio – Stacks wird neu skaliert, sodass alle Bildwerte unterhalb des Calciumsignals mit der Farbe Schwarz, das ansteigende Calciumsignal mit den Farben Grün, Gelb, Orange und Rot belegt sind.

**B** Der neu skalierte Ratio – Stack (8 bit) und der dazugehörige EYFP – Stack (12 bit, erstellt mit der Option “Build stack numbered extensions“) werden mit der Option “color combine“ zu 24 bit – Stacks konvertiert. Die beiden Stacks werden mit der Option “average“ im Dialogfenster “Arithmetic“ zu einem gemittelten 24 bit – Stack verrechnet.

**C** Erstellung des Films. Mit “Make Movie“ wird der 24 bit Stack zu einem Film im .AVI – Format konvertiert. Die Abspielgeschwindigkeit entspricht der dreifachen Realgeschwindigkeit. Abgebildet ist ein exemplarischer Ausschnitt aus einem Average – Film. Es ist jedes dreizehnte Bild abgebildet, d.h. der Abstand zwischen den Bildern beträgt 4,33 Sekunden. In Bildern 1 – 39 dominiert die Morphologie des gemessenen Areals (laterales Protocerebrum, Calyx, innerer Antennocerebraltrakt). Sie ist in Graustufen dargestellt und entspricht dem ehemaligen EYFP – Stack. Über der Morphologie liegt das falschfarbencodierte Ratiosignal. Bei Bild 13 erfolgt die Kaliumchloridinjektion, Bild 65 zeigt das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum und Calyx, Bilder 78 – 117 zeigen die stetige Abnahme des Calciumsignals. Rotes Viereck in Bild 13 symbolisiert die Kaliumchloridinjektion.

werden; die Pixel mit höheren Werten, werden mit steigender Intensität mit den Farben Grün, Gelb, Orange und Rot belegt (Abb. 3.19 A). Der so erhaltene neu skalierte Ratio – Stack (8 bit) und der dazugehörige EYFP – Stack (12 bit, erstellt mit der Option “Build stack numbered extensions“) werden mit der Option “color combine“ (“single image“ aktivieren) zu 24 bit – Stacks konvertiert. Die beiden Stacks werden mit der Option “average“ im Dialogfenster “Arithmetic“ zu einem gemittelten 24 bit – Stack verrechnet (Abb. 3.19 B). Zur besseren Darstellung werden die Bildattribute der gemittelten Stacks mit der Option “Adjust Digital Contrast“ angepasst. Die ausgeführten Veränderungen sind für die einzelnen Depolarisationsexperimente variabel und in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Nach der Einstellung der Bildattribute muss im Dialogfenster “Adjust Digital Contrast“ der “fix contrast“ – button gedrückt werden, da sonst die Bildeinstellungen bei der Erstellung des “.AVI“ – Files (Filmformat) verloren gehen. Als Symbol für den Kaliumchloridstimulus, wird in die 7 Bilder nach der Injektion (entspricht einem Zeitraum von 2 Sekunden), ein 15 x 15 Pixel großes rotes Quadrat im linken unteren Eck eingefügt.

	<b>Bildattribute</b>		
	Helligkeit	Kontrast	Gamma
<b>Fliege 1</b>	70	67	1
<b>Fliege 2</b>	62	52	1
<b>Fliege 3</b>	65	52	1
<b>Fliege 4</b>	72	56	1
<b>Fliege 5</b>	73	66	1

**Tab. 3.3** Veränderung der Bildattribute (Helligkeit, Kontrast, Gammawert) der gemittelten Stacks (24 bit) zur Erstellung der Morphologie – Filme mit überlagertem Ratiosignal, für die 5 in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid.

Mit der Option "Make Movie" wird aus dem gemittelten 24 Stack der Film erstellt. Das Filmformat ist ".AVI", die Abspielgeschwindigkeit / Bild wird als "3,33 / 30 th of a second" gewählt. Sie entspricht also der dreifachen Realgeschwindigkeit. Abbildung 3.19 C zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus einem so erstellten Film. Es ist jedes dreizehnte Bild abgebildet, d.h. der Abstand zwischen den Bildern beträgt 4,33 Sekunden. In Bildern 1 – 39 dominiert die Morphologie des gemessenen Areals (laterales Protocerebrum, Calyx, innerer Antennocerebraltrakt). Sie ist in Graustufen dargestellt und entspricht dem ehemaligen EYFP – Stack. Über der Morphologie liegt das falschfarbencodierte Ratiosignal. Bei Bild 13 erfolgt die Kaliumchloridinjektion (rotes Viereck in der linken unteren Bildecke), Bild 65 zeigt das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum und Calyx, Bilder 78 – 117 die stetige Abnahmen des Calciumsignals nach dem Ende der Duftgabe.

## 4. Ergebnisse

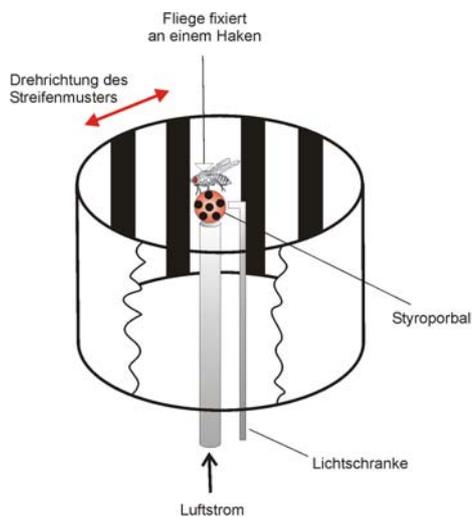
### 4.1 Optomotorisches Verhalten der Cameleon 2.0 *in – vivo* Präparate

Um die neuronale Aktivität von definierten Zellpopulationen mittels *in – vivo* Calcium Imaging zu messen, muss ein optischer Zugang zum zu messenden Gehirnareal geschaffen werden. Dazu wird wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, ein Loch in die Schädelkapsel der lebenden Fliege präpariert. Um zu testen, ob die Fliegen nach der *in – vivo* Präparation noch physiologisch und morphologisch intakt sind, wurde das optomotorische Verhalten von 17D – UAS: Cameleon 2.0 Fliegen untersucht. Die GAL4 – Treiberlinie 17D exprimiert den Calciumsensor Cameleon 2.0 in den Neuronen des Pilzkörpers (Pfister, 1997). Dabei dienen die 17D – UAS: Cameleon 2.0 Fliegen als allgemeines Beispiel für Fliegen, die das UAS: Cameleon – Konstrukt unter GAL4 – Einfluss exprimieren (für die Imaging – Experimente wurden GH146 – UAS: Cameleon 2.1 Fliegen verwendet).

Die für die Optomotorik – Experimente durchgeführte *in – vivo* Präparation unterscheidet sich in weingen Punkten von der Präparation für die Imaging – Experimente (s.a. Kapitel 3.4.2): Die auf Eis immobilisierte weibliche Fliege wird in eine Knetschleife, die auf einem Objektträger befestigt ist, platziert, und die Schädelkapsel dorsal mit Uhrmacherpinzetten geöffnet. Um einen optischen Zugang zum Gehirn zu schaffen, werden die dorsalen Luftsäcke und weitere störende Tracheen entfernt. In die geöffnete Schädelkapsel wird Ringerlösung gegeben um eine Austrocknung des Gehirns zu vermeiden. Das Loch in der Schädelkapsel wird mit einem Stück fester Agarose abgedichtet.

Die so präparierte Fliege wird, an einem Haken fixiert, in der Optomotorikapparatur platziert (Abb. 4.1). Sie sitzt auf einen Styroporball, den sie durch ihre Beinbewegungen frei in alle Richtungen rotieren lassen kann. Die Rotationen des Balles werden durch eine Lichtschranke detektiert und von einem Computer erfasst. Die Umgebung der Fliege besteht aus einem sich drehenden Streifenmuster. Die Drehbewegung des Musters kann von der Fliege wahrgenommen werden und sie

antwortet mit einer entgegengesetzten Rotation des Balles, d.h. sie versucht die Musterrotation zu kompensieren (Buchner, 1976; Heisenberg und Wolf, 1984). Während des Experiments ändert sich die Helligkeit des Streifenmusters, es gibt 10 Intensitätsstufen, das Experiment beginnt mit der stärksten Intensität und nach Erreichen der niedrigsten Intensität wird das Experiment wiederholt bis die Fliege kein Verhalten mehr zeigt. Die Streifengeschwindigkeit ist 1 Streifen / Sek (= 24 deg / Sek), bei jeder Intensität läuft das Streifenmuster 2 mal links – und 2 mal rechtsherum.



**Abb. 4.1** Versuchsaufbau zur Messung des optomotorischen Verhaltens von *Drosophila melanogaster*. Entnommen aus Diegelmann (2004).

Die Fliege ist an ihrem Thorax an einem Haken befestigt und kann einen auf einem Luftstrom getragenen Styroporball durch ihre Beine frei bewegen. Die Bewegung des Balles wird von einer Lichtschranke erfasst und an einen Computer weitergeleitet. Das Streifenmuster um die Fliege kann in beide Richtungen mit konstanter Geschwindigkeit gedreht werden. Die Musterhelligkeit wird variiert.

Für jede Lichtintensität kann der Verhaltensquotient (PI = Performance Index) nach folgender Formel berechnet werden:

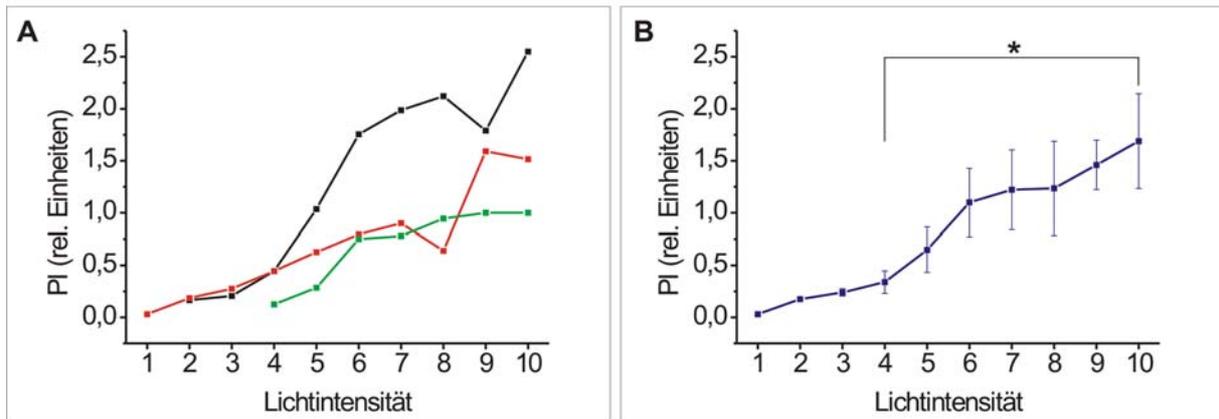
$$PI = \frac{\sum_1^2 (DE \text{ rechts} - DE \text{ links})}{4 \times 50 \text{ LE vorwärts}}$$

DE rechts = Dreheinheiten während Streifenbewegung rechtsherum  
 DE links = Dreheinheiten während Streifenbewegung linksherum  
 LE vorwärts = Lafeinheiten vorwärts. Nach 50 LE vorwärts ändert sich die Drehrichtung des Streifenmusters

In Abb. 4.2 A sind die PIs für 3 präparierte 17D – UAS: Cameleon 2.0 Weibchen dargestellt. Nur eine der 3 Fliegen zeigt ein Laufverhalten auf alle Lichtintensitätsstufen, die beiden anderen Fliegen antworten auf 7 bzw. 9 Intensitätsstufen. Der Verhaltensausfall bei den niedrigen Intensitätsstufen, die am Ende des Experiments getestet werden, ist in der mangelhaften Abdichtung des Schädelloches durch die Agarose begründet: Das Gehirn trocknet im Laufe des Experiments aus, und die Fliege stirbt.

Im Experiment zeigt sich, dass alle 3 Fliegen auf die Rotation des Streifenmusters mit einer adäquaten Kompensationsbewegung reagieren. Ähnlich wie wildtypische Fliegen (Melzig et al., 1996) zeigen auch die präparierten Cameleon 2.0 Fliegen einen ansteigenden PI mit zunehmender Lichtintensität (Abb. 4.2 B: Signifikanter Unterschied der PIs zwischen Lichtintensitäten 4 und 10: t – test, two populations,  $p = 0,04483$ ,  $t = 2,88413$ .  $p < 0,05 =$  signifikant unterschiedlich. Statistik wurde aufgrund der fehlenden Messdaten von 2 der 3 Fliegen für die Lichtintensitäten 1 – 3 für Lichtintensitäten 4 und 10 durchgeführt). Zur internen Kontrolle wurde auch das optomotorische Verhalten von unpräparierten 17D – UAS: Cameleon 2.0 Weibchen getestet. Bei der Analyse der Daten stellte sich jedoch heraus, dass die Optomotorik – Apparatur die unterschiedlichen Lichtintensitätsstufen fehlerhaft darbot. Auf die Darstellung der Kontrollfliegen wird deshalb verzichtet.

Die Ergebnisse der optomotorischen Verhaltensversuche mit den präparierten 17D – UAS: Cameleon 2.0 Tieren zeigen, dass die *in – vivo* Präparation das optomotorische Verhalten der Fliegen nicht nachhaltig beeinträchtigt, d.h. die Lichtsensitivität der Photorezeptoren und der Zustand der neuronalen Netzwerke zur Bewegungskontrolle ist nicht beeinträchtigt. Insgesamt ist anzumerken, dass die beschriebenen Experimente zu Beginn dieser Arbeit ausgeführt wurden. Sie dienen als allgemeiner Nachweis dafür, dass die Präparation die Funktion des Fliegengehirns nicht nachhaltig beeinträchtigt. Sie beweisen jedoch nicht, dass die olfaktorischen Neurone nach der *in – vivo* Präparation ebenfalls intakt sind. Der Nachweis hierfür konnte erst später durch das erfolgreiche Imagen der olfaktorischen Neurone (s.a. Kapitel 4.4 und 4.6) erbracht werden.



**Abb. 4.2** Optomotorisches Verhalten von 17D – UAS: Cameleon 2.0 *in vivo* Präparaten.

**A** Rotationsantworten (PI) von 3 individuellen Fliegen (roter, schwarzer und grüner Graph) auf die 10 unterschiedlichen Lichtintensitäten des rotierenden Streifenmusters. Stufe 1 = niedrigste Lichtintensität, Stufe 10 = höchste Lichtintensität.

**B** Arithmetische Mittelwerte der Rotationsantworten (PI) der 3 individuellen Fliegen aus Abb. **A**. Dargestellt ist die signifikante Zunahme der Kompensationsbewegung mit steigenden Lichtintensitäten (signifikanter Unterschied zwischen PIs bei Lichtintensität 4 und 10 für  $n = 3$ :  $t$  – test, two – populations:  $p = 0,04483$ ,  $t = 2,88413$ . Symbolisiert durch schwarze Klammer mit Stern). Abgebildet ist der Standardfehler.

## 4.2 Molekularbiologie

### 4.2.1 Lokalisation der Transgen – Insertion in Cameleon 2.0 Fliegen

Die Lokalisation der Transgen – Insertion in Cameleon 2.0 Fliegen wurde in Zusammenarbeit mit Sören Diegelmann durchgeführt.

Fliegen, die das Cameleon 2.0 Konstrukt (Miyawaki et al., 1997) unter UAS – Kontrolle in ihrem Genom integriert hatten wurden von Dr. Ch. Schuster (Tübingen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Nach seinen Angaben war die cDNA des Cameleon – Fusionsproteins über die NotI Restriktionsschnittstelle in den pUAST-Vektor eingebracht und mit diesem transposablen Element eine Keimbahntransformation durchgeführt worden. Seine Untersuchungen der etablierten Fliegenlinie wiesen auf eine oder mehrere Insertionen des Transposons auf dem zweiten und / oder auf dem dritten Chromosom hin. Daher wurden die Fliegen auch über einem Doppelbalancer-Chromosom für das zweite und dritte Chromosom (STM) gehalten. Der übersendete Fliegenstamm ließ sich nur sehr schwer halten, und da für spätere Kreuzungen mit GAL4 – Linien die chromosomale Lokalisation des P – Elements wichtig war, wurde in zwei Ansätzen die Lage im Genom sowie die Anzahl der Insertionen ermittelt.

Dabei folgte ein Weg dem klassischen Kreuzen mit Balancer – Chromosomen (TM3/TM6 bzw. Sco/CyO), der andere Ansatz verlief über eine Inverse PCR. Dabei sollten die Methoden auf ein gleiches Ergebnis der Lokalisation der Insertion kommen, wobei der große Vorteil der Inversen PCR ist, dass hier eine auf die Base genaue Festlegung der Insertionsstelle auf dem Chromosom möglich ist. Zwei Insertionen auf demselben Chromosom können nur in der Inversen PCR einwandfrei lokalisiert werden.

#### Kreuzungen

Die Kreuzungsexperimente wurden von Sören Diegelmann durchgeführt und sind vollständigshalber aufgeführt. Diese Methode liefert darüber Aufschluss, ob die Insertionen ausschließlich auf einem der beiden Chromosomen liegen oder ob beide

Chromosomen ein P-Element tragen. Es wurde in zwei Ansätze versucht die Insertion in der betroffenen Linie aufzudecken. Zum einem wurde eine Kreuzung mit TM3/TM6 Fliegen angesetzt und nach dem gleichen Prinzip eine Kreuzung mit dem Stamm Sco/CyO. Beide Ansätze führten zu der Interpretation, dass die Insertion nur auf dem 3. Chromosom stattgefunden hat (Diegelmann, 2004). Durch die Lokalisation durch das klassische Kreuzen mit Balancer – Linien kann aber keine genauere Angabe gemacht werden, ob es in der betreffenden Linie zu mehrmaligen Insertionen des pUAST – Vektors gekommen ist. Um dies zu klären, wurde eine genauere Lokalisation mit Hilfe der Inversen PCR durchgeführt.

### **Inverse PCR**

Diese Methode beruht auf einer speziell auf den pUAST – Vektor angepassten Modifikation der Inversen PCR von B. Dalby (1995). Mit Hilfe einer PCR und einem anschließenden Vergleich der Sequenz des PCR-Produktes mit dem vollständig sequenzierten Genom der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist es so möglich, die Insertion auf die Base genau zu detektieren. Dabei wird die an das P – Element angrenzende Sequenz sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung ansequenziert. Im Falle von pUAST grenzt die genomische Sequenz aus dem HpaII – Ansatz direkt an das 5'-Inverted Repeat des transposablen Elementes, die gewonnene Basenabfolge aus einem HaeIII – Ansatz schließt sich an das 3'-Ende von pUAST an (s.a. Kapitel 3.1.4).

Eine Inverse PCR mit genomischer DNA aus der Linie C2-6I (Cameleon 2.0) ergab verschiedene Banden, die im Folgenden getrennt ausgewertet werden.

HpaII – Ansatz:                    400 bp Bande

Die durch die Primer pUAST-HpaII-1/2 erhaltene Sequenz enthielt keinen Vektoranteil, welcher aber aufgrund der Lage der Primer hätte auftreten müssen. Ein Vergleich mit der Datenbank zeigte eine Übereinstimmung mit dem Klon AE003579, welcher auf dem linken Arm des 2. Chromosoms im Bereich 23F1-24B1 lokalisiert ist. Eine genaue Überprüfung des betroffenen Genomabschnittes ergab dann, dass der Primer pUAST-HpaII-1 mit 14 Basen im Klon übereinstimmt und auch 10 Basen des

zweiten Primers pUAST-Hpall-2 im Klon vorkommen. Ein mögliches PCR – Produkt, welches zwischen diesen beiden Stellen amplifiziert werden würde, hätte eine Größe von ca. 370 bp. Aufgrund dieses Hinweises auf ein mögliches PCR – Artefakt kann dieser Bereich nicht als Insertionsort gelten. Auf eine Darstellung der Sequenz wird im Anhang verzichtet.

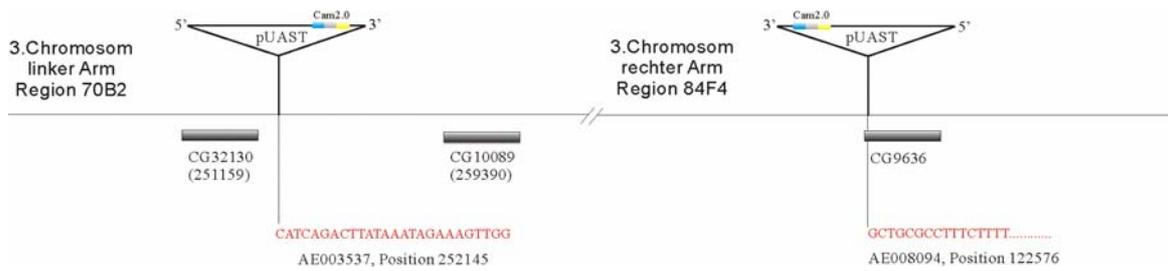
Hpall – Ansatz:                    750 bp Bande

Beide Primer lieferten eine insgesamt 426 bp lange genomische Sequenz, welche an beiden Enden mit dem Vektoranteil versehen ist. Eine Datenbanküberprüfung zeigte eine Zuordnung auf dem 3. Chromosom, rechter Arm im Bereich 84F4 (AC008094). Die Insertion erfolgte in diesem Fall in die 5'-Region des vorhergesagten Gens CG9636 über dessen Funktion noch keine Aussage gemacht werden kann. Die Sequenz ist im Anhang (s.a. Kapitel 9.3) genauer dargestellt.

HaeIII – Ansatz:                    450 bp Bande

Hier zeigte sich aufgrund der kurzen Leseweite in der Sequenzierung mit pUAST-HaeIII-4 Primer nur Vektoranteil. Der zweite PCR-Primer (pUAST-HaeIII-3) konnte aber eine ebenfalls auswertbare Basenabfolge liefern, in der 26 Basen umgeben sind von Sequenzen aus dem Vektor. Diese 26 Nukleotide zeigen eine Übereinstimmung mit AE003537, ab der Base 252145 des Klons, welcher auf dem 3. Chromosom im Bereich 70B2 lokalisiert ist. Das P-Element wäre ca. 1 kb entfernt von einem vorhergesagten Gen CG32130 mit unbekannter Funktion inseriert, auf der anderen Seite ist die Entfernung zum Gen CG10089, das für eine vermutete Protein-Phosphatase kodiert, ca. 7,2 kb groß.

Aus den oben aufgeführten Ergebnissen zur Lokalisation der P-Element Insertion(en) in der Fliegenlinie C2-6I lässt sich eine einheitliche Aussage treffen. Die klassische Methode mittels Balancerchromosomen belegt eine pUAST – Insertion auf dem dritten Chromosom. Durch die Sequenzierung der PCR-Produkte konnte nachgewiesen werden, dass es sich um eine doppelte Insertion des Vektors in der Region 70B2, sowie in der Region 84F handelt. Die genaue Lokalisierung im Genom von *Drosophila melanogaster* ist in Abb. 4.3 angegeben.



**Abbildung 4.3:** Darstellung der beiden Insertionen der Cameleon 2.0 Konstrukte in der Linie C2-6l/STM nach Sören Diegelmann, 2004.

Dargestellt sind die aus der Inversen PCR abgeleiteten Insertionen des pUAST-Vektors auf dem 3. Chromosom von *Drosophila melanogaster*. Angegeben ist in rot die Sequenz aus dem PCR-Produkt, wie auch ihre Lokalisation im Genom laut Berkeley D.G.P.. Ebenfalls sind postulierte Gene in der Nähe der Insertion angegeben. Die Zahlen der Abbildung beziehen sich auf den Insertionsort im jeweiligen Klon.

#### 4.2.2 Mutation von Cameleon 2.0 zu Cameleon 2.1

Um ausgehend von dem Calcium – Sensor Cameleon 2.0, die in der pH – Wert Abhängigkeit verbesserte Version Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999)) zu erhalten, wurde von Sören Diegelmann eine *in – vitro* Mutagenese durchgeführt (Diegelmann et al, 2002). Ziel der Mutagenese war der Austausch der Aminosäuren 68 (Valin) und 69 (Glutamin) im Enhanced Yellow Fluorescent Protein zu der neutralen, hydrophoben Aminosäure Leucin und der basischen Aminosäure Lysin. Um dies zu erreichen wurden die betreffenden Codons so mutiert, dass die cDNA nun für die ausgewechselten Aminosäuren codiert.

#### 4.2.3 Keimbahntransformation

Der verbesserte Calciumindikator Cameleon 2.1 wurde durch eine Transformation in die Keimbahn der Fliege eingebracht. Insgesamt wurden 150 Embryonen injiziert, aus denen sich 120 bis zur Larve entwickelten. Mit dem Ausgangsstamm  $w^{1118}$  wurden die geschlüpften Fliegen gekreuzt und die Nachkommenschaft auf das Auftreten von roten Augen untersucht. Die rotäugigen Individuen wurden nach Vermehrung untereinander gekreuzt und so versucht, homozygote Linien zu etablieren. Insgesamt wurden folgende homozygote Linien erhalten: Cam 2.1/53, Cam 2.1/65, Cam 2.1/72, Cam 2.1/76 und Cam 2.1/82.

#### **4.2.4 Auswahl und Charakterisierung der Cameleon 2.1 – Fliegenlinie Cam 2.1/82**

Aus den 5 durch die Keimbahntransformation erhalten homozygoten Cameleon 2.1 – Fliegenlinien wurde mittels Western blotting die expressionsstärkste Linie Cam 2.1/82 ermittelt (Diegelmann et al., 2002). Diese Linie wurde aufgrund der starken Expression für alle in dieser Arbeit beschriebenen Imaging – Experimente verwendet.

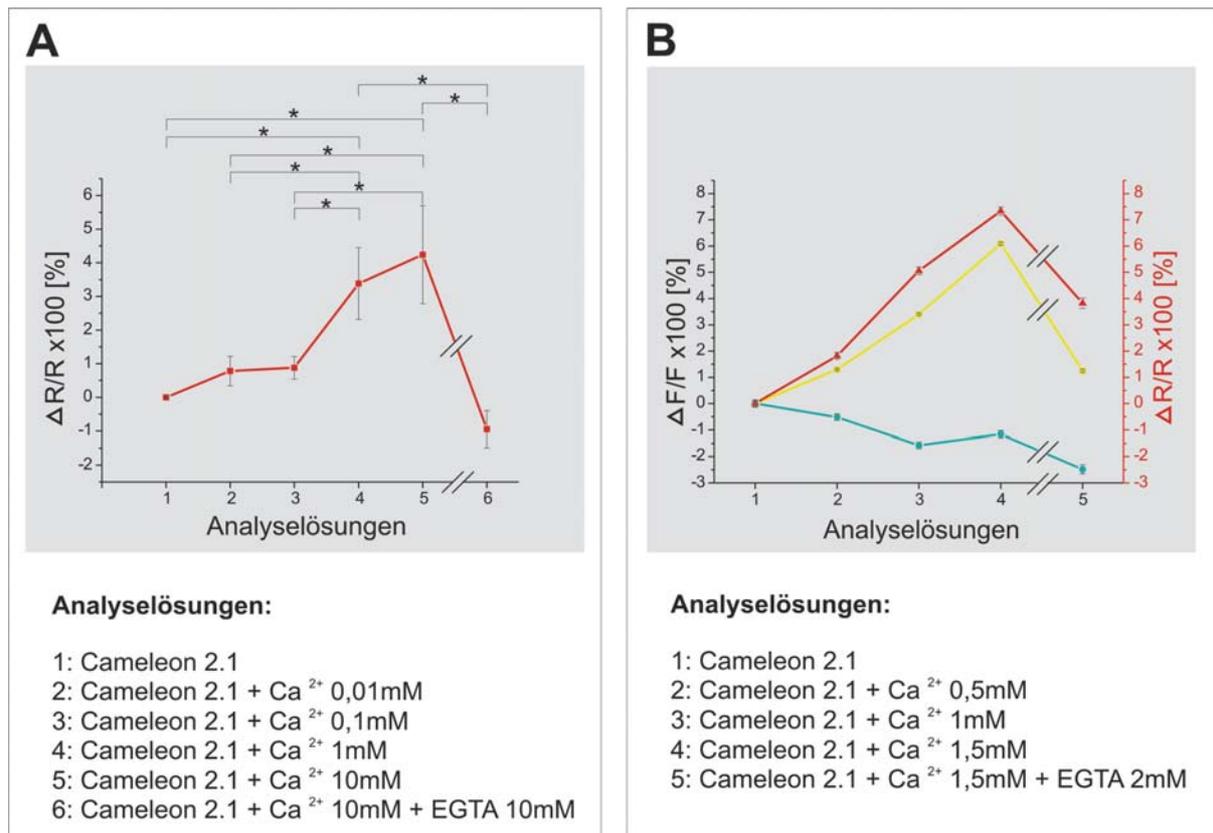
Um zu überprüfen, ob die Expression des Calciumsensors aufgrund seiner Bindung von freiem Calcium einen Effekt auf die synaptische Übertragung hat, wurde eine Kreuzung der Linie Cam 2.1/82 mit der panneuronal exprimierenden Gal4 – Linie Nrv2-Gal4-3 (Sun et al., 1998) angesetzt. Am Nerv – Muskel Präparat der Larven aus dieser Kreuzung wurden von Ch. Leibold in der Arbeitsgruppe elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden die exzitatorischen Potentiale (EJP = excitatory junctional potentials) aus Muskeln der Körperwand abgeleitet und mit denen von  $w^{1118}$  Larven verglichen. Der Unterschied zwischen den beiden Signalen liegt innerhalb der Streubreite wildtypischer EJPs. Die elektrophysiologischen Untersuchungen ergaben danach keinen Hinweis auf einen offensichtlichen Einfluss des Cameleon 2.1 Fusionsprotein auf die synaptische Transmission (Diegelmann et al., 2002).

Zur Lokalisation des pUAST – Cameleon 2.1 – Vektors in der Linie Cam 2.1/82 wurde von Sören Diegelmann eine Inverse PCR durchgeführt. Als Insertionsort ergab sich das 2. Chromosom, linker Arm, Region 26F (Diegelmann et al, 2002).

### 4.3 *in-vitro* Cameleon 2.1 – Funktionsanalyse

Nachdem das Cameleon 2.0 – Konstrukt (Miyawaki et al., 1997) von Sören Diegelmann in die verbesserte Cameleon 2.1 – Version (Miyawaki et al., 1999) überführt wurde, sollte der neue Calciumsensor auf seine Funktionsfähigkeit getestet werden. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit gab es noch keine veröffentlichten *in-vivo* Experimente mit dem Fusionsprotein, so dass die durchgeführte Funktionsanalyse ganz grundlegende Fragestellungen anspricht: Welche Anregungswellenlänge ist praktikabel, welche Filter sind zur Detektion der ratiometrischen Cameleon – Emissionswellenlängen notwendig, ist der Sensor in der Lage unterschiedliche Calciumkonzentrationen zu detektieren und ist das Sensorsignal für die verschiedenen Konzentrationen mit gängigen optischen Mitteln auflösbar? Um diese Fragestellungen anzugehen, bot sich eine *in-vitro* Funktionsanalyse mit rekombinantem His – Tag – Cameleon2.1 – Protein an: Cameleon2.1 - cDNA wurde in den pET-28b – Vektor subkloniert, dieser in BL21 – Zellen eingebracht und das induzierte Protein aufgereinigt (s.a. Kapitel 3.2.1). Die anschließende Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Bollag et al., 1996) ergab eine Ausbeute von 1,1µg Cameleon 2.1 – Protein / 1µl Elutionspuffer. Mit dem so gewonnen Protein wurden Photomultiplier – Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dazu war es notwendig eine komplett neue Messapparatur bestehend aus Mikroskop, Lichtquelle (Anregungslichtwellenlänge: 433nm), entsprechenden Filtern, zwei Fluoreszenzdetektoren (Photomultiplier) und einem Computer mit eigenhändig programmierter Turbo – Pascal Software (s.a. Anhang, Kapitel 9.4) zur Datenaufnahme, grafischen Darstellung und Weiterverarbeitung der Daten, zu etablieren (s.a. Kapitel 3.2.2 + 3.2.3). Die Analyselösungen der mit dieser Apparatur durchgeführten Messreihen bestanden aus dem in HEPES – Puffer gelösten Cameleon 2.1 – Protein und steigenden Calciumionen – Konzentrationen. Zur Kontrolle der Reversibilität der  $Ca^{2+}$  - Bindung an das Protein wurde in jeder Messreihe eine Proteinprobe mit EGTA versetzt.

Abbildung 4.4 A zeigt die gemittelten Ratiowerte für 4 unabhängige Messreihen. Die Begriffe “Ratio“ oder “Ratiowert“ werden im Laufe der Arbeit noch häufig verwendet. Sie meinen das Verhältnis von EYFP – Fluoreszenz zu ECFP – Fluoreszenz. Analysenlösung 1 (Cameleon 2.1) stellt den Ausgangspunkt der Messreihen dar. Mit



**Abb. 4.4** *in vitro* Funktionsanalyse von Cameleon 2.1

**A** Ratiowerte für 4 unabhängige Messreihen ( $n = 4$ ). Analyselösung 1 dient als Ausgangspunkt der Messreihen. Analyselösungen 2 – 5 mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Analyselösung 6 entspricht einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserniedrigung durch EGTA-Zugabe. Ratiowerte (rot) dargestellt als  $R/R \times 100$  [%], Standardfehler abgebildet. Einfaktorielle ANOVA:  $p = 0,0016$ ,  $F = 6,2376$ . Signifikant unterschiedliche Werte (post-hoc Duncan's test) geklammert und mit Stern versehen. Konzentrationen verstehen sich als Endkonzentrationen in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$ .

**B** typische Messreihe mit EYFP-, ECFP-, Ratiowerten. Analyselösung 1 dient als Ausgangspunkt der Messreihe. Analyselösungen 2 – 4 mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Analyselösung 5 entspricht einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserniedrigung durch EGTA-Zugabe. Ratiowerte (rot) dargestellt als  $R/R \times 100$  [%], EYFP- (gelb), ECFP-Werte (cyan) dargestellt als  $F/F \times 100$  [%]. Jeder Messwert repräsentiert den Mittelwert aus ca. 150 Werten für die entsprechende Probe, Standardfehler abgebildet. Konzentrationen verstehen sich als Endkonzentrationen in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$ .

steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den folgenden Analyselösungen 2 – 5 steigen auch die Ratiowerte deutlich an. Signifikante Unterschiede zeigen hierbei Probe 1 (Cameleon 2.1) zu Proben 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1mM) und 5 ( $\text{Ca}^{2+}$  10mM), Probe 2 ( $\text{Ca}^{2+}$  0,01mM) zu Proben 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1mM) und 5 ( $\text{Ca}^{2+}$  10mM) und Probe 3 ( $\text{Ca}^{2+}$  0,1mM) zu Proben 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1mM) und 5 ( $\text{Ca}^{2+}$  10mM) (post-hoc Duncan's test). Es zeigt sich also ein deutlicher Unterschied in den Ratiowerten zwischen niedrigen und hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsniveaus. Analyselösung 6 enthält EGTA, einen sechszähligen

Chelator, der bevorzugt  $\text{Ca}^{2+}$  im Verhältnis 1:1 bindet. Diese Probe zeigt eine deutliche Reduktion der Ratio. Signifikant unterschiedlich ist hierbei Probe 6 ( $\text{Ca}^{2+}$  10mM + EGTA 10mM) zu Proben 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1mM) und 5 ( $\text{Ca}^{2+}$  10mM) (post – hoc Duncan`s test).

Abbildung 4.4 B zeigt eine typische Messreihe mit Ratio –, EYFP – und ECFP – Werten, und erlaubt so eine genauere Betrachtung der Cameleonfunktion: Mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentration in den Analyselösungen 2 – 4 steigen auch die EYFP - Werte deutlich an. Gleichzeitig nehmen die ECFP – Werte antiparallel ab. Ergebnis dieser Konzentrationserhöhung ist eine steil ansteigende Ratio (EYFP / ECFP). Analyselösung 5 enthält EGTA und zeigt einen sehr stark reduzierten EYFP – Wert. Zusammen mit dem ECFP – Wert resultiert diese starke EYFP – Reduktion in einem deutlich reduzierten Ratiowert. Die Werte der Proben 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM) und 5 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM + EGTA 2mM) veranschaulichen den Vorteil von ratiometrischen  $\text{Ca}^{2+}$  - Sensoren: Im Vergleich zu Probe 3 ( $\text{Ca}^{2+}$  1mM) erhöht sich der EYFP – Wert von Probe 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM). Der ECFP – Wert erhöht sich ebenfalls leicht, sollte aber bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentration sinken. Da jedoch die Absoluterhöhung des EYFP – Wertes deutlich höher ist als die des ECFP – Wertes, resultiert daraus eine gesteigerte Ratio. Durch die  $\text{Ca}^{2+}$  - bindende Wirkung des EGTA zeigt Probe 5 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM + EGTA 2mM) im Vergleich zu Probe 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM) eine Erniedrigung des EYFP – Wertes. Der ECFP – Wert erfährt ebenfalls eine leicht Erniedrigung, sollte jedoch bei sinkender  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentration eine Erhöhung erfahren. Da jedoch die Absoluterniedrigung des EYFP – Wertes deutlich höher ist als die des ECFP – Wertes, resultiert daraus ein deutlich erniedrigter Ratiowert.

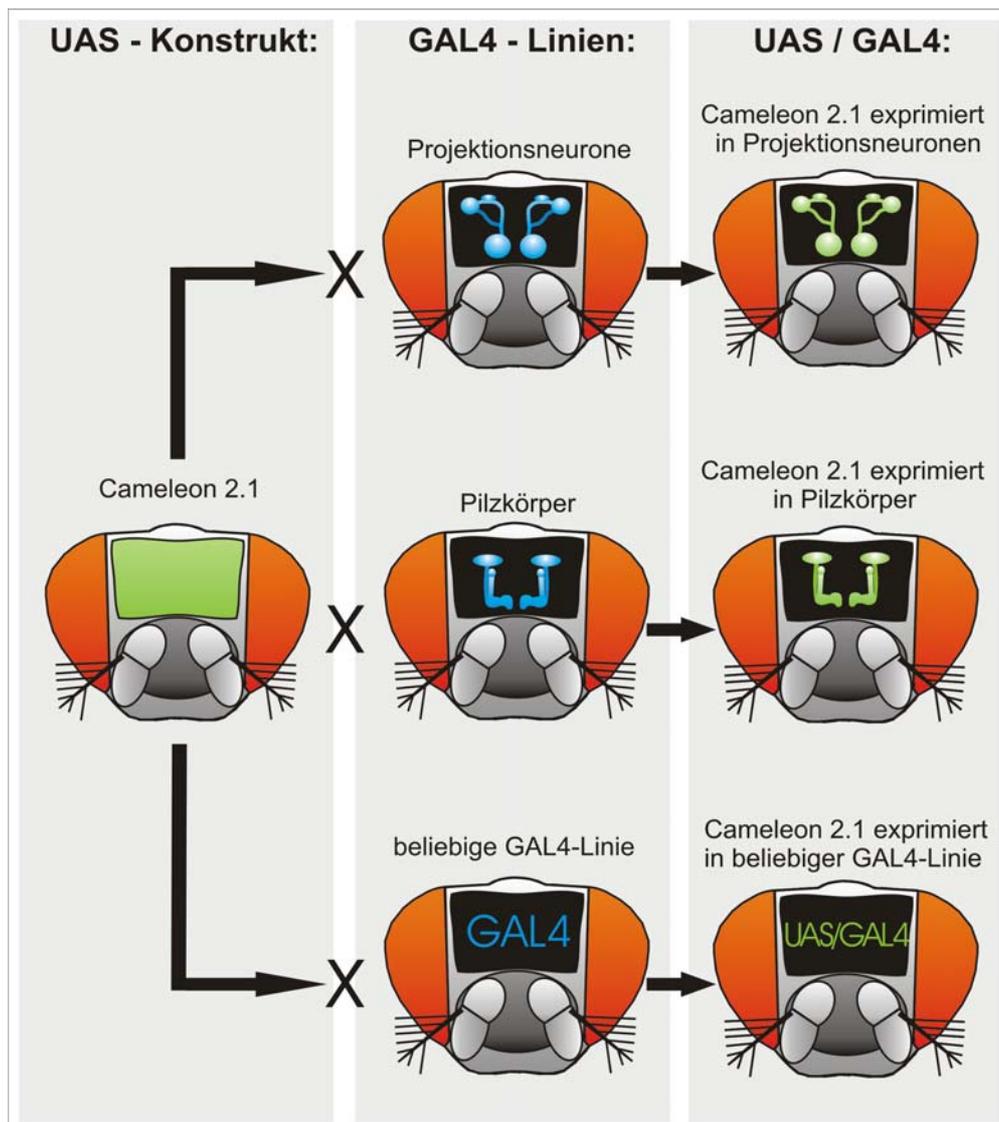
Die *in – vitro* Funktionsanalyse von Cameleon 2.1 zeigt also, dass das Fusionsprotein mit Licht der Wellenlänge 433 nm anregbar ist und, dass die emittierte EYFP – (535 nm) und ECFP – Fluoreszenz (485 nm) mit der neu etablierten Messapparatur sehr verlässlich detektiert werden kann. Es wurde nachgewiesen, dass das Cameleon 2.1 – Protein als ratiometrischer Sensor für unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentrationen sehr gut geeignet ist: Steigende Calciumionen – Konzentrationen können in einem Sensitivitätsbereich von 0,01 mM  $\text{Ca}^{2+}$  bis 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  detektiert werden. Entfernt man  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Analyselösung, sinkt der Ratiowert wieder. Das Protein arbeitet also reversibel.

## **4.4 *in – vivo* Imaging von Calcium – Signalen in den Antennalloben und Calyces von *Drosophila melanogaster* mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1**

Die ersten *in – vivo* Calcium Imaging Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Giovanni Galizia am Lehrstuhl für Neurobiologie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Dabei sollte zum einen die Fragestellung bearbeitet werden, ob die Duftrepräsentation in den Antennalloben von *Drosophila* ebenfalls dem für andere Organismen bereits beschriebenen glomerulären Code (Lieke, 1993; Mombaerts et al., 1996; Joerges et al., 1997; Friedrich und Korsching, 1997 und 1998; Rubin et al., 1999; Fuss und Korsching, 2001; Galizia und Menzel, 2001; Sachse und Galizia, 2003; Sandoz et al., 2003) unterliegt, und zum anderen, wie verschiedene Düfte im Calyx repräsentiert sind, d.h. wie die Prozessierung der Duftidentität von den Antennalloben auf höhere Gehirnzentren funktioniert – ein Ansatz der bis dahin noch nicht bearbeitet wurde

### **4.4.1 Selektive Expression von Cameleon 2.1 mit Hilfe des GAL4 – UAS Systems**

Um den Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) selektiv in Zellpopulationen gemeinsamer genetischer Identität zu exprimieren, wird die GAL4 – UAS Technik (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002) verwendet. Dazu benötigt man eine Fliegenlinie, die das Cameleon 2.1 – Konstrukt hinter dem UAS (upstream activating sequence) – Enhancer – Element trägt, und eine zweite Fliegenlinie, die den Hefetranskriptionsfaktor GAL4 in einer gewünschten Zellpopulation exprimiert. Kreuzt man die GAL4 – Linie mit der UAS: Cameleon 2.1 – Linie, resultiert daraus eine Filialgeneration die heterozygot für den Transkriptionsfaktor und den Calciumsensor ist. In dieser Filialgeneration kann der Transkriptionsfaktor an die UAS – Sequenz binden und Cameleon 2.1 wird in den gewünschten Zellen exprimiert. Abbildung 4.5 zeigt ein Schema für die selektive Expression von Cameleon 2.1 mittels GAL4 – UAS Technik: Die UAS – Fliegenlinie, die das Cameleon 2.1 – Konstrukt trägt, kann mit beliebigen GAL4 – Fliegenlinien gekreuzt

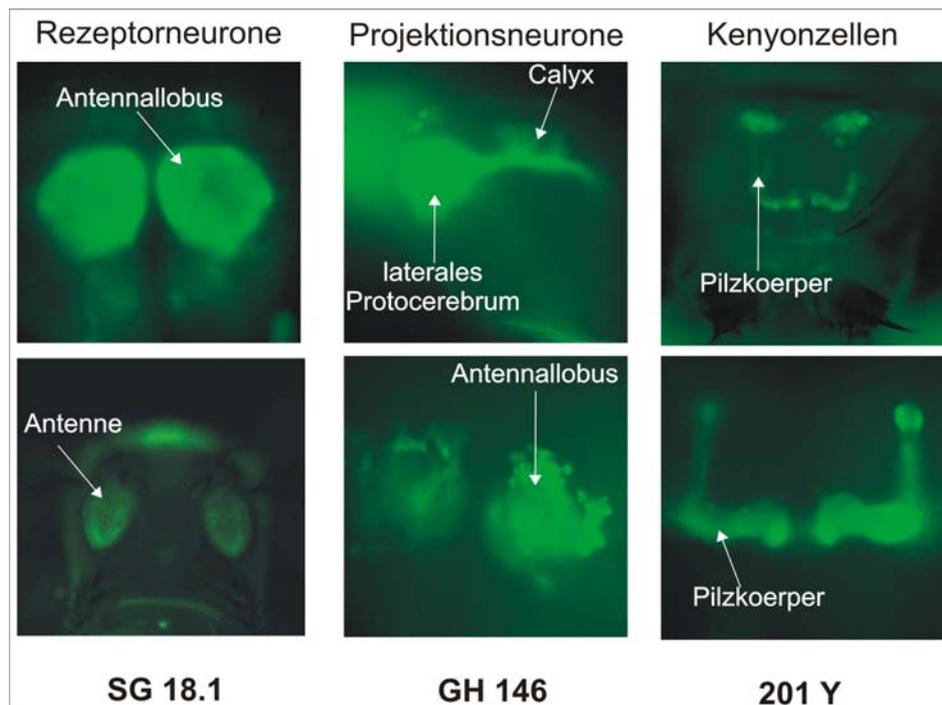


**Abb. 4.5** Selektive Expression von Cameleon 2.1 mit der GAL4 – UAS – Technik

Die Kreuzung der UAS – Fliegenlinie, die das Cameleon 2.1 – Konstrukt trägt, mit einer beliebigen GAL4 – Fliegenlinie, resultiert in einer Filialgeneration, die den Calciumsensor in der GAL4 – exprimierenden Zellpopulation exprimiert (Kreuzung unten). Wählt man eine Linie, die GAL4 in den Projektionsneuronen exprimiert, zeigt die Filialgeneration eine Cameleon 2.1 – Expression in den Projektionsneuronen (Kreuzung oben). Wählt man eine Linie, die GAL4 in den Pilzkörpern exprimiert, zeigt die Filialgeneration eine Cameleon 2.1 – Expression in den Pilzkörpern (Kreuzung Mitte).

werden. Um eine Expression des Calciumsensors in den Projektionsneuronen der Filialgeneration zu bewirken, wählt man eine Linie, die GAL4 in den Projektionsneuronen exprimiert. Für eine Expression in den Pilzkörpern, wählt man eine Linie, die GAL4 in den Pilzkörpern exprimiert. Allgemein gilt also, dass die Auswahl der GAL4 – Linie das Expressionsmuster des Sensors bestimmt.

Zur Verdeutlichung der beschriebenen Technik wurden Aufnahmen von verschiedenen GAL4 – UAS: Cameleon 2.1 – Fliegen gemacht (Abb. 4.6). Als UAS – Linie diente hierbei die Fliegenlinie Cameleon 2.1/82 (Diegelmann et al., 2002), bei den GAL4 – Linien handelt es sich um die Linien SG 18.1 (Shymala und Chopra, 1999), GH 146 (Stocker et al., 1997) und 201 Y (Yang et al., 1995). Die SG 18.1 – Cameleon 2.1 – Linie zeigt eine Expression des Calciumsensors in den olfaktorischen Rezeptorneuronen (Zellkörper und Dendriten im 3. Antennensegment und den Maxillarpalpen, präsynaptische Endigungen in den Antennalloben), die GH 146 – Cameleon 2.1 – Linie in den olfaktorischen Projektionsneuronen (genaue Beschreibung im nächsten Kapitel) und die 201 Y – Cameleon 2.1 – Linie in den Kenyonzellen des Pilzkörpers.



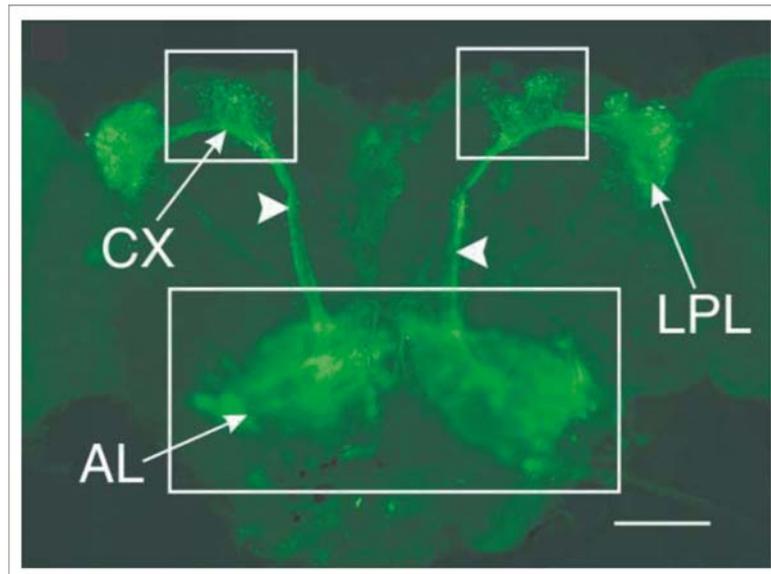
**Abb. 4.6** Selektive Expression von Cameleon 2.1 in verschiedenen Gehirnarealen

Die Expression des Calciumsensors Cameleon 2.1 mit der GAL4 – Linie SG 18.1 resultiert in einer Fluoreszenz des präsynaptischen Antennallobenneuropils und des 3. Antennensegments (links). Die Treiberlinie GH 146 evoziert eine Cameleon 2.1 – Fluoreszenz in den Projektionsneuronen (präsynaptisches Calyxneuropil, laterales Protocerebrum und postsynaptisches Antennallobenneuropil) (Mitte). Die Treiberlinie 201 Y evoziert Fluoreszenz in den Kenyonzellen der Pilzkörper (rechts). Bilder wurden mit einer Farb – CCD – Kamera (Axiocam, Zeiss) aufgenommen. Zur besseren optischen Darstellung, sind die Belichtungszeiten für die einzelnen Bilder individuell gewählt.

#### 4.4.2 Selektive Expression von Cameleon 2.1 in den olfaktorischen Projektionsneuronen

Die olfaktorischen Rezeptorneurone von *Drosophila* sind in den Antennen und Maxillarpalpen lokalisiert. Sie enden in den paarweise ausgebildeten Antennalloben, wo sie die präsynaptische Eingangsregion der 43 sogenannten Glomeruli bilden (Laissue et al., 1999). Die hier auftretende axonale Konvergenz ähnelt dem Verschaltungsmuster des olfaktorischen Bulbus der Vertebraten: In beiden Systemen terminieren die sensorischen Neurone, die einen bestimmten Rezeptorproteintyp exprimieren, in nur einem oder wenigen Glomeruli (Mombaerts et al., 1996; Vosshall et al., 2000). Die postsynaptischen Ausgangsneurone der Antennalloben, die Projektionsneurone (entsprechen den Mitralzellen der Vertebraten), zeigen ebenfalls ein genetisch determiniertes Verzweigungsmuster im Antennallobus (Jefferis et al., 2001). Diese stereotypische neuronale Organisation äußert sich in duftspezifischen glomerulären Aktivitätsmustern (Galizia und Menzel, 2001). Die Signalintegration im Insekten – Antennallobus ist nicht nur Ergebnis der starken Konvergenz – in *Drosophila* konvergieren ca. 1300 Rezeptorneurone auf 150 – 200 Projektionsneurone (Jefferis et al., 2001) – sondern resultiert auch aus dem Zusammenspiel mit inhibitorischen Netzwerken im Antennallobus: Sie verstärken sowohl die räumlichen Muster als auch die temporale Synchronisierung der Projektionsneuronenantworten (Laurent et al., 1998; Sachse und Galizia, 2002).

Um die räumliche und zeitliche Repräsentation von Düften in den Projektionsneuronen zu untersuchen, wird die GAL4 – enhancer trap – Linie GH 146 (Stocker et al., 1997) verwendet. Der GAL4 – Transkriptionsfaktor bindet an das UAS – enhancer – Element von heterozygoten GH 146 / Cameleon 2.1 – 82 – Fliegen und aktiviert so die Expression des Calciumsensors Cameleon 2.1 in ca. 90 der 150 – 200 Projektionsneurone (Jefferis et al., 2001) (whole – mount – Präparation, Abb. 4.7). Die Projektionsneurone bilden einen wesentlichen Teil des postsynaptischen Neuropils des Antennallobus und ziehen in zwei Trakten zum lateralen Protocerebrum. Dabei formen die meisten Neurone den inneren Antennocerebraltrakt. Er innerviert en passant den Calyx und bildet so präsynaptisches Neuropil des Calyx. Die restlichen Projektionsneurone bilden den medianen Antennocerebraltrakt aus und ziehen direkt zum lateralen Protocerebrum.



**Abb. 4.7** Selektive Expression von Cameleon 2.1 in den Projektionsneuronen

Whole – mount – Präparat eines *Drosophila* – Gehirns, das Cameleon 2.1 in den Projektionsneuronen exprimiert. Als GAL4 – Treiberlinie dient GH146. Die Expression ist deutlich sichtbar in den Antennalloben (AL), den inneren Antennocerebraltrakten (Pfeilköpfe), den beiden Calyces (CX) und im lateralen Protocerebrum (LPL). Das Bild wurde mit einer Farb – CCD – Kamera (Axiocam, Zeiss) aufgenommen. Skalierungsbalken = 50  $\mu$ m.

#### 4.4.3 Duftvezierte Calciumsignale in Antennalloben und Calyx

Die Antennalloben – und Calyxexperimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Giovanni Galizia am Lehrstuhl für Neurobiologie der Freien Universität Berlin, Deutschland, durchgeführt.

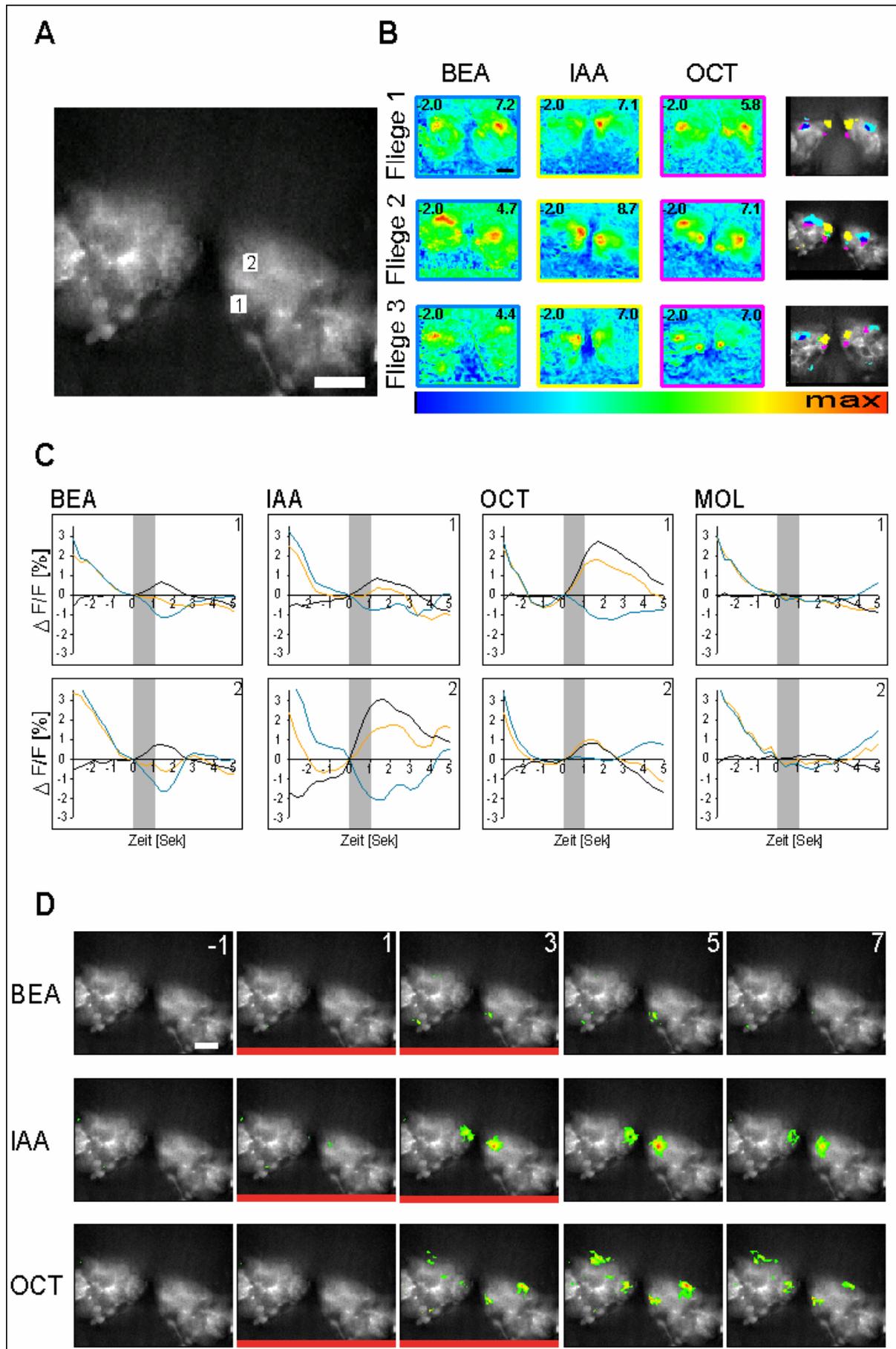
Zur Bearbeitung der Fragestellung, ob verschiedene Düfte in den Antennalloben und Calyces räumlich und zeitlich unterschiedlich repräsentiert sind, wurde die GAL4 – UAS – Linie GH146 – UAS: Cameleon 2.1 verwendet (Fliegen heterozygot für beide P – Element Insertionen). Die eigens etablierte *in – vivo* – Präparation der Fliegen erlaubt einen optischen Zugang zu beiden Gehirnarealen und die Imaging – Apparatur nimmt das FRET – basierte Verhältnis von EYFP – zu ECFP – Fluoreszenz (Ratio) des Calciumsensors Cameleon 2.1 auf (s.a. Kapitel 3.3). Als Duftstimulantien dienten Benzaldehyd (BEA), Ethylacetat (ETA), Isoamylacetat (IAA), Octanol (OCT), Butanol (BUT) und Propionsäure (PRO). Luft und Mineralöl (Lösungsmittel für die unverdünnten Duftstoffe) dienten als Negativkontrolle.

#### 4.4.3.1 Duftevozierte Calciumsignale in den Antennalloben

Die Morphologie und der glomeruläre Aufbau der Antennalloben ist anhand der Cameleon 2.1 – Expression in der *in vivo* – Präparation deutlich erkennbar (Abb. 4.8 A). Zur leichteren Orientierung ist das in Abb. 4.8 A abgebildete Areal in Abb. 4.7 durch ein weißes Rechteck hervorgehoben. Die Stimulation von 3 individuellen Fliegen mit den Düften BEA, IAA und OCT ist in den falschfarben – skalierten Aktivitätsmustern von Abb. 4.8 B dargestellt (Ratiosignal - Bilder). Die auf die Stimuli mit Calciumsignalen reagierenden Areale haben eine Größe von 10 – 30  $\mu\text{m}$ , liegen also in der Größenordnung von individuellen Glomeruli. Wiederholte Stimulation mit dem gleichen Duft ergab hoch reproduzierbare Aktivitätsmuster innerhalb einer Fliege (nicht abgebildet). Der kombinatorische Aspekt dieser glomerulären Duftrepräsentation ist in den Überlagerungsbildern in Abb. 4.8 B zu sehen: Hier sind für jede Fliege die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster der 3 applizierten Düfte in 3 verschiedenen Farben auf die EYFP – Morphologiebilder gelegt worden. Für alle 3 Fliegen zeigt sich, dass die 3 duftspezifischen Aktivitätsmuster Überlappungen zeigen.

Obwohl die einzelnen auf den Duftstimulus hin reagierenden Glomeruli morphologisch nicht eindeutig nachweisbar sind, zeigen die räumlichen Aktivitätsmuster der 3 Fliegen für die 3 verschiedenen Düfte ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit für die Calciumsignale zwischen verschiedenen Individuen, d.h. ein bestimmter Duft ist im Antennallobus durch ein ganz spezielles glomeruläres Aktivitätsmuster repräsentiert. Die auftretende Variabilität in den Aktivitätsmustern gleicher Düfte ist in den unterschiedlichen räumlichen Orientierungen der Antennalloben der 3 Fliegen begründet: Nach jeder *in vivo* – Präparation ist die Lage der Antennalloben individuell leicht unterschiedlich. Darum sind die Aktivitätsmuster nicht deckungsgleich (Abb. 4.8 B).

Abb. 4.8 C zeigt den zeitlichen Verlauf der EYFP – (gelb), ECFP – (cyan) und Ratio – Intensitäten (schwarz) für 3 der 6 Düfte und für die Mineralölkontrolle. Die Graphen wurden für die beiden regions of interest (ROIs) 1 und 2 in Abb 4.8 A erstellt. ROI 1 und 2 entsprechen der Lage von zwei individuellen Glomeruli. Echte duftevozierte Calciumsignale sind durch einen EYFP – Anstieg mit gleichzeitigem ECFP – Abfall gekennzeichnet (FRET – Effekt des Cameleon 2.1). Bewegungs – und Bleichartefak-



**Abb. 4.8** Duftevozierte Calciumsignale in den Antennalloben von *Drosophila*

**A** EYFP - Morphologie der beiden Antennalloben, Frontalansicht. Vgl. mit Abb. 4.7 zur Positionierung des abgebildeten Areals im gesamten Gehirn. Aus den ROIs 1 und 2 werden die Graphen für **C** berechnet. ROI 1 und 2 entsprechen der Lage von zwei individuellen Glomeruli. Weißer Skalierungsbalken = 25µm.

**B** Vergleich der falschfarben – codierten  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster (Ratiosignal – Bilder) für die einfache Stimulation mit BEA, IAA und OCT für 3 individuelle Fliegen. Die Aktivitätsmuster zeigen interindividuell ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit für einen gegebenen Duft. Die Bilder in der rechten Spalte zeigen die Überlagerung der stärksten Calciumsignale der 3 Düfte der Fliegen 1 - 3 mit der jeweiligen EYFP – Morphologie: Rosa Areale entsprechen dem OCT – Aktivitätsmuster, cyanfarbene Areale entsprechen dem BEA – Aktivitätsmuster und gelbe Areale dem IAA – Aktivitätsmuster. Areale, die sowohl auf BEA und IAA antworten sind grün, Areale, die sowohl auf OCT und BEA antworten sind blau dargestellt. Obwohl die individuellen Glomeruli morphologisch nicht eindeutig nachweisbar sind, weisen die zwischen den Fliegen in hohem Maße reproduzierbaren duftspezifischen Aktivitätsmuster darauf hin, dass derselbe Duft homologe Glomeruli in unterschiedlichen Fliegen aktiviert. Die Falschfarbenskalierung der Ratiosignal – Bilder liegt zwischen -2,0% EYFP/ECFP und dem Maximum, das in jedem Bild in der rechten oberen Ecke angegeben ist (Bsp. 5,8 für das oberste OCT – Ratiosignal – Bild).

**C** Zeitlicher Verlauf der EYFP – (gelb), ECFP – (cyan) und Ratio – Intensitäten (schwarz) für die Düfte BEA, IAA, OCT und die Negativkontrolle Mineralöl (MOL) von Fliege 2. Die Graphen sind aus den beiden ROIs 1 und 2 (Glomerulus 1 und 2) in **A** berechnet. Die obere Reihe entspricht ROI1, die untere Reihe ROI 2. EYFP und ECFP sind als  $\Delta F/F$  % dargestellt, die Ratio als EYFP/ECFP in %. Alle Graphen sind zu Beginn der Duftstimulation ( $t = 0$  Sek.) auf 0 gesetzt. Der 1 Sek. Duftstimulus ist durch den grauen Balken symbolisiert.

**D** Räumlich – zeitliche Aktivitätsmuster, dargestellt als Antennalloben – Bilderserie. Einzelbilder sind 0,66 Sek. auseinander, d.h. jedes zweite Bild ist abgebildet. Die Bildnummer steht in der rechten oberen Ecke der Einzelbilder. Der rote Balken symbolisiert den Duftstimulus. Ratiowerte  $> 0$  sind falschfarben – skaliert und auf die EYFP – Morphologie der jeweiligen ALs aufgelegt. Man beachte die Bilateralsymmetrie der duftinduzierten Signale, die räumlichen Signalunterschiede zwischen IAA und OCT und, die sehr schwachen BEA – Signale in dieser Fliege. Die Bilderserien sind als Filme unter den Pfad: "Filme / Exp\_olfaktorische Codierung / AL" auf der beigegefügten CD-ROM einsehbar.

te zeichnen sich durch EYFP – und ECFP – Fluoreszenzänderungen in dieselbe Richtung aus. Die Graphen für BEA, IAA und OCT bestätigen die Duftspezifität der räumlichen Aktivitätsmuster von Abb. 4.8 B: Die Amplituden der duftevozierten Signale für die beiden ROIs sind abhängig vom jeweiligen Duftstimulus. Benzaldehyd evoziert in beiden ROIs nur schwache Ratiosignale von ca. 0,5 – 0,75%. Isoamylacetat zeigt ein starkes Signal in ROI 2 (ca. 3%), dafür ein schwaches Signal in ROI 1 (ca. 0,9%). Im Gegensatz dazu evoziert Octanol in ROI1 ein starkes Ratiosignal (ca. 2,6%) und ein schwaches in ROI 2 (ca. 0,9%). Die Negativkontrolle Mineralöl (MOL) zeigt in beiden ROIs keine Signale. Die zeitlichen Verläufe zeigen also, dass es sich bei den in Abb. 4.8 B dargestellten falschfarben – codierten

Aktivitätsmuster der Antennalloben tatsächlich um echte Calciumsignale handelt und, dass distinkte Düfte durch einen spezifischen glomerulären Code im Antennallobus repräsentiert sind.

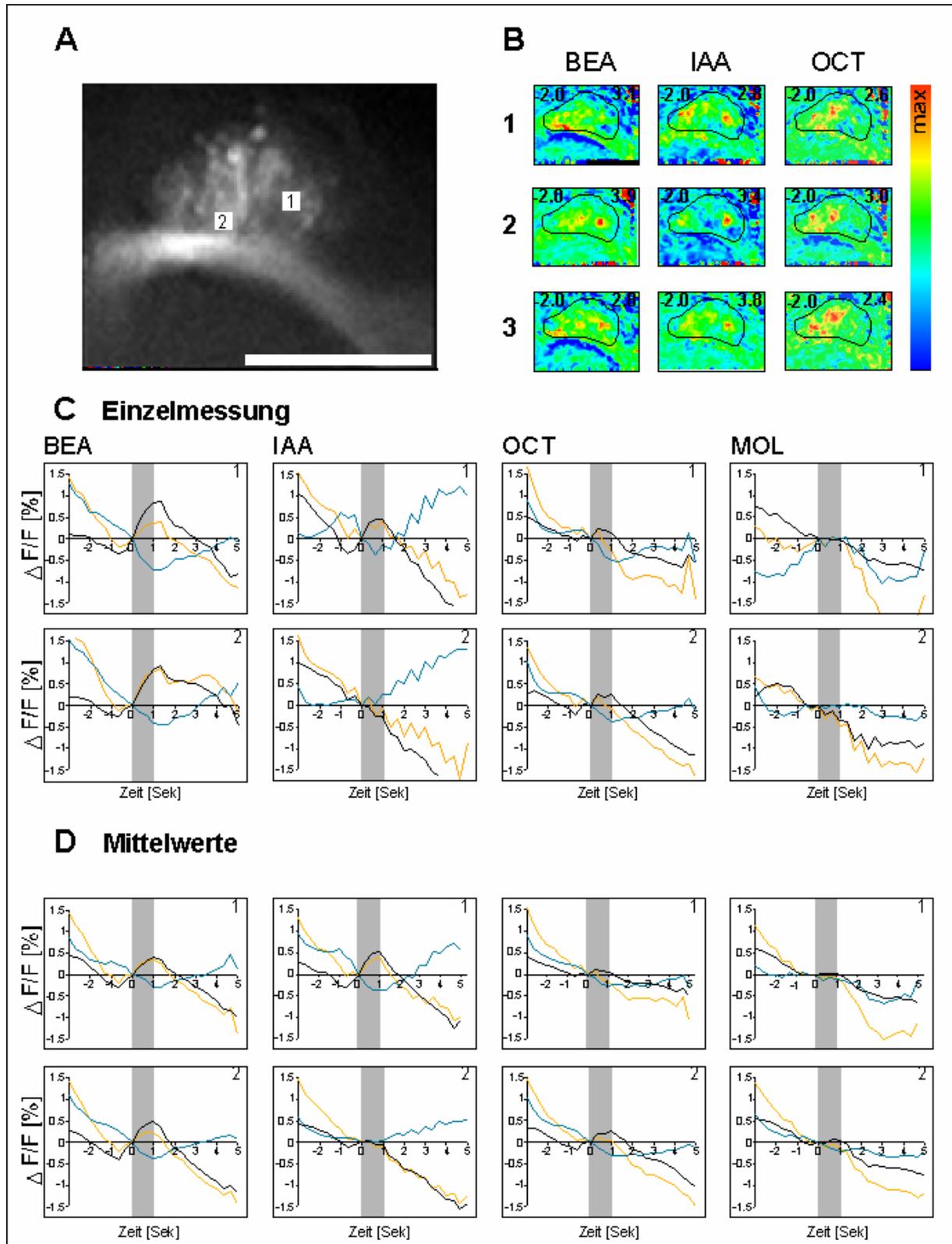
Der Mittelwert aller von den 6 Düften evozierten EYFP/ECFP Ratiosignalintensitäten für das gesamte Antennalloben – Areal ( $n = 9 - 12$  Tiere, s.a. Kapitel 3.3.5) liegt bei  $1,23\% \pm 0,23\%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $t = 5,4$ ,  $p < 0,003$ ,  $t$  – test).

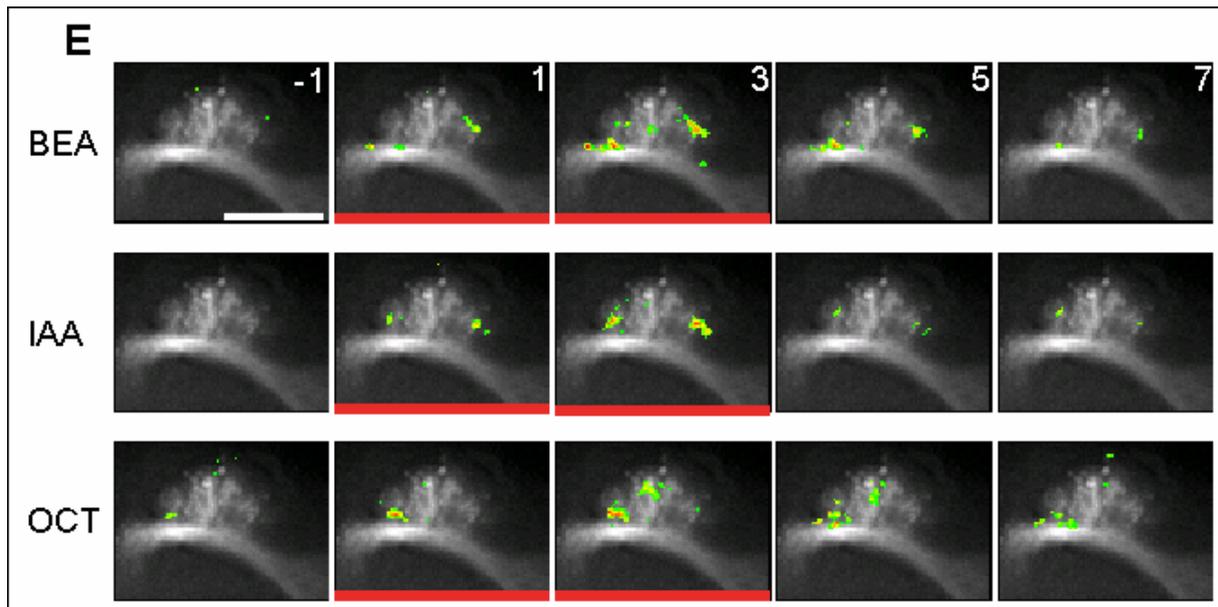
Schneidet man das Rauschen der in Abb 4.8 B dargestellten Aktivitätsmuster durch Festlegung eines Schwellenwertes ab (alle Ratiowerte  $< 0$  werden abgeschnitten), und überlagert die so entstandenen Signale mit der EYFP – Morphologie der entsprechenden Duftmessung, erhält man die in Abb. 4.8 D dargestellten Bilderserien der spatiotemporalen Aktivitätsmuster im Antennallobus. Im Allgemeinen dauert das Calciumsignal länger als der 1 Sek. Duftstimulus (roter Balken). Das Signalmaximum wurde meist 0,5 Sek. nach Beendigung des Duftstimulus erreicht, d.h. 1,5 Sek. nach Beginn des Duftstimulus. Die Bilderserien sind als Filme unter den Pfad: "Filme / Exp\_olfaktorische Codierung / AL" auf der beigefügten CD – ROM einsehbar.

#### 4.4.3.2 Duftevozierte Calciumsignale im Calyx

Um die räumlich – zeitliche Repräsentation verschiedener Düfte im dichtgepackten Neuropil des Calyx zu untersuchen, wurde bei den Messungen mit den 6 verschiedenen Düften meist auf einen der beiden Calyces des *Drosophila* – Gehirns fokussiert; nur in wenigen Präparationen war es möglich, beide Calyces der Fliege zu messen.

Abb. 4.9 A zeigt die EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneuronenaxone. Sie ziehen als innerer Antennocerebraltrakt zum lateralen Protocerebrum, wobei ihre Seitenäste eine prominente präsynaptische Eingangsregion des Calyx ausbilden. Zur leichteren Orientierung ist das in Abb. 4.9 A abgebildete Areal in Abb. 4.7 durch ein weißes Rechteck hervorgehoben. Abb. 4.9 B zeigt die  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster für die 3 Düfte BEA, IAA und OCT. Für jeden Duft sind 3 Aktivitätsmuster abgebildet, die alle inner -





**Abb. 4.9** Duftvezierte Calciumsignale im Calyx von *Drosophila*

**A** EYFP - Morphologiebild von Calyx und anschließendem Teil des inneren Antennocerebraltrakts. Vgl. mit Abb. 4.7 zur Positionierung des abgebildeten Areals im gesamten Gehirn. Aus den ROIs 1 und 2 werden die Graphen für **C** und **D** berechnet. Weißer Skalierungsbalken = 25µm.

**B** Vergleich der falschfarben - codierten  $Ca^{2+}$  - Aktivitätsmuster (Ratiosignal - Bilder) für die dreifache Stimulation mit BEA, IAA und OCT innerhalb einer Fliege. Die Aktivitätsmuster zeigen ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit für einen gegebenen Duft innerhalb des gemessenen Tieres. Die Falschfarbenskalierung der Aktivitätsmuster liegt zwischen -2,0% EYFP/ECFP und dem Maximum, das in jedem Bild in der rechten oberen Ecke angegeben ist (Bsp. 2,6 für das oberste OCT - Ratiosignal - Bild). Die schwarze Linie umfasst das Calyxareal.

**C** Zeitlicher Verlauf der Einzelmessungen für die Düfte BEA, IAA, OCT und die Negativkontrolle Mineralöl (MOL). EYFP - (gelb), ECFP - (cyan) und Ratio - Intensitäten (schwarz). Die Graphen sind aus den beiden ROIs 1 und 2 in **A** berechnet. Die obere Reihe entspricht ROI1, die untere Reihe ROI 2. EYFP und ECFP sind als  $\Delta F/F$  % dargestellt, die Ratio als EYFP/ECFP in %. Alle Graphen sind zu Beginn der Duftstimulation ( $t = 0$  Sek.) auf 0 gesetzt. Der 1 Sek. Duftstimulus ist durch den grauen Balken symbolisiert.

**D** Zeitlicher Verlauf von 3 arithmetisch gemittelten Einzelmessungen für die Düfte BEA, IAA, OCT und die Negativkontrolle Mineralöl (MOL). EYFP (gelb), ECFP (cyan) und Ratio (schwarz). Die Graphen sind aus den beiden ROIs 1 und 2 in **A** berechnet. Die obere Reihe entspricht ROI1, die untere Reihe ROI 2. EYFP und ECFP sind als  $\Delta F/F$  % dargestellt, die Ratio als EYFP/ECFP in %. Alle Graphen sind zu Beginn der Duftstimulation ( $t = 0$  Sek.) auf 0 gesetzt. Der 1 Sek. Duftstimulus ist durch den grauen Balken symbolisiert.

**E** Räumlich - zeitliche Aktivitätsmuster, dargestellt als Calyx - Bilderserie. Einzelbilder sind 0,66 Sek. auseinander, d.h. jedes zweite Bild ist abgebildet. Die Bildnummer steht in der rechten oberen Ecke der Einzelbilder. Der rote Balken symbolisiert den Duftstimulus. Ratiowerte  $> 0$  sind falschfarben - skaliert und auf die EYFP - Morphologie des jeweiligen Calyx aufgelegt. Man beachte die räumlichen Signalunterschiede zwischen BEA, IAA und OCT. Die Bilderserien sind als Filme unter den Pfad: "Filme / Exp\_olfaktorische Codierung / CX" auf der beigegefügt CD-ROM einsehbar.

halb eines Tieres gemessen wurden. Alle zeigen eine deutliche räumliche Organisation des Calciumsignals, wobei die auf den Duftstimulus hin antwortenden Areale in diskreten Regionen über den Calyx hinweg verteilt sind. Die 3 Aktivitätsmuster von IAA zeigen jeweils ein bilaterales Calciumsignal, der Octanolstimulus führt zu 3 Aktivitätsmustern mit zentralen und linksseitigen Calciumsignalen, BEA dagegen zeigt Aktivitätsmuster, die ebenfalls wie IAA bilateral ausgeprägt sind, dafür aber eine diffusere Verteilung der antwortenden Areale aufweisen. Insgesamt zeigt das hohe Maß an Reproduzierbarkeit der Aktivitätsmuster für einen gegebenen Duft, dass im Calyx, wie in den Antennalloben, eine duftspezifische räumliche Repräsentation vorliegt. Ein Vergleich der Aktivitätsmuster zwischen verschiedenen Individuen war aufgrund der unterschiedlichen Lage der Calyces in den unterschiedlichen Präparationen nicht möglich.

Ähnlich wie Abb. 4.8. C für den Antennallobus, zeigt Abb. 4.9 C den zeitlichen Verlauf der EYFP – (gelb), ECFP – (cyan) und Ratio – Intensitäten (schwarz) für 3 der 6 Düfte und für die Mineralölkontrolle. Die Graphen wurden für die beiden regions of interest (ROI) 1 und 2 in Abb. 4.9 A erstellt. Auch in diesen Graphen wird der kombinatorische Effekt der Aktivitätsmuster deutlich: BEA evoziert starke Ratiosignale (ca. 0,5%) in beiden ROIs 1 und 2 (Abb. 4.9 A), IAA zeigt nur in ROI 1 ein Calciumsignal (ca. 0,5%) und OCT zeigt ebenfalls in beiden ROIs Signale (ca. 0,25%), die jedoch bedeutend schwächer sind als die von BEA. Die in Abb. 4.9 D dargestellten zeitlichen Verläufe sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Messungen je Duft innerhalb dieser Fliege. Sie entsprechen den Einzelmessungen in Abb. 4.9 C in hohem Maße und können als Indikator für die Reproduzierbarkeit angesehen werden. Die präsynaptischen Endigungen der Projektionsneurone im Calyx antworten auf den Duftstimulus mit einer kürzeren Verzögerung als die postsynaptischen Dendrite im Antennallobus. In den meisten Calyxmessungen startet das Calciumsignal unmittelbar mit dem Duftstimulus.

Der Mittelwert aller von den 6 Düften evozierten EYFP/ECFP Ratiosignalintensitäten für das gesamte Calyx – Areal ( $n = 6$  Düfte, 1 – 5 gemittelte Düfte in 10 Tieren) liegt bei  $0,6\% \pm 0,06\%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $t = 9,7$ ,  $p < 0,0002$ ,  $t$  – test) und ist damit hoch signifikant, bleibt aber deutlich niedriger als der Ratiosignalmittelwert des

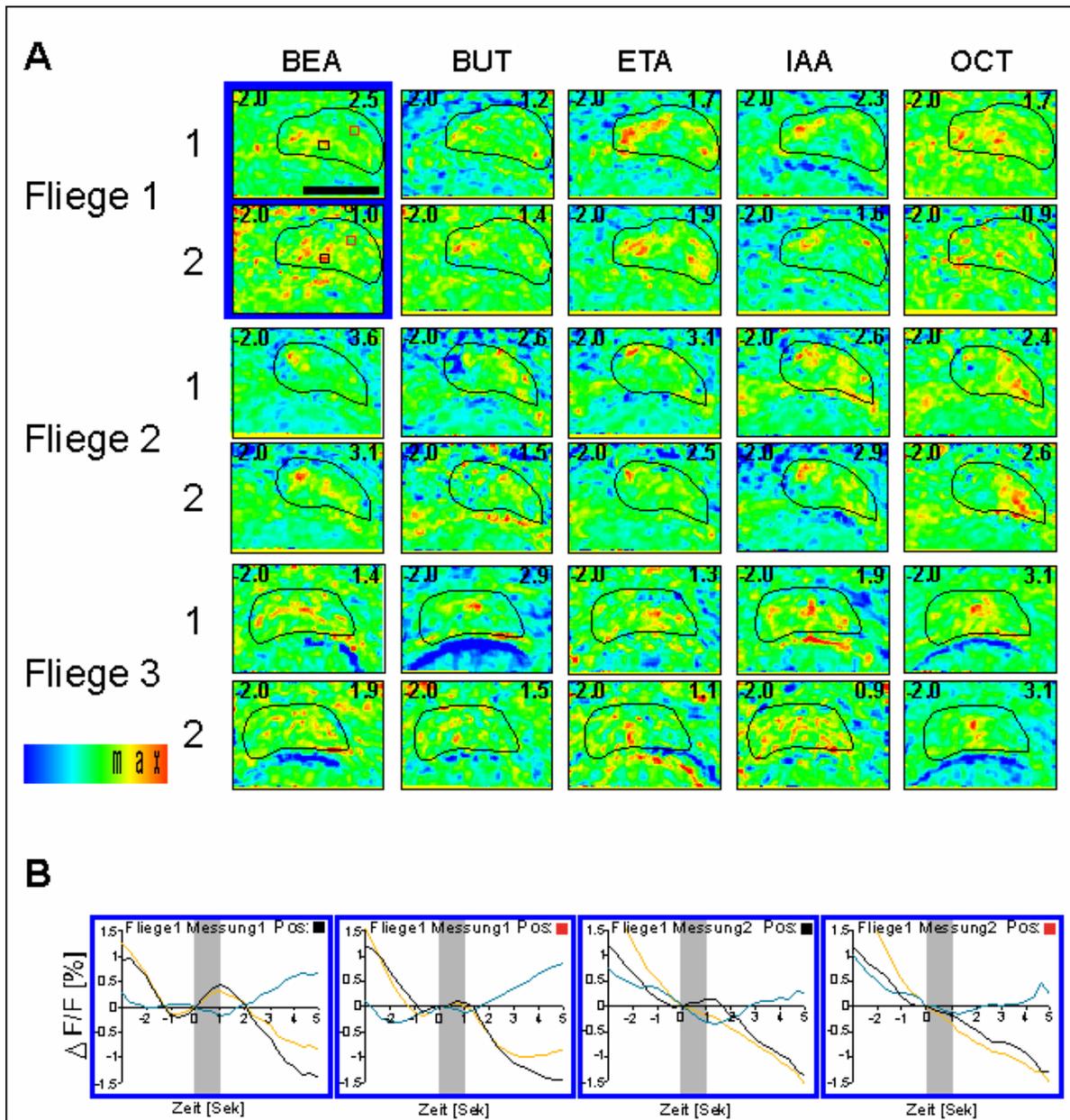
Antennallobus. Genau wie im Antennallobus sind die Unterschiede in den Ratiosignalmaxima zwischen den verschiedenen Düfte für das gesamte Calyxareal nicht signifikant.

Schneidet man auch hier das Rauschen der in Abb. 4.9 B dargestellten  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster durch Festlegung eines Signalschwellenwertes ab (alle Ratiowerte  $< 0$  werden abgeschnitten), und überlagert die so entstandenen Ratiosignale mit der EYFP – Morphologie der entsprechenden Duftmessung, erhält man die in Abb. 4.9 E dargestellten Bilderserien der spatiotemporalen Aktivitätsmuster im Calyx. Im Allgemeinen dauert das Calciumsignal auch hier länger als der 1 Sek. Duftstimulus (roter Balken). Das Signalmaximum wird meist kurz nach Beendigung des Duftstimulus erreicht. Die Bilderserien sind als Filme unter den Pfad: "Filme / Exp\_olfaktorische Codierung / CX" auf der beigefügten CD – ROM einsehbar.

..

Zur Vervollständigung der Calyxdaten sind in Abb. 4.10 A die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster für die 5 Düfte BEA, BUT, ETA, IAA und OCT für 3 verschiedene Fliegen mit jeweils zwei Einzelmessungen dargestellt. Die Aktivitätsmuster zeigen deutlich, dass ein Vergleich zwischen den Tieren nicht möglich ist. Die Calyces der 3 Präparate zeigen eine zu unterschiedliche Orientierung. Der Vergleich innerhalb einer Fliege, also zwischen 2 Einzelmessungen liefert jedoch die erwarteten Ergebnisse: Gleiche Düfte evozieren in derselben Fliege sehr ähnliche Aktivitätsmuster. So zeigt beispielsweise ETA in beiden Einzelmessungen von Fliege 1 großflächige Calciumsignale links und rechts der Calyxmedianen, OCT evoziert in Fliege 2 in beiden Einzelmessungen starke Calciumsignale in der rechten Calyxhälfte und BEA in Fliege 3 ein mehr diffuses über den gesamten Calyx verbreitetes Calciumsignal. Die abgebildeten Aktivitätsmuster bestätigen also, dass verschiedene Düfte im Calyx ganz spezifische Calciumsignalmuster evozieren, die innerhalb einer Fliege zu einem hohen Maß reproduzierbar sind.

Zum Nachweis, dass es sich bei den Aktivitätsmustern auch hier um echte Calciumsignale handelt, sind in Abb. 4.10 B die EYFP – (gelb), ECFP – (cyan) und Ratio – Intensitäten (schwarz) der beiden BEA – Messungen von Fliege 1 dargestellt. Zur Berechnung der Graphen wurden 2 ROIs im Calyx ausgewählt, die in beiden



**Abb. 4.10** Dufftevozierte Calciumsignale im Calyx von *Drosophila*

**B** Vergleich der falschfarben – codierten  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster (Ratiosignal – Bilder) für die 5 Düfte BEA, BUT, ETA, IAA und OCT für 3 verschiedene Fliegen mit jeweils zwei Einzelmessungen. Die Aktivitätsmuster der beiden Einzelmessungen innerhalb einer Fliege, zeigen ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit für einen gegeben Duft. Ein Vergleich der Aktivitätsmuster zwischen den Fliegen ist aufgrund der unterschiedlichen Lage des Calyx nicht möglich. Die Falschfarbenskalierung der Aktivitätsmuster liegt zwischen -2,0% EYFP/ECFP und dem Maximum, das in jedem Bild in der rechten oberen Ecke angegeben ist (Bsp. 2,5 für das oberste BEA – Ratiosignal – Bild). Die schwarze Linie umfasst das Calyxareal. Schwarzer Skalierungsbalken im obersten BEA – Aktivitätsmuster = 25 $\mu\text{m}$ .

**C** Zeitlicher Verlauf der beiden BEA – Einzelmessungen von Fliege 1. EYFP – (gelb), ECFP – (cyan) und Ratio (schwarz). Die Graphen von Messung 1 und 2 sind aus den ROIs 1 und 2 in den entsprechenden BEA – Aktivitätsmuster von Fliege 1 berechnet. In beiden Messungen zeigt sich der kombinatorische Aspekt der räumlichen Duftrepräsentation: Nur an Position 1 tritt ein echtes Calciumsignal auf. EYFP und ECFP sind als  $\Delta F/F$  % dargestellt, die Ratio als EYFP/ECFP in %. Alle Graphen sind zu Beginn der Duftstimulation ( $t = 0$  Sek.) auf 0 gesetzt. Grauer Balken symbolisiert Duftstimulus.

Einzelmessungen auf derselben Position liegen (Abb. 4.10 A, Aktivitätsmuster für BEA 1 und 2 von Fliege 1). Hier wird noch einmal der kombinatorische Aspekt der Duftrepräsentation deutlich: In beiden BEA – Messungen ist an Position 1 (ROI1) ein deutliches Ratiosignal erkennbar, wohingegen Position 2 (ROI 2) nur ein sehr schwaches oder gar kein Signal liefert. Dass es sich um echte duftinduzierte Calciumsignale handelt, kann anhand des FRET – basierten EYFP – Anstiegs bei gleichzeitigem ECFP – Abfall von Cameleon 2.1 ersehen werden.

#### 4.4.4 Zusammenfassung

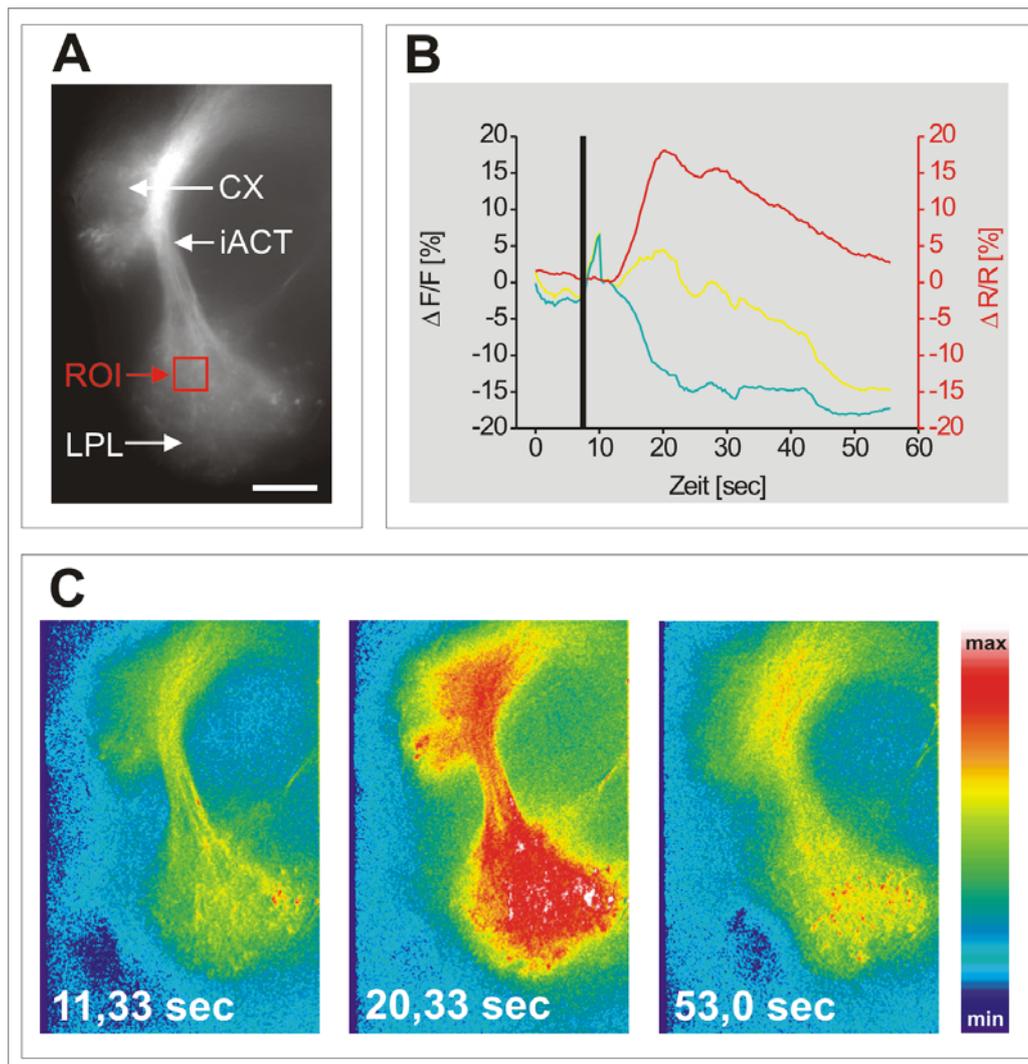
Mit der GAL4 – UAS – Technik (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002) kann der Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) in beliebigen Zellpopulationen exprimiert werden. Wählt man als GAL4 – Treiberlinie den Fliegenstamm GH 146 (Stocker et al., 1997) wird der Sensor in den olfaktorischen Projektionsneuronen von *Drosophila* exprimiert und erlaubt somit eine Untersuchung der räumlich – zeitlichen Duftrepräsentation in den Antennalloben und Calyces. Die Duftexperimente in den Antennalloben zeigen, dass verschiedene Düfte verschiedene Glomeruli aktivieren. Es liegt also eine räumliche kombinatorische Duftrepräsentation im Antennallobus vor. Auch im Calyx sind verschiedene Düfte kombinatorisch repräsentiert: Jeder Duft evoziert ein charakteristisches räumliches Aktivitätsmuster. Für den zeitlichen Verlauf der Calciumsignale gilt, dass die präsynaptischen Endigungen der Projektionsneurone im Calyx auf den Duftstimulus mit einer kürzeren Verzögerung antworten als die postsynaptischen Dendriten im Antennallobus und, dass die Signale durch einen monotonen Verlauf charakterisiert sind: Sie steigen mit Beginn des Duftstimulus an und erreichen kurz nach Ende der Duftgabe ihre Höhepunkte, bevor sie wieder abklingen. Komplexen Aktivitätswellen, die sich über die Zeit verändern, wurden nicht beobachtet.

## 4.5 Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid

Die Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid wurden im Rahmen der Etablierung der neuen *in vivo* Imaging – Apparatur durchgeführt. Kaliumchlorid – induzierte Calciumsignale liefern im Vergleich zu den physiologischen Duftsignalen sehr große Veränderungen im Verhältnis von EYFP – zu ECFP - Fluoreszenz. Mit Hilfe dieser eindeutigen und einfach detektierbaren Signale, konnten die Komponenten der neu am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie, Universität Würzburg, aufgebauten Imaging – Apparatur auf die Richtigkeit ihrer Funktion, d.h. Filterspezifikation, Anregungswellenlänge, Detektion der EYFP – und ECFP – Wellenlängen, usw., und auf die Richtigkeit der vorgenommenen Einstellungen in *MetaFluor* (Datenaufnahme – Software) und *MetaMorph* (Datenauswertungs – Software) getestet werden.

Bei den Experimenten dient Kaliumchlorid [1M] als Stimulus. 10µl werden in den Tropfen Ringerlösung (ca. 300µl) zwischen Objektiv und Fliegenpräparat mittels einer Pipette injiziert. Die Endkonzentration beträgt also ca. 33 mM. Es hat die Eigenschaft die Neuronenmembranen zu depolarisieren und führt so zu einem massiven Einstrom von Calciumionen in die Zellen. Das dort exprimierte Cameleon 2.1 – Protein kann diesen Einstrom messen. Da die Injektion der Kaliumchloridlösung manuell erfolgt, ist der Injektionszeitpunkt variabel. Nach der Injektion diffundiert das Kaliumchlorid vermutlich durch kleine Verletzungen des Neurolemmas (Blut – Hirn – Schranke), die bei der Präparation entstehen, ins Fliegengehirn und löst die Depolarisation und somit das Calciumsignal aus.

Im Laufe der Etablierungsarbeit wurden ca. 50 Weibchen der Fliegenlinie Cameleon 2.1/82 – GH146 (homozygot für beide P – Element Insertionen) gemessen, davon wurden 5 für die Arbeit ausgewertet. Für alle 5 wurden die EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten, die  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster zur optischen Darstellung des Signals und je ein Ratiosignal – Film und ein Morphologie – Film mit überlagertem Ratiosignal erstellt. Im Ergebnisteil wird exemplarisch die Einzelmessung einer Fliege (Fliege 1) und das arithmetisch gemittelte Signal der 5 Fliegen vorgestellt. Die Einzelmessungen der 4 restlichen Fliegen (Fliegen 2 – 5) befinden sich im Anhang (s.a. Kapitel 9.1). Die Filme aller 5 Fliegen sind auf CD – Rom beigefügt.



**Abb. 4.11** Exemplarisches Experiment zur Depolarisation mit Kaliumchlorid (Fliege 1)

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Intensitäten in **B** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

**B** Zeitlicher Verlauf der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) auf den KCl – Stimulus. Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio als  $\Delta R/R$  [%]. Die KCl – Injektion (10µl, 1M) wird durch einen schwarzen Balken symbolisiert.

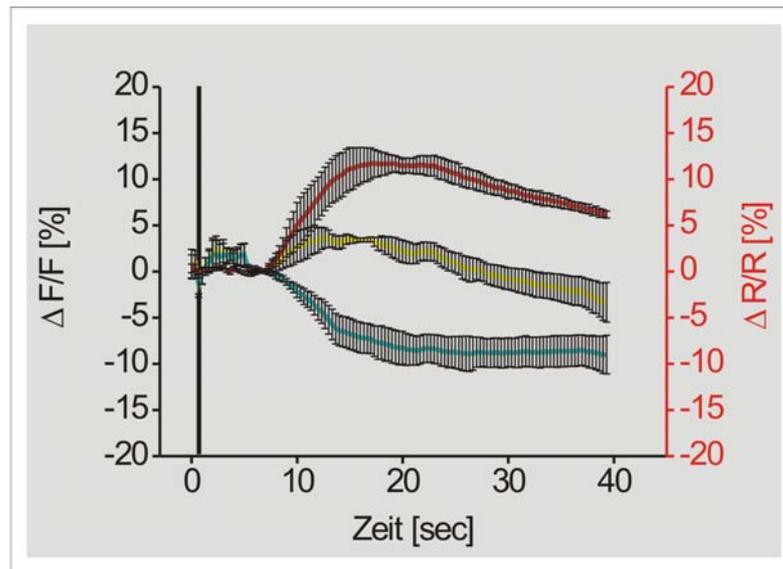
**C**  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster. Muster 1 (Zeitpunkt der Messung: 11,33 Sek.) wurde nach der KCl – Injektion und vor dem Signalstart aufgenommen, es stellt die neuronale Aktivität vor der Depolarisation dar. Muster 2 (Zeitpunkt der Messung: 20,33 Sek.) steht für das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum, Calyx und innerem Antennocerebraltrakt. Muster 3 (Zeitpunkt der Messung: 53,0 Sek.) steht für das Ende des Calciumsignals. Abgebildet ist der Skalierungsbalken für die Falschfarbencodierung der  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster.

Die untersuchte Region der Cameleon 2.1/82 – GH146 homozygoten Tiere ist das laterale Protocerebrum (Abb. 4.11 A). Bei allen ausgewerteten Tieren wurde eine 20 x 20 Pixel große region of interest (ROI) im anterioren Bereich des lateralen

Protocerebrums ausgewählt. Innerhalb dieser Region werden die Daten für die EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten errechnet (Abb. 4.11 B). In der exemplarisch dargestellten Messung von Fliege 1 symbolisiert der schwarze Balken den Zeitpunkt der KCl – Injektion (Abb. 4.11 B). Bei der Injektion gerät die Pipettenspitze in den Strahlengang des Mikroskops. Dies macht sich in den EYFP – und ECFP – Graphen als kleine Spitze kurz nach Injektionsstart bemerkbar. Es vergehen ca. 4 Sek. zwischen Injektion und einsetzender Depolarisation. In dieser Zeit diffundiert das KCl durch den Ringertropfen bis zum Fliegengehirn, wo es das Calciumsignal auslöst. Das Calciumsignal entspricht per Definition einem durch den FRET – Effekt verursachten EYFP – Anstieg mit gleichzeitigem ECFP – Abfall. Das daraus resultierende Calciumsignal erreicht für die ROI der Beispielfliege eine maximale Veränderung der Ratio EYFP / ECFP von ca. 18%.

Zur optischen Darstellung des zellulären Calcium - Influx werden 3 Ratiobilder ( $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster) aus der Messung herausgenommen (Abb. 4.11 C). Sie dienen der räumlichen Darstellung für die intrazelluläre Calciumkonzentration. Bild 1 (Zeitpunkt der Messung: 11,33 Sek.) wurde nach der Injektion aufgenommen, es stellt also die intrazelluläre Calciumkonzentration vor der einsetzenden Depolarisation dar. Bild 2 (Zeitpunkt der Messung: 20,33 Sek.) zeigt den Zeitpunkt der größten Calciumkonzentration im lateralen Protocerebrum. Auch das Verhältnis von EYFP – zu ECFP – Fluoreszenz (Ratio) innerhalb des Calyx und des inneren Antennocerebraltraktes erreicht zu diesem Zeitpunkt seine höchsten Werte. Die deutliche Zunahme an intrazellulärem Calcium kann anhand des Falschfarbenskalierungsbalkens abgelesen werden. Bild 3 (Zeitpunkt der Messung: 53,0 Sek.) steht für das Ende des Calciumsignals. Es wird deutlich, dass das Calciumsignal nach Erreichen seines Maximums ca. 35 Sek. benötigt, bevor es wieder sein Ausgangsniveau erreicht; laterales Protocerebrum, Calyx und innerer Antennocerebraltrakt zeigen jetzt wieder dieselbe Falschfarbenskalierung wie Bild 1.

Die Graphen für die arithmetischen Mittelwerte aller 5 ausgewerteten Fliegen sind in Abb. 4.12 dargestellt. Um die Messungen der 5 verschiedenen Fliegen zu mitteln, müssen die Daten aufgrund des variablen Ablaufes der einzelnen Experimente einheitlich gestaltet werden: Der Injektionszeitpunkt wurde für alle 5 Messungen einheitlich auf 0 gesetzt (s.a. Kapitel 3.4.6.2.1).



**Abb. 4.12** Arithmetische Mittelwerte der Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid (n = 5)

Zeitlicher Verlauf der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) auf den KCl – Stimulus. Die EYFP – und ECFP – Graphen sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio als  $\Delta R/R$  [%]. Die KCl – Injektion (10 $\mu$ l, 1M) wird durch einen schwarzen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler.

Die kleine Spitze in den zeitlichen Verläufen der EYFP (gelb) – und ECFP – Fluoreszenzintensitäten (cyan) zum Injektionsstart (der schwarze Balken symbolisiert auch hier den Zeitpunkt der KCl – Injektion) wird durch die Berechnung der Ratio (rot) sehr schön ausgeglichen. Es vergehen ca. 7 Sek. zwischen Injektion und Signalstart. Auch im arithmetischen Mittel der 5 Fliegen ist das Calciumsignal eindeutig: EYFP steigt zu Signalbeginn stark an und gleichzeitig sinkt ECFP ab. Das daraus resultierende Ratiosignal erreicht ein Maximum von 11,7 % +/- 1,5 bei 17,33 Sek.. Die Daten der 5 Fliegen zeigen deutlich, dass die geleistete Etablierungsarbeit erfolgreich war. Sowohl die Datenaufnahme (Aufbau und Einstellung der Imaging – Apparatur, Einsatz des virtuell geteilten Chips der CCD – Kamera zur simultanen Messung der EYFP – und ECFP – Daten und die damit verbundene Berechnung der Ratio) und Datenauswertung (Erstellung der Graphen und Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster), als auch die verwendeten homozygoten Cameleon 2.1/82 – GH146 – Fliegen funktionieren wie erwartet: Durch die Stimulation der olfaktorischen Neuronen der GH146 – Linie mit KCl kommt es zu einem starken Calciumeinstrom in die Zellen, der vom FRET – Mechanismus des Cameleon 2.1 – Protein eindeutig nachgewiesen wird: EYFP steigt an, gleichzeitig nimmt ECFP ab und die resultierende Ratio stellt das Signal dar.

## **4.6 *in – vivo* Imaging von Calcium – Signalen im lateralen Protocerebrum von *Drosophila melanogaster* mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1**

Die Experimente zur olfaktorischen Codierung im lateralen Protocerebrum wurden durchgeführt, um folgende Fragestellungen zu erörtern: Sind duftvezierte, also physiologische Calciumsignale im lateralen Protocerebrum überhaupt messbar? Wenn ja, wie unterscheiden sich die Signale von verschiedenen Düften in unterschiedlichen Konzentrationen? Ändert sich mit der Konzentration die Signalstärke und / oder ändert sich die Größe des reagierenden neuronalen Areals? Eng damit verbunden, stellt sich die Frage, ob die verschiedenen Düfte im lateralen Protocerebrum räumlich repräsentiert sind, d.h. ist die Duftidentität in einem räumlichen neuronalen Muster codiert?

Zur Bearbeitung des Projekts wurden die Calciumsignale im lateralen Protocerbrum von Cameleon 2.1/82 – GH146 homozygoten Weibchen gemessen. Als Stimuli kommen vier verschiedene Düfte zum Einsatz: Isoamylacetat (IAA), Benzaldehyd (BEA), Ethylacetat (ETA) und Methylcyclohexanol (MCH). Jeder Duft wird in einer logarithmischen Verdünnungsreihe dargeboten. Der höchsten Duftkonzentration entspricht eine Verdünnung von  $10^{-1}$ , ausgehend von der 100% Duftlösung. Weitere Verdünnungsstufen sind:  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ . Als Lösungsmittel dient Mineralöl (s.a. Kapitel 3.4.5.1.1).

Die zu testenden Fliegen sind in zwei Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1 besteht aus Fliegen, die gegen die Isoamylacetat – und Benzaldehydverdünnungsstufen getestet werden. Gruppe 2 besteht aus Fliegen, die gegen die Methylcyclohexanol- und Ethylacetatverdünnungsstufen getestet werden. Die Messung einer Fliege besteht also aus der Applikation zweier Düfte, in je vier Verdünnungsstufen. Die Düfte werden abwechselnd präsentiert, beginnend mit der höchsten Verdünnungsstufe, und endend mit der niedrigsten Verdünnungsstufe. So wird erreicht, dass der jeweils höher konzentrierte Duft nicht mit dem vorher dargebotenen Duft interferiert. Um Adaptionereignissen vorzubeugen, vergehen zwischen den einzelnen Duftmessungen einer Messreihe zwei Minuten.

Für die IAA / BEA – Experimente wurden ca. 25 weibliche Fliegen präpariert. Nur 12 davon wurden gegen den IAA / BEA – Konzentrationsgradienten getestet. Die anderen 13 Fliegen wurden entweder bei der Präparation stark beschädigt, oder zeigten schon zu Beginn der Messung keine Signale; diese Fliegen wurden sofort verworfen. Von den 12 getesteten Fliegen wurden 4 für den Ergebnisteil ausgewertet, die anderen 8 Fliegen wurden aufgrund unzuverlässiger Signale aus der Statistik herausgenommen (s.a. Kapitel 3.4.6.1.4). Für die MCH / ETA – Experimente wurden ebenfalls ca. 25 weibliche Fliegen präpariert. Nur 9 davon wurden gegen die MCH / ETA – Konzentrationsgradienten getestet. Die anderen 16 Fliegen wurden aus den oben genannten Gründen verworfen. Von den 9 getesteten Fliegen wurden 4 für den Ergebnisteil ausgewertet, die anderen 5 Fliegen wurden ebenfalls aufgrund unzuverlässiger Signale aus der Statistik herausgenommen (s.a. Kapitel 3.4.6.1.4).

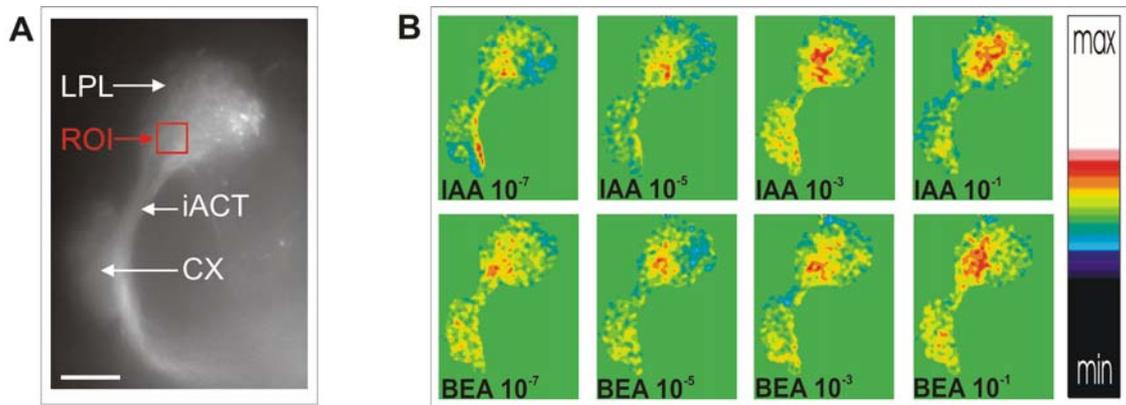
Für alle 8 ausgewerteten Fliegen wurden die zeitlichen Verläufe der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten, sowie die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster zur optischen Darstellung des Signals erstellt. Im Ergebnisteil wird exemplarisch die Messung einer IAA / BEA – Fliege (IAA / BEA – Fliege 1) und einer MCH / ETA – Fliege (MCH / ETA – Fliege 1) auszugsweise vorgestellt, und die gemittelten Daten aller 8 Fliegen präsentiert. Die vollständigen Messungen aller 8 Fliegen (IAA / BEA – Fliegen 1 bis 4, MCH / ETA – Fliegen 1 bis 4) befinden sich im Anhang (s.a. Kap. 9.2). Für alle Düfte der im Ergebnisteil exemplarisch dargestellten Einzelmessungen wurden Filme erstellt, die das evozierte Aktivitätsmuster räumlich und zeitlich darstellen. Die Filme sind unter den Pfad: "Filme / Exp\_olfaktorische Codierung / LPL" auf der beigefügten CD – ROM einsehbar.

#### **4.6.1 Exemplarische Messung einer Isoamylacetat / Benzaldehyd – und einer Methylcyclohexanol / Ethylacetat – Konzentrationsreihe**

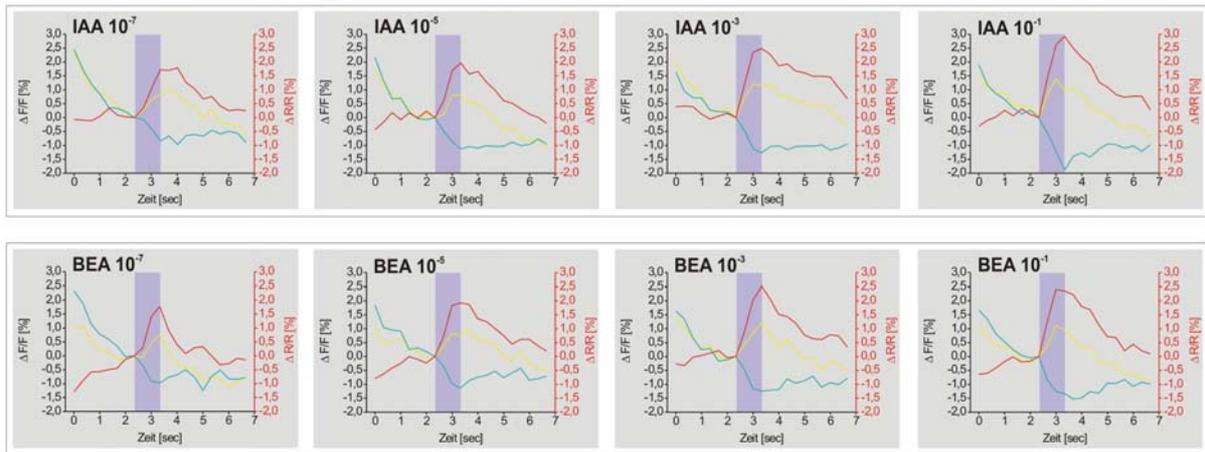
Abb. 4.13 zeigt exemplarisch die Messung einer IAA / BEA – Konzentrationsreihe im lateralen Protocerebrum der IAA / BEA – Beispielfliege (IAA / BEA – Fliege 1). Für die abgebildete Einzelmessung 1 wurden die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster erstellt. Sie zeigen sowohl für die Konzentrationserhöhung von Isoamylacetat (IAA) als auch für die Konzentrationserhöhung von Benzaldehyd (BEA) einen deutlichen Anstieg des

Calciumsignals und eine deutliche Erweiterung des auf den Duftstimulus reagierenden neuronalen Areal (Abb. 4.13 B). Das bedeutet, dass mit zunehmender Konzentration des applizierten Duftes, die neuronale Aktivität im lateralen Protocerebrum flächenmäßig und in ihrer Stärke ansteigt. Dies gilt auch für die exemplarisch dargestellte Messung der MCH / ETA – Fliege (MCH / ETA – Fliege 1, Abb. 4.14): Auch hier zeigen die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster der ETA – Konzentrationsreihe einen Anstieg in der Signalstärke und eine räumliche Ausdehnung des antwortenden neuronalen Areal mit zunehmender Duftkonzentration (Abb. 4.14 B). Im Vergleich zu den IAA – und BEA – Aktivitätsmuster scheinen hier die Signale jedoch insgesamt etwas geringer zu sein, ETA evoziert also scheinbar eine schwächere neuronale Aktivität im lateralen Protocerebrum. Die schwächsten Calciumantworten liefert jedoch die MCH – Konzentrationsreihe: Die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  zeigen keine neuronale Antwort, erst die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  evozieren schwache  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster, deren räumliche Ausdehnung und Signalstärke mit steigender Konzentration zunehmen. Für die zwei exemplarisch dargestellten Fliegen bedeutet das, dass bei zunehmender Duftkonzentration, die neuronale Aktivität im lateralen Protocerebrum flächenmäßig zunimmt – das aktivierte neuronale Areal weitet sich aus bei gleichzeitiger Signalverstärkung – und, dass verschiedene Düfte unterschiedlich starke neuronale Aktivität evozieren können. Diese Ergebnisse gelten auch für die restlichen 6 gemessenen Fliegen (s.a. Kap. 9.2).

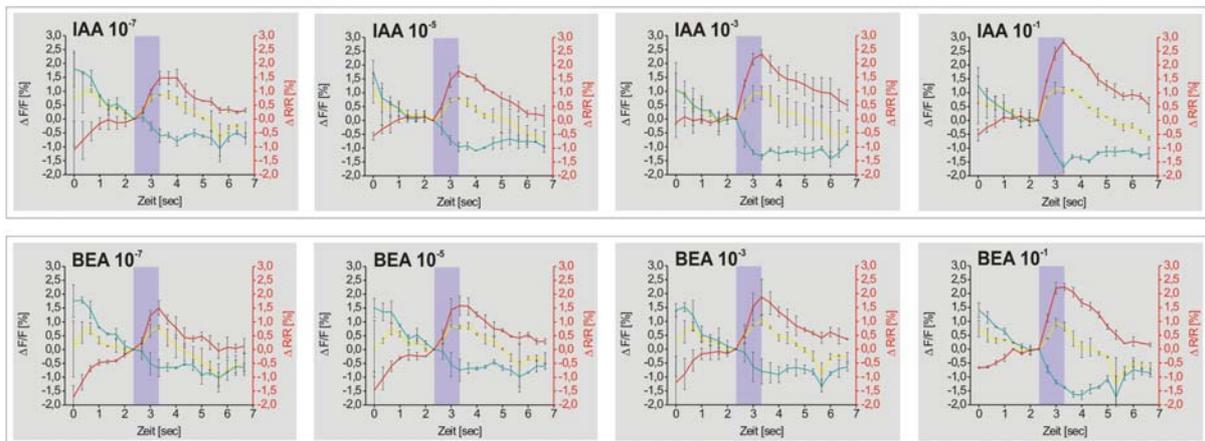
Um den Anstieg der neuronalen Aktivität zu quantifizieren, wurden die EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten innerhalb einer ROI im anterioren Bereich des lateralen Protocerbrums (Abb. 4.13 A und 4.14 A) berechnet. Die erhaltenen Zeitverläufe bestätigen die Aussage der  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster: Die Ratiographen für die Isoamylkonzentrationsreihe von IAA  $10^{-7}$  bis IAA  $10^{-1}$  zeigen einen starken Anstieg zwischen den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  und  $10^{-3}$ . Der Unterschied zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$ , sowie zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  ist geringer. Das maximale Signal wird bei Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  erreicht und beträgt ca. 3% (Abb. 4.13 C). In der Benzaldehydkonzentrationsreihe ist der Anstieg des Ratiosignals im Gegensatz zur Isoamylacetatskonzentrationsreihe über die 4 Verdünnungsstufen konstanter. Auch hier wird das maximale Signal bei Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  erreicht und beträgt ca. 2,5%. (Abb. 4.13 C). Wie erwartet zeigen die zeitlichen Verläufe für die Verdün –



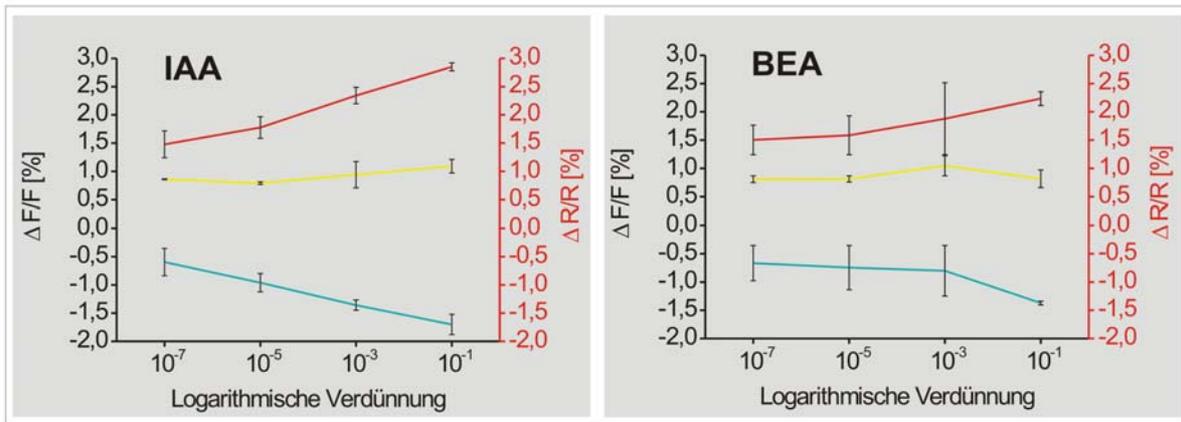
**C Einzelmessung**



**D Mittelwerte**



## E Übersicht



**Abb. 4.13** Exemplarische Darstellung einer Messung gegen den Isoamylacetat (IAA) – und Benzaldehyd (BEA) – Konzentrationsgradienten (IAA / BEA – Fliege 1)

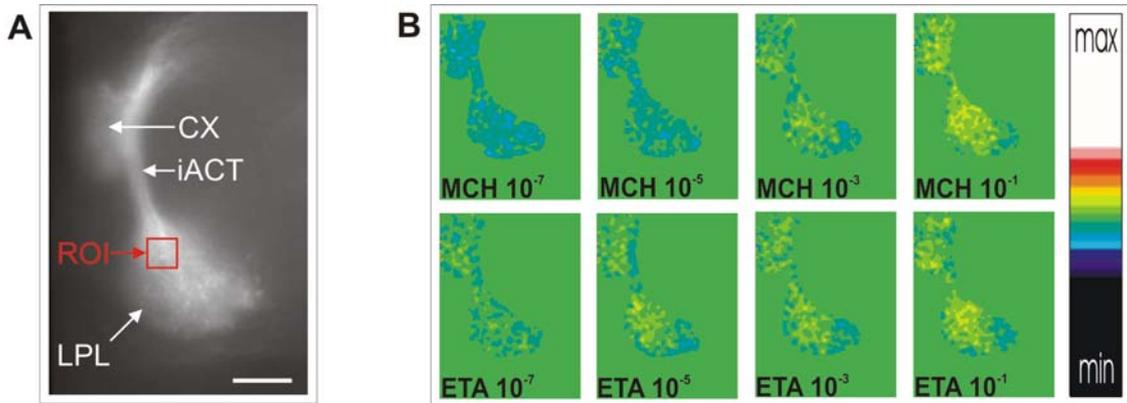
**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C** und **D** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25 $\mu$ m.

**B** Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster (Ratiosignal – Bilder) einer Einzelmessung. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

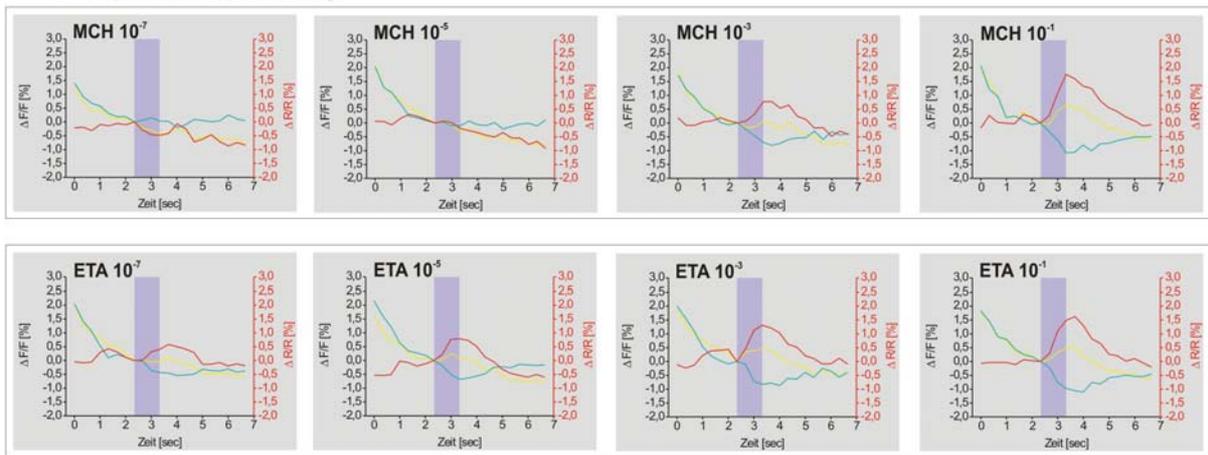
**C** Zeitlicher Verlauf einer Einzelmessung. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

**D** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 2.

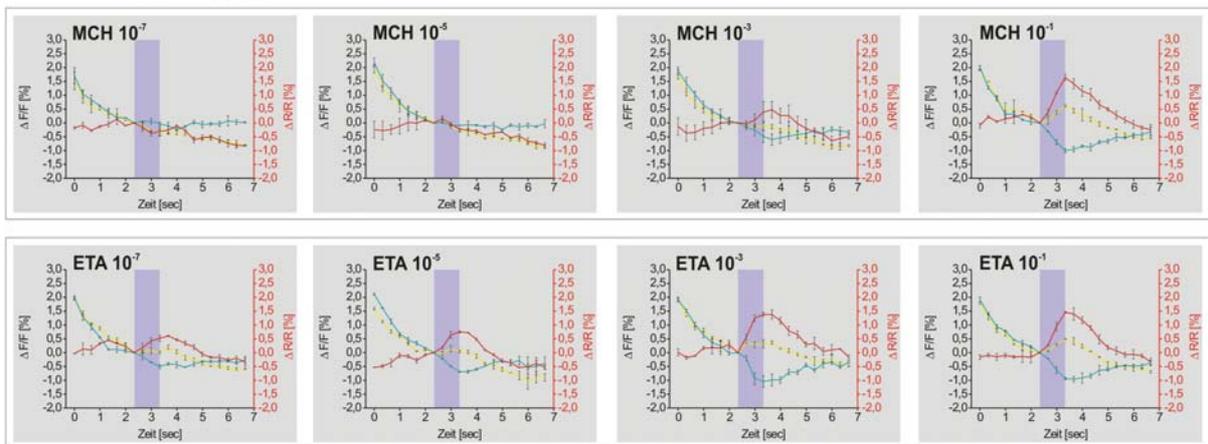
**E** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 1. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **D** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 2.



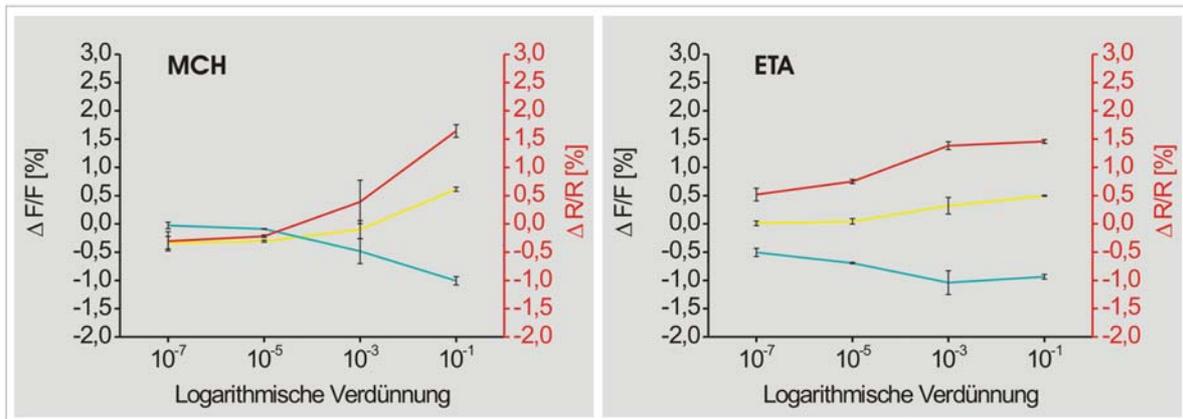
**C Einzelmessung**



**D Mittelwerte**



## E Übersicht



**Abb. 4.14** Exemplarische Darstellung einer Messung gegen den Methylcyclohexanol (MCH) – und Ethylacetat (ETA) – Konzentrationsgradienten ( MCH / ETA – Fliege 1)

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C** und **D** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

**B** Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster (Ratiosignal – Bilder) einer Einzelmessung. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C** Zeitlicher Verlauf einer Einzelmessung. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio - Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als ΔF/F [%] dargestellt, die Ratio als ΔR/R [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

**D** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als ΔF/F [%] dargestellt, die Ratio als ΔR/R [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 2.

**E** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 1. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **D** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 2.

nungsstufen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  der MCH – Konzentrationsreihe kein Calciumsignal: Zu Beginn des Duftstimulus zeigt die EYFP – Fluoreszenz keinen Anstieg und die ECFP – Fluoreszenz keine Reduktion, der resultierende Ratiograph bleibt flach. Die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  zeigen eindeutige Calciumsignale mit ansteigender EYFP – Fluoreszenz und gleichzeitig abfallender ECFP – Fluoreszenz. Das Signalmaximum wird für Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  erreicht und beträgt ca. 1,7% (Abb. 4.14 C). Im Gegensatz dazu, zeigt die ETA – Konzentrationsreihe für alle Verdünnungsstufen Calciumsignale. Mit zunehmender Duftkonzentration steigt die Signalstärke in Einzelmessung 1 von ca. 0,5% bei Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  bis auf 1,7% bei Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  an (Abb. 4.14 C).

Abb. 4.13 D und 4.14 D zeigen die arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen der dargestellten IAA / BEA – und MCH / ETA – Fliege (für beide exemplarisch dargestellten Tiere gilt: n (Einzelmessungen) = 2). Es wird deutlich, dass sich die gemittelten EYFP – ,ECFP – und Ratio – Intensitäten kaum von denen der Einzelmessung in Abb. 4.13 C und 4.14 C unterscheiden. Die Einzelmessungen liefern bei den jeweiligen Verdünnungsstufen also sehr ähnliche Signale. Dies verdeutlicht das hohe Maß an Reproduzierbarkeit der Einzelmessungen. Abgebildet ist der Standardfehler. Außerdem können die Graphen als Beweis für die Echtheit der Calciumsignale angenommen werden: Die Verdünnungsstufen beider Düfte evozieren Ratiosignale, die auf dem FRET – Effekt bei der Bindung von Calcium – Ionen an das Cameleon2.1 – Protein basieren; dabei steigt die EYFP – Fluoreszenz an, gleichzeitig sinkt die ECFP – Fluoreszenz ab.

Abb. 4.13 E und Abb. 4.14 E fassen die quantitativen Ergebnisse nochmals zusammen. Zur Erstellung der Diagramme wurden die EYFP –, ECFP – und Ratiomittelwerte aus Abb. 4.13 D bzw. 4.14 D zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Für die IAA / BEA – Beispielfliege gilt, dass beide Düfte in der Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  eine neuronale Aktivität im lateralen Protocerebrum evozieren können. Der gemittelte Ratiowert liegt hier bei ca. 1,5%. Die Isoamylacetatskonzentrationsreihe zeigt im weiteren Verlauf eine Steigerung des Calciumsignals, wobei die niedrigste Verdünnungsstufe,  $10^{-1}$ , den größten Ratiowert von ca. 3% erreicht (Abb. 4.13 E). Die Benzaldehydkonzentrationsreihe zeigt ebenfalls eine Steigerung des Calciumsignals, jedoch ist die Steigung der BEA – Kurve nicht so steil wie die der

IAA – Kurve. Das Maximum wird ebenfalls bei Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  erreicht, beträgt hier aber nur ca. 2,5% (Abb. 4.13 E). Im Gegensatz dazu, evoziert MCH in den Verdünnungsstufen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  keine messbare neuronale Aktivität; die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  produzieren schwache Signale von ca. 0,4% und 1,6%. ETA evoziert für alle Verdünnungsstufen Calciumsignale. Mit steigender Konzentration nimmt auch die Signalstärke zu. Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  zeigt ein Signal von 0,5%, Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  das Signalmaximum von 1,45%. Der Signalanstieg zwischen den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  und  $10^{-3}$  ist deutlich größer als zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$ , und zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$ .

Insgesamt zeigt die exemplarisch dargestellte Messung der IAA / BEA – Konzentrationsreihe, dass alle 4 Verdünnungsstufen beider Düfte, eine deutliche neuronale Aktivität im lateralen Protocerebrum der Fliege evozieren. Mit steigender Konzentration der Düfte, nimmt auch das Calciumsignal in der ausgewählten ROI zu. Dabei zeigt der Isoamylkonzentrationsgradient einen stärkeren Anstieg der Ratiowerte. Außerdem zeigt sich schon hier die Tendenz eines größeren Ratioanstiegs zwischen den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  und  $10^{-3}$  im Vergleich zu den Anstiegen zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$ , sowie zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$ . In der Benzaldehydkonzentrationsreihe ist der Anstieg des Calciumsignals über die 4 Verdünnungsstufen sehr viel konstanter. Die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster unterstützen die Ergebnisse der quantitativen Analyse und zeigen bei Konzentrationserhöhung für beide Düfte eine eindeutige räumliche Ausweitung des antwortenden neuronalen Areal. Die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster der IAA / BEA – Fliegen 2 – 4 zeigen dieselben Effekte (s.a. Anhang, Kapitel 9.2). Für die exemplarisch dargestellte Messung der MCH / ETA – Konzentrationsreihe gilt, dass die hohen MCH – Konzentrationen und alle 4 Verdünnungsstufen von ETA neuronale Aktivität evozieren können. Im Vergleich zur IAA / BEA – Messung, sind die Signale jedoch insgesamt schwächer. Mit steigender Konzentration der Düfte, nimmt auch hier das Calciumsignal in der ausgewählten ROI zu. Dabei zeigt der MCH – Konzentrationsgradient einen stärkeren Anstieg der Ratiosignale. Außerdem zeigt sich für ETA ein stärkerer Anstieg der Ratiowerte zwischen den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  und  $10^{-3}$ , im Vergleich zu den Anstiegen zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$ , sowie zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$ . Die abgebildeten  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster unterstützen die Ergebnisse der zeitlichen Verläufe: Bis auf die MCH – Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$  und

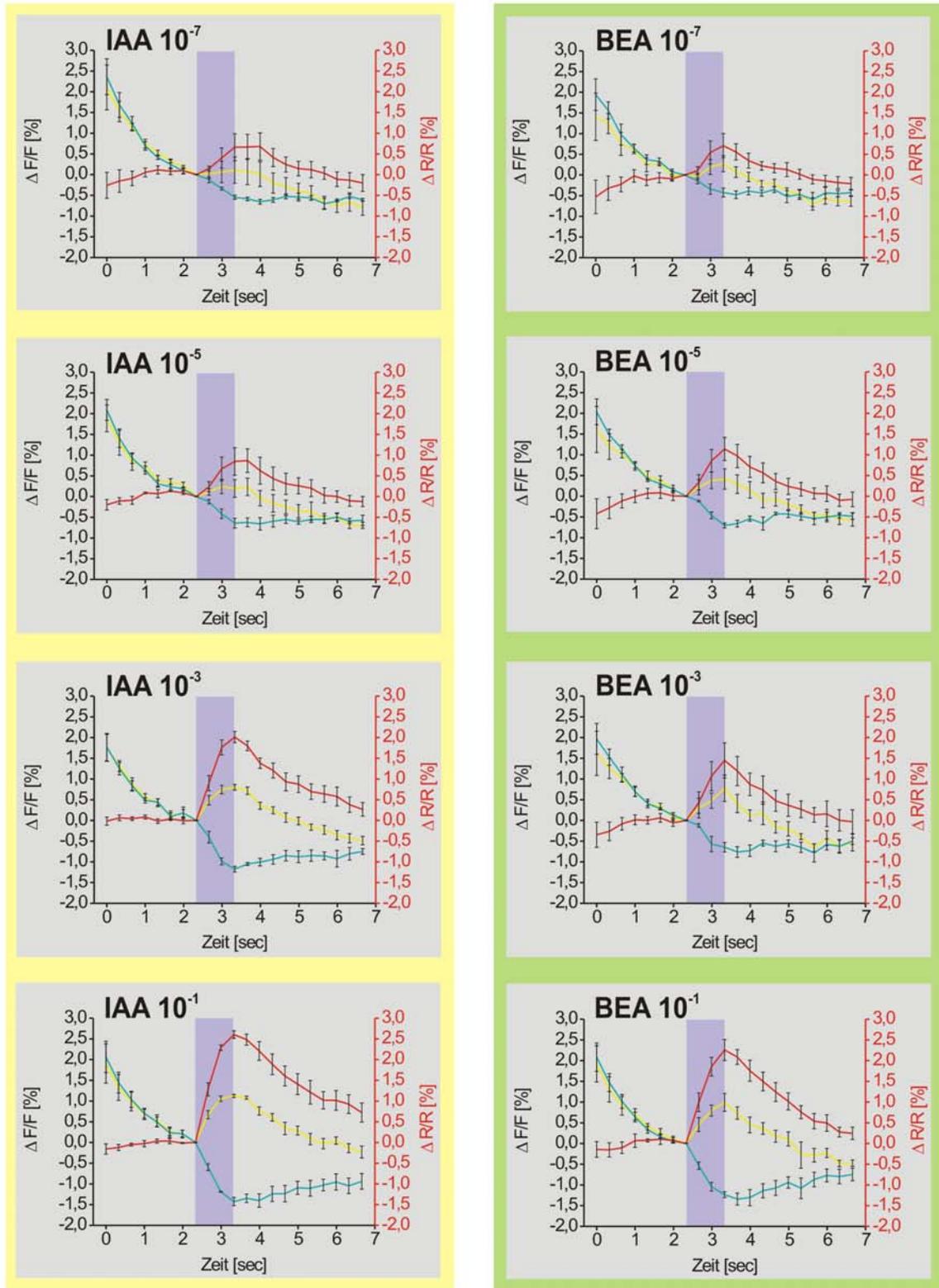
$10^{-5}$ , zeigen alle übrigen Muster eine eindeutige räumliche Ausweitung des antwortenden neuronalen Areal bei steigender Duftkonzentration. Die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster der MCH / ETA – Fliegen 2 – 4 zeigen ebenfalls eine räumliche Ausweitung des Ratiosignals bei Konzentrationserhöhung (s.a. Anhang, Kapitel 9.2). Räumliche Unterschiede in den neuronalen Aktivitätsmuster der 4 getesteten Düfte konnten nicht nachgewiesen werden, d.h. ein duftspezifischer, räumlicher neuronaler Code der für die Identität der einzelnen Düfte steht, konnte nicht gefunden werden.

#### **4.6.2 Quantitative Analyse aller Isoamylacetat / Benzaldehyd – und Methylcyclohexanol / Ethylacetat – Konzentrationsreihen**

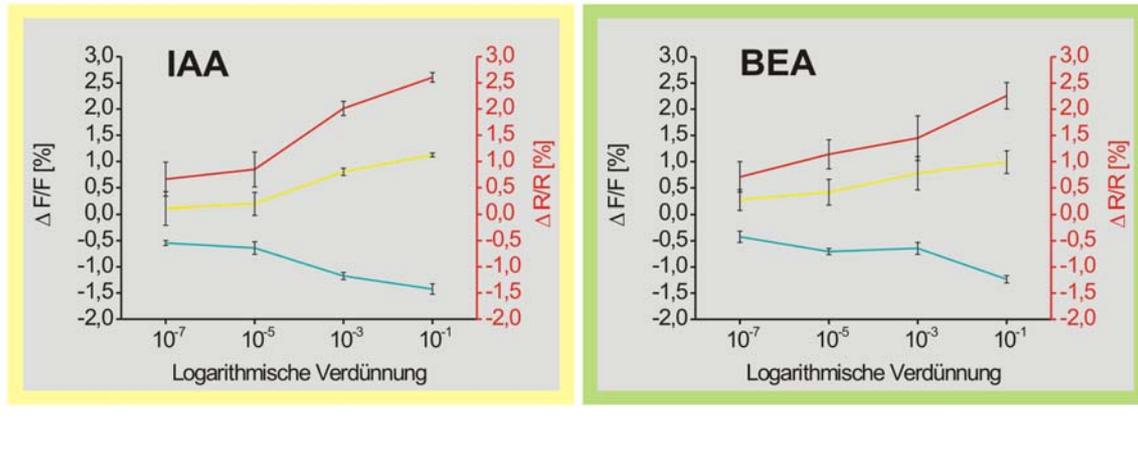
Abb. 4.15 und 4.16 fassen die Messungen von allen 8 ausgewerteten Fliegen zusammen. Zur Erstellung der Graphen wurde aus den arithmetischen EYFP –, ECFP – und Ratiomittelwerten der 8 einzelnen Fliegen erneut das arithmetische Mittel berechnet [ $n$  (IAA / BEA – Fliegen) = 4;  $n$  (MCH / ETA – Fliegen) = 4]. Die Graphen veranschaulichen also den gemittelten zeitlichen Verlauf der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten von allen 4 IAA / BEA (Abb. 4.15) – und allen 4 MCH / ETA – Fliegen (Abb. 4.16). Die ROI lag für alle Messungen im anterioren Bereich des lateralen Protocerbrums.

Der in Abb. 4.15 A abgebildete Standardfehler verdeutlicht, dass sich die gemittelten EYFP –, ECFP – und Ratiowerte der gemessenen Fliegen kaum von denen der Einzelfliegen unterscheiden (s.a. Anhang, Kapitel 9.2: Vollständige Messungen der restlichen Fliegen). Dies verdeutlicht das hohe Maß an Reproduzierbarkeit der Einzelmessungen innerhalb der jeweiligen Fliege und zwischen den 4 IAA / BEA – Fliegen. Für die 4 IAA / BEA – Fliegen zeigt sich auch hier, dass alle Verdünnungsstufen der beiden Düfte echte Calciumsignale evozieren, wobei das Calciumsignal mit steigender Konzentration stärker wird (Abb. 4.15 A). Der in Abb. 4.16 A abgebildete Standardfehler verdeutlicht, dass die Schwankungen in den Messungen der 4 MCH / ETA – Fliegen größer sind, als die der 4 IAA / BEA – Fliegen. Die Hauptursache liegt in der stärkeren Bewegung des Fliegengehirns bei den MCH / ETA – Fliegen (s.a. Anhang, Kapitel 9.2: Einzelmessungen der restlichen MCH / ETA – Fliegen). Dennoch bestätigt sich nach der Mittelwertbildung, dass die Calciumsignale auf die verschiedenen Verdünnungsstufen der beiden Düfte zu

### A Mittelwerte



## B Übersicht

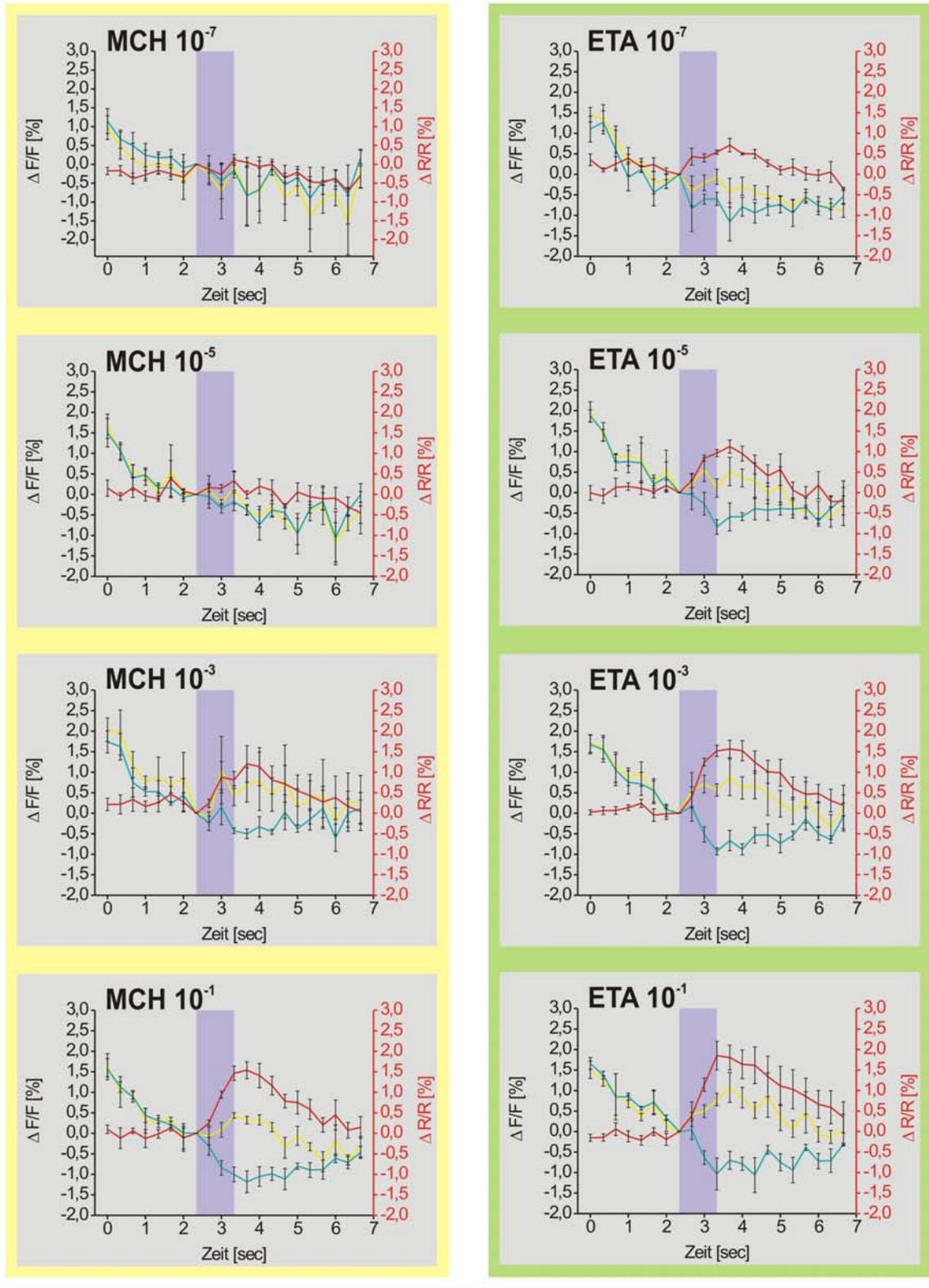


**Abb. 4.15** Arithmetische Mittelwerte der 4 IAA / BEA - Fliegen

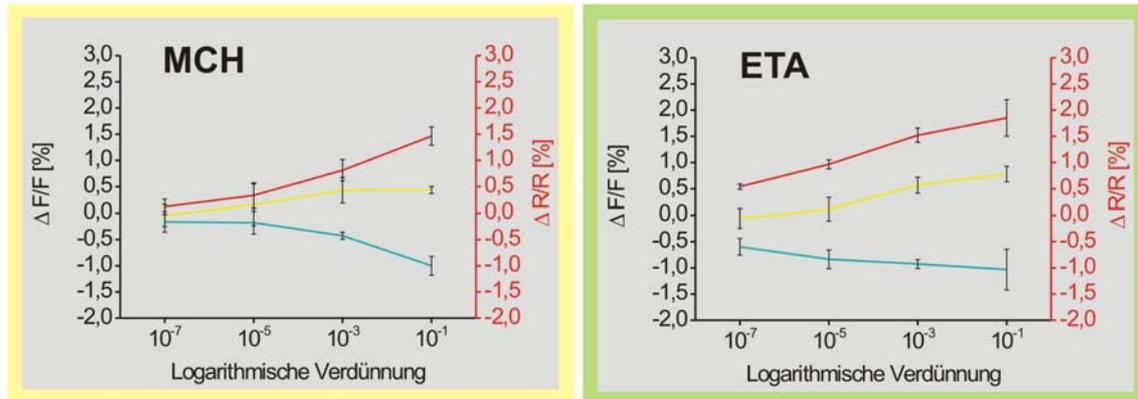
**A** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller IAA / BEA – Fliegen. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratiomittelwerte (rot) für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Isoamylacetat (IAA, gelb hinterlegt) und Benzaldehyd (BEA, grün hinterlegt). Die EYFP – und ECFP – Graphen sind als ΔF/F [%] dargestellt, die Ratio als ΔR/R [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Fliegen) = 4.

**B** Übersicht über die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratiomittelwerte (rot) aller IAA / BEA – Fliegen. Zur Erstellung der Diagramme wurden die EYFP –, ECFP – und Ratiomittelwerte aus Abb. **A** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Fliegen) = 4.

### A Mittelwerte



## B Übersicht



**Abb. 4.16** Arithmetische Mittelwerte der 4 MCH / ETA – Fliegen

**A** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller MCH / ETA - Fliegen. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratiomittelwerte (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Methylcyclohexanol (MCH, gelb hinterlegt) und Ethylacetat (ETA, grün hinterlegt). Die EYFP – und ECFP – Graphen sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Fliegen) = 4.

**B** Übersicht über die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratiomittelwerte (rot) für alle MCH / ETA - Fliegen. Zur Erstellung der Diagramme wurden die EYFP –, ECFP – und Ratiomittelwerte aus Abb. **A** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Fliegen) = 4.

einem hohen Maß reproduzierbar sind. Es zeigt sich, dass alle Verdünnungsstufen der beiden Düfte neuronale Aktivität evozieren, wobei die Calciumsignale mit steigender Konzentration stärker werden. Im Gegensatz zur exemplarisch dargestellten MCH / ETA – Fliege 1, zeigen die gemittelten Graphen für die MCH – Verdünnungsstufen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  auch schwache Ratiosignale, die mit steigender Konzentration größer werden. Jedoch sind die Mittelwerte bei  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  nicht signifikant von Null verschieden, so dass man hier kein eindeutiges Calciumsignal annehmen darf.

Abb. 4.15 B und Abb. 4.16 B fassen die quantitativen Messungen aller 4 getesteten IAA / BEA – Fliegen bzw. aller 4 MCH / ETA – Fliegen nochmals zusammen. Zur Erstellung der Diagramme wurden die EYFP –, ECFP – und Ratiomittelwerte aus Abb. 4.15 A bzw. 4.16 A zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abb. 4.15 B zeigt, dass sowohl IAA als auch BEA in der Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  eine Erhöhung der Ratio von ca. 0,7% evozieren. Die IAA – Konzentrationsreihe erfährt im weiteren Verlauf eine kontinuierliche Erhöhung der Ratiowerte. Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  evoziert die stärkste neuronale Aktivität, die Ratio – Zunahme beträgt hier ca. 2,6%. Die BEA – Konzentrationsreihe induziert ebenfalls eine Erhöhung der neuronalen Aktivität, jedoch ist die Steigung der BEA – Kurve weniger steil als die der IAA – Kurve. Das Maximum wird ebenfalls bei Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  erreicht, beträgt hier aber nur ca. 2,25%. Die Ratiokurve der IAA – Konzentrationsreihe zeigt einen starken Anstieg zwischen den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  und  $10^{-3}$ . Die Ratiodifferenz zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$ , sowie zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  ist geringer. In der BEA – Konzentrationsreihe ist der Anstieg der Ratiowerte über die 4 Verdünnungsstufen kontinuierlicher. Sie zeigt dafür im hohen Konzentrationsbereich der Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  deutlich niedrigere Werte als die IAA – Kurve. Die in Abb. 4.16 B dargestellte MCH – Kurve zeigt bei den niedrigen Verdünnungsstufen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  die schwachen und nicht eindeutigen Calciumsignale. Insgesamt zeigt sich für den MCH – Konzentrationsgradienten ein kontinuierlicher Anstieg der Ratiowerte mit einer maximalen Zunahme um ca. 1,5% bei Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ . Die ETA – Kurve zeigt für alle Verdünnungsstufen ein Calciumsignal und hat nach dem Mitteln der 4 Fliegen ebenfalls einen kontinuierlichen, fast linearen Anstieg. Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  evoziert eine schwache neuronale Aktivität in der ausgewählten ROI im lateralen Protocerebrum, die Änderung der Ratio EYFP / ECFP beträgt hier ca. 0,5%, das

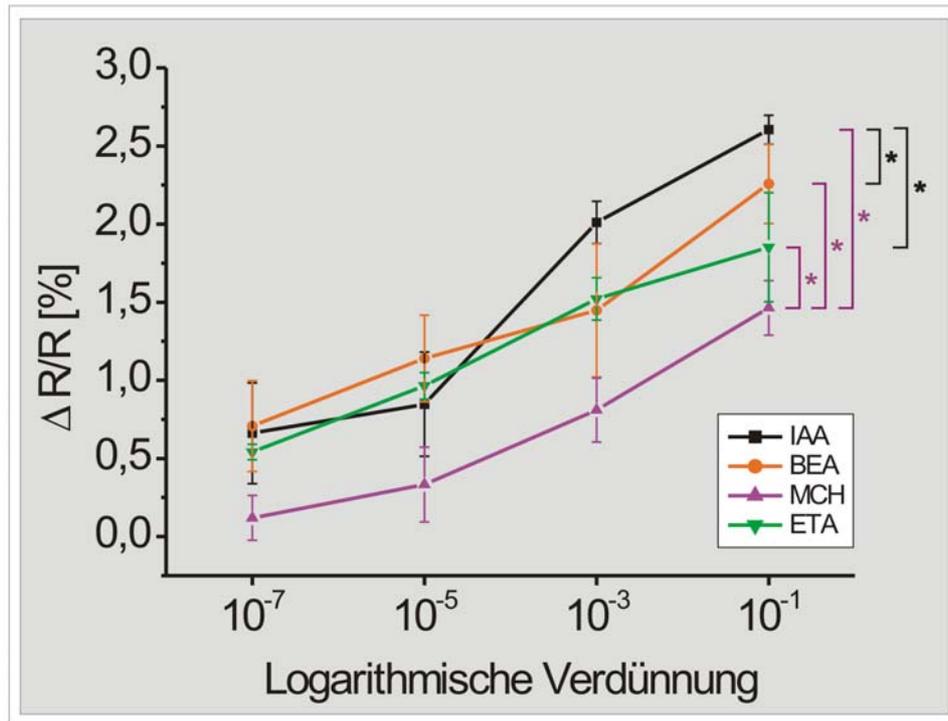
Maximum wird bei  $10^{-1}$  mit einem Signal von ca. 1,9% erreicht. Die statistische Auswertung der quantitativen Analyse aller 8 gemessenen Fliegen erfolgt in Kapitel 4.6.3.

### 4.6.3 Statistische Auswertung und Zusammenfassung

Zur vergleichenden Darstellung der statistischen Auswertung wurden die Ratiowerte der 4 IAA / BEA – Fliegen und der 4 MCH / ETA – Fliegen in Abb. 4.17 zusammengefasst. Sie zeigt die Ratiographen für die 4 getesteten Düfte Isoamylacetat (IAA), Benzaldehyd (BEA), Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die Graphen entsprechen den Ratiographen in Kapitel 4.6.2, Abb. 4.15 B und Abb. 4.16 B. Jeder Graph stellt also den arithmetischen Mittelwert der 4 Ratiographen der gemessenen Einzelfliegen dar [ $n$  (Fliegen) = 4]. Die Ratiowerte entsprechen dem Messzeitpunkt 3,33 Sek.

Die MCH – Kurve ist über den gesamten Verdünnungsbereich hinweg signifikant unterschiedlich zu den Kurven der 3 Düfte ETA, BEA und IAA. (t – test, two populations, paired: MCH / ETA:  $p = 0,00644$ , MCH / BEA:  $p = 0,00102$ , MCH / IAA:  $p = 0,01917$ .  $p < 0,05 =$  signifikant unterschiedlich). Die ETA –, BEA – und IAA – Kurven zeigen über den gesamten Verdünnungsbereich hinweg keinen signifikanten Unterschied. Für alle 4 Graphen gilt jedoch, dass mit steigender Konzentration der Düfte auch die Ratiowerte ansteigen und, dass MCH über den gesamten Verdünnungsbereich die schwächsten Ratiowerte evoziert. Betrachtet man nur die hohen Duftkonzentrationen, ergeben sich signifikante Unterschiede für die IAA – Verdünnungsstufen  $10^{-3} + 10^{-1}$  gegen die Verdünnungsstufen  $10^{-3} + 10^{-1}$  von BEA und ETA (t – test, two populations, paired: IAA  $10^{-3} + 10^{-1}$  / BEA  $10^{-3} + 10^{-1}$ :  $p = 0,0494$ , IAA  $10^{-3} + 10^{-1}$  / ETA  $10^{-3} + 10^{-1}$ :  $p = 0,00917$ .  $p < 0,05 =$  signifikant unterschiedlich). IAA evoziert in den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  also die stärksten Calciumsignale. Zwischen BEA und ETA besteht in diesem hohen Konzentrationsbereich kein signifikanter Unterschied.

Nach Parallelverschiebung der IAA – Kurve um eine Verdünnungsstufe nach rechts, ergab sich kein signifikanter Unterschied für BEA  $10^{-3} + 10^{-1}$  und ETA  $10^{-3} + 10^{-1}$  getestet gegen IAA  $10^{-5} + 10^{-3}$  (Werte, die nach der Verschiebung auf den Verdün –



**Abb. 4.17** Ratiowerte für die 4 getesteten Düfte Isoamylacetat (IAA, schwarz), Benzaldehyd (BEA, orange), Methylcyclohexanol (MCH, lila), Ethylacetat (ETA, grün) und statistische Auswertung

Es sind die Ratiowerte der 4 IAA / BEA – Fliegen und der 4 MCH / ETA – Fliegen für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  zusammengefasst. Jeder Graph stellt den arithmetischen Mittelwert aus den 4 Ratiographen der Einzelfliegen dar.  $n$  (Fliegen) = 4. Die Ratiowerte entsprechen dem Messzeitpunkt 3,33 Sek.

Die MCH – Kurve sind über den gesamten Verdünnungsbereich hinweg signifikant unterschiedlich zu den ETA –, BEA – und IAA – Kurven. (t – test, two populations, paired: MCH / ETA:  $p = 0,00644$ , MCH / BEA:  $p = 0,00102$ , MCH / IAA:  $p = 0,01917$ .  $p < 0,05$  = signifikant unterschiedlich, gekennzeichnet durch lila Klammer + Stern). Signifikante Unterschiede bestehen weiterhin zwischen den IAA – Verdünnungsstufen  $10^{-3} + 10^{-1}$  und den Verdünnungsstufen  $10^{-3} + 10^{-1}$  von BEA und ETA (t – test, two populations, paired: IAA  $10^{-3} + 10^{-1}$  / BEA  $10^{-3} + 10^{-1}$ :  $p = 0,0494$ , IAA  $10^{-3} + 10^{-1}$  / ETA  $10^{-3} + 10^{-1}$ :  $p = 0,00917$ .  $p < 0,05$  = signifikant unterschiedlich, gekennzeichnet durch schwarze Klammer + Stern).

nungsstufen  $10^{-3} + 10^{-1}$  zum Liegen kommen). Die Parallelverschiebung resultiert in eine Überführung der IAA – Kurve in die Kurven von ETA und BEA, d.h. es liegt keine Duftspezifität von IAA bei den hohen Konzentrationen (Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$ ) vor.

### Zusammenfassung:

Die durchgeführten Experimente zur olfaktorischen Codierung belegen eindeutig, dass sich durch *in vivo* Imaging im lateralen Protocerebrum von homozygoten Cameleon 2.1/82 – GH146 – Tieren für alle Verdünnungsstufen der 4 verwendeten

Düfte Isoamylacetat, Benzaldehyd, Methylcyclohexanol und Ethylacetat, eindeutige Calciumsignale nachweisen lassen (s.a. Anhang, Kapitel 9.2: Graphen für Einzelmessungen der 8 ausgewerteten Fliegen). Steigende Duftkonzentrationen evozieren eine räumliche Ausdehnung der messbaren Aktivität in den Neuronen des lateralen Protocerebrums (s.a. Anhang, Kapitel 9.2:  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster für je eine Einzelmessung der 8 ausgewerteten Fliegen). Die EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten, die aus einer ROI (region of interest) im anterioren Bereich des lateralen Protocerebrums berechnet werden, zeigen weiterhin, dass mit steigender Duftkonzentration auch die Stärke des Calciumsignals in den Neuronen zunimmt. Dabei gibt es zwischen den 4 verschiedenen Düften statistisch signifikante Unterschiede: Methylcyclohexanol evoziert über den gesamten Verdünnungsbereich die schwächste neuronale Aktivität. Isoamylacetat evoziert in den beiden Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  die stärksten intrazellulären Calciumsignale (Abb. 4.17). Die olfaktorischen Projektionsneurone von *Drosophila* übermitteln also den duftspezifischen glomerulären Code nicht nur an den Calyx, sondern auch an den Eingangsbereich des lateralen Protocerebrums. Dabei sind sie in der Lage unterschiedliche Duftkonzentrationen zu codieren und diese Information an das laterale Protocerebrum weiterzugeben. Mit der verwendeten Datenauswertung ist es jedoch nicht möglich eine duftspezifische räumliche Repräsentation der 4 verschiedenen Düfte im lateralen Protocerebrum zu erkennen. Die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmustern stellen sich zu einheitlich dar (s.a. Anhang, Kapitel 9.2). Ein Problem kann die Fenstergröße der zur Erstellung der  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster eingesetzten Median – und Low Pass – Filter sein: Da beide Filter mit recht großen Fenstern (Median Filter = 6 x 6 Pixel – Fenster; Low Pass – Filter = 4 x 4 Pixel – Fenster) arbeiten, werden die entstehenden Ratiosignale in den Aktivitätsmustern zwar räumlich eindeutiger dargestellt, jedoch geht dies auf Kosten der Auflösung. D.h. kleine neuronale Areale oder Einheiten in der Größenordnung von wenigen Pixeln, die evtl. duftspezifisch aktiviert werden, können so im Aktivitätsmuster verloren gehen und stehen folglich für eine Analyse duftspezifischer neuronaler Muster im lateralen Protocerebrum nicht mehr zur Verfügung. Damit kann im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, ob die Duftidentität im lateralen Protocerebrum in räumlich unterschiedlichen neuronalen Mustern codiert ist. Zukünftige Experimente mit evtl. verbesserter Datenauswertung können diese Fragestellung jedoch erneut angehen.

#### 4.6.4 Rauschen in den $\text{Ca}^{2+}$ – Aktivitätsmustern

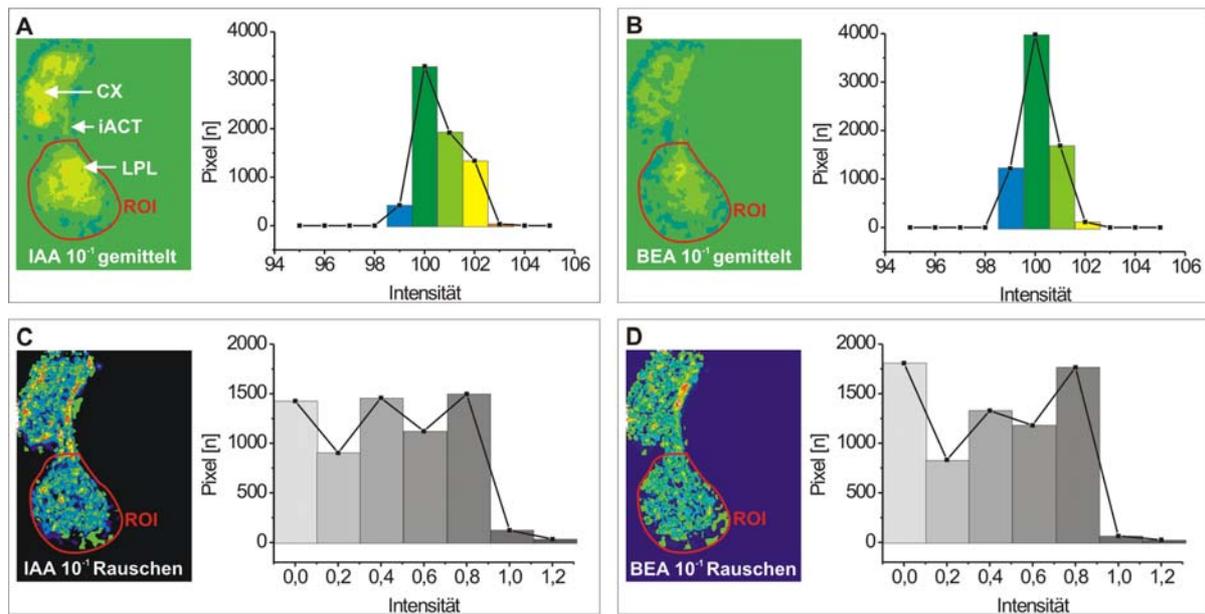
Wie bereits in Kapitel 3.4.3 erklärt, besitzt die CCD – Kamera der Imaging – Apparatur ein thermisches Rauschen. Man spricht auch von einem “Dunkelsignal“, weil der CCD – Chip ein “Phantombild“ (Rauschmuster) erzeugen kann, ohne dass Photonen auf den Chip getroffen sind. Das passiert in geringem Maß bei jedem Bild, das von der Kamera gemacht wird: Durch Wärme bilden sich Elektronen, die sich mit den Elektronen der eigentlichen Bildinformation vermischen. Durch Abkühlen der elektronischen Baugruppen der Kamera lässt sich dieses thermische Rauschen jedoch deutlich reduzieren. Ebenso wie die CCD – Kamera, zeigt auch die Lichtquelle der Imaging – Apparatur eine Art Rauschen: Das Anregungslicht besitzt nur in erster Näherung eine konstante Wellenlänge. Ganz genau betrachtet, schwankt die Anregungswellenlänge minimal, sodass die vom Cameleon 2.1 – Protein emittierte Fluoreszenz ebenfalls minimale Intensitätsschwankungen aufweisen kann. Beide aufgeführten Arten des Rauschens sind jedoch vernachlässigbar.

Bei den für diese Arbeit aufgeführten Experimenten existiert noch eine weitere Form des Rauschens, die bedeutend relevanter ist. Gemeint ist hier die Variabilität zwischen den Messungen, d.h. Einflüsse auf die Konsistenz des Messvorgangs. Wiederholt man beispielsweise fünfmal eine Messung mit dem gleichen Duft, so sollten die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster (Ratiosignal – Bilder) für alle 5 Messungen gleich sein (bei Ausschluss von physiologischen Adaptionereignissen). Nun gibt es verschiedene Faktoren, die die Konsistenz solcher Messungen nachhaltig beeinflussen können: Der Calciumsensor bleicht aus, d.h. die Calciumsignale werden von Messung zu Messung schwächer. Um dies zu umgehen, wurde in den Experimenten dieser Arbeit immer ein 2 – Minuten – Fenster ohne Fluoreszenzanregung zwischen den einzelnen Messungen eingehalten, damit sich der Sensor erholen kann. Die Fitness des gemessenen Tieres ändert sich. Der Effekt könnte auch hier eine Abnahme der neuronalen Aktivität über die 5 Messungen hinweg sein. Ein weiterer Faktor kann eine konstante Lageveränderung des gemessenen Gehirnareals sein. Um den Einfluss solcher Faktoren möglichst gering zu halten, wurden die analysierten Tiere nach den in Kapitel 3.4.6.1.4 beschriebenen Kriterien ausgewählt. Trotzdem muss für die in diese Arbeit dargestellten  $\text{Ca}^{2+}$  –

Aktivitätsmuster (Ratiosignal – Bilder) noch abgeschätzt werden, wie stark sich die duftinduzierten Calciumsignale vom Rauschen der Messung abheben (Signal – zu – Rausch – Abschätzung).

Zur exemplarischen Berechnung des Rauschens wird eine Fliege verwendet, die fünfmal gegen die Isoamylacetat (IAA) – und Benzaldehyd (BEA) – Konzentrationsreihe getestet wurde. Um die Konsistenz der Messungen nachzuweisen, werden nur die  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster (Ratiosignal – Bilder) von Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  benötigt. In einem ersten Schritt addiert man in *MetaMorph* die 5  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster, die aus den 5 einzelnen IAA  $10^{-1}$  – Messungen resultieren und teilt das entstehende Bild durch 5. So erhält man ein Mittelwert – Bild des Aktivitätsmusters für IAA bei Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  (Abb. 4.18 A). In gleicher Art und Weise kann man ein Mittelwert – Bild des Aktivitätsmusters für BEA bei Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  erhalten (Abb. 4.18 B). Die Histogramme in Abb. 4.18 A und B spiegeln die Intensitätsverteilung der Pixel in den beiden gemittelten Aktivitätsmustern von IAA  $10^{-1}$  und BEA  $10^{-1}$  wider (Bildtiefe der Aktivitätsmuster = 8 Bit, d.h. 256 mögliche Intensitätsstufen). Die Histogramme wurden aus einer ROI berechnet, die das gesamte laterale Protocerebrum einschließt (Abb. 4.18 A und B). Da zur Erstellung der 5 einzelnen Aktivitätsmuster, aus denen das gemittelte Bild errechnet wurde, 100 addiert wurde [ $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster (= Ratiobild während Duftstimulus minus Ratiobild vor Duftstimulus plus 100, s.a. Kapitel 3.4.6.1.2)], stellen alle Pixel mit der Intensität 100 kein Calciumsignal dar. Die Pixel in den gemittelten Aktivitätsmustern mit Intensitäten  $> 100$  stehen also für das Calciumsignal. Für das gemittelte Aktivitätsmuster von IAA  $10^{-1}$  gilt, dass die meisten Pixel eine Intensität von 100 besitzen. Das gleiche gilt für das gemittelte Aktivitätsmuster von BEA  $10^{-1}$  und dem dazugehörigen Histogramm (Abb. 4.18 B). Im gemittelten  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster von BEA  $10^{-1}$  ist die Anzahl der Pixel mit Intensitäten  $> 100$  geringer, d.h. im Vergleich zum gemittelten IAA  $10^{-1}$  – Aktivitätsmuster, spiegelt es ein schwächeres Calciumsignal im lateralen Protocerebrum wider.

In einem zweiten Schritt kann nun das Rauschen für die 5 IAA  $10^{-1}$  – und BEA  $10^{-1}$  – Messungen aus den gemittelten Aktivitätsmustern berechnet werden: Bildet man den Betrag der Subtraktion von gemitteltem IAA  $10^{-1}$  – Aktivitätsmuster minus dem Aktivitätsmuster einer der 5 IAA  $10^{-1}$  – Einzelmessungen, so resultiert daraus ein Bild



**Abb. 4.18** Exemplarische Darstellung des Rauschens in den  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmustern

**A** Aus 5 Einzelmessungen gemitteltes  $\text{IAA } 10^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster (Bild: 8 Bit = 256 Intensitätsstufen) und Histogramm für die Intensitätsverteilung der Pixel in der ROI. Pixel mit Intensitätswerten  $> 100$  stellen Calciumsignale dar. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt.

**B** Aus 5 Einzelmessungen gemitteltes  $\text{BEA } 10^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster (Bild: 8 Bit = 256 Intensitätsstufen) und Histogramm für die Intensitätsverteilung der Pixel in der ROI. Pixel mit Intensitätswerten  $> 100$  stellen Calciumsignale dar. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt.

**C**  $\text{IAA } 10^{-1}$  – Rauschenbild (10 Bit) und Histogramm für die Intensitätsverteilung der Pixel in der ROI. Zur besseren optischen Darstellung zeigt das Bild die Addition der Rauschenbilder der 5  $\text{IAA } 10^{-1}$  – Einzelmessungen, also das “5 – fache“ Rauschen. Die Intensitätswerte der Pixel in der ROI werden vor dem Auftragen im Histogramm durch 5 dividiert um den Mittelwert, also das exakte Rauschen, über alle 5 Messungen zu erhalten. Das Rauschen der 8 Bit  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster liegt innerhalb eines Pixels.

**D**  $\text{BEA } 10^{-1}$  – Rauschenbild (10 Bit) und Histogramm für die Intensitätsverteilung der Pixel in der ROI. Zur besseren optischen Darstellung zeigt das Bild die Addition der Rauschenbilder der 5  $\text{BEA } 10^{-1}$  – Messungen, also das “5 – fache“ Rauschen. Die Intensitätswerte der Pixel in der ROI werden vor dem Auftragen im Histogramm durch 5 dividiert um den Mittelwert, also das exakte Rauschen, über alle 5 Messungen zu erhalten. Das Rauschen der 8 Bit  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster liegt auch hier innerhalb eines Pixels.

, das nur noch das Rauschen für diese Einzelmessung beinhaltet (die Calciumsignale die im Aktivitätsmuster der Einzelmessung vorhanden waren, werden vom gemittelten Aktivitätsmuster subtrahiert; nur der Betrag wird verwendet, damit keine negativen Zahlen auftreten). Zieht man alle 5 Aktivitätsmuster der  $\text{IAA } 10^{-1}$  – Einzelmessungen vom gemittelten Aktivitätsmuster ab und addiert die Beträge, erhält

man eine Abbildung, in dem die 5 Bilder, die das jeweilige Rauschen der Einzelmessung darstellen, zu einem Bild addiert wurden (Formel 1).

$$\text{Rauschen – Bild} = |\text{gem. CaAM} - \text{CaAM 1}| + |\text{gem. CaAM} - \text{CaAM 2}| + |\text{gem. CaAM} - \text{CaAM 3}| + |\text{gem. CaAM} - \text{CaAM 4}| + |\text{gem. CaAM} - \text{CaAM 5}|$$

**Formel 1**

CaAM = Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster

gem. = gemittelt

1 – 5 = Einzelmessungen 1 - 5

Den Betrag einer Bildsubtraktion erhält man durch die Addition der Subtraktionsergebnisse von gemitteltem Ratiosignal – Bild mit Ratiosignal – Bild n und Ratiosignal – Bild n mit gemitteltem Ratiosignal – Bild, da negative Bildpunkte vom Bildarithmetikprogramm (hier *MetaMorph*) auf Null gesetzt werden.

$$|\text{gem. CaAM} - \text{CaAM n}| = (\text{gem. CaAM} - \text{CaAM n}) + (\text{CaAM n} - \text{gem. CaAM})$$

**Formel 2**

In Abb. 4.18 C und D sind die Bilder für das addierte Rauschen von IAA 10<sup>-1</sup> und BEA 10<sup>-1</sup> dargestellt. Wichtig ist, dass die Bilder das “5 – fache“ Rauschen darstellen! Normalerweise muss man diese Bilder noch durch 5 dividieren, damit das gemittelte Rauschen für die 5 Einzelmessungen herauskommt. Zur besseren optischen Darstellung wurde jedoch darauf verzichtet. In beiden Bildern wird deutlich, dass das Rauschen über das gesamte Areal des lateralen Protocerebrums verteilt ist. Um das abgebildete Rauschen zu quantifizieren, wird auch in diesen Bildern eine ROI um das komplette laterale Protocerebrum gelegt (Abb. 4.18 C und D). Aus den ROIs der 5 – fach Rauschen – Bilder von IAA 10<sup>-1</sup> und BEA 10<sup>-1</sup> werden die Intensitätsverteilungen der Pixel errechnet und danach durch 5 geteilt. Durch die Division mit 5 erhält man die Werte für das gemittelte Rauschen. Die Histogramme in 4.18 C und D stellen also die Verteilung der Pixelintensitäten für das Rauschen dar:

Für beide Düfte liegt das berechnete Rauschen zwischen 0 und 0,8. Da aber nur ganzzahlige Intensitätsstufen in den Bildern darstellbar sind, liegt das Rauschen der 8 Bit  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster innerhalb einer Pixelintensitätsstufe. D.h. wie bereits bei der Erstellung der  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster angenommen, können alle Pixel mit Intensitätsstufen  $> 100$  als Ratiosignal angesehen werden. Die Intensitätsstufe 100 selbst beinhaltet das Rauschen. Vergleicht man die Histogramme der gemittelten  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster von IAA  $10^{-1}$  und BEA $10^{-1}$  in 4.1 mit den Histogrammen des gemittelten Rauschens der IAA  $10^{-1}$  und BEA $10^{-1}$  – Messungen wird klar, dass viele Pixel eines Aktivitätsmusters das Rauschen darstellen (Pixel mit Intensitäten = 100, Abb. 4.18 A und B) und, dass sich die duftvezierten Calciumsignale (Pixel mit Intensitäten  $> 100$ , Abb. 4.18 A und b) deutlich vom Rauschen abheben (Rauschen liegt für die Messungen beider Düfte innerhalb einer Pixelintensitätsstufe, Abb. 4.18 C und D). Das bedeutet, dass die 5 IAA  $10^{-1}$  – und die 5 BEA $10^{-1}$  – Einzelmessungen konsistent sind. Für die gesamte Arbeit gilt, dass die dargestellten  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster echte Calciumsignale zeigen, die sich deutlich vom messimanten Rauschen abheben.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses, wurden die beschriebenen Bildberechnungen auch für 5 Einzelmessungen mit IAA und BEA in der Verdünnungsstufe  $10^{-3}$  für dieselbe Fliege durchgeführt (nicht abgebildet). Auch hier liegt das Rauschen in den 8 Bit Ratiosignal – Bildern zwischen 0 und 0,8 und bleibt somit innerhalb einer Pixelintensitätsstufe.

## 5. Diskussion

Um das Zusammenspiel neuronaler Zellverbände zu untersuchen, wurden im Laufe der Zeit viele wissenschaftliche Techniken etabliert. Die elektrophysiologischen Methoden wie z. B. die patch – clamp Technik (Neher et al., 1978), besitzen eine besonders gute zeitliche Auflösung, sind aber stark in der räumlichen Auflösung eingeschränkt. Im Gegensatz dazu zeigt das Deoxyglucose – Mapping (Kennedy et al., 1976; Buchner und Buchner, 1980) eine gute räumliche Auflösung, ist dafür aber in der zeitlichen Auflösung restriktiv. Andere Methoden wie die Positron – Emissions Tomographie (PET) oder das Optische Imaging intrinsischer Signale (OIS) (Lieke, 1993; Vanzetta und Grinvald, 1999; Mayhew et al., 2000) haben entweder eine zu grobe räumliche Auflösung oder zeigen schlicht ein zu schlechtes Signal – zu – Rausch – Verhältnis. Erst die Entwicklung des funktionellen Calcium – Imagings brachte ganz neue Möglichkeiten für die Untersuchung neuronaler Aktivität, auch bei Versuchsobjekten, die für die oben beschriebenen Techniken aufgrund ihrer geringen Größe bisher ungeeignet waren. Die ersten Experimente in dieser noch jungen Disziplin wurden mit von extern zu applizierenden Calciumfarbstoffen durchgeführt. Ein großer Nachteil dieser Farbstoffe ist jedoch die mangelhafte Genauigkeit in der Anfärbung von definierten Zellpopulationen. Trotzdem werden diese Farbstoffe auch heute noch für viele neurobiologische Fragestellungen verwendet (Joerges et al., 1997; Galizia et al., 1999). Um diese Probleme zu umgehen, wurden die genetisch codierten Calciumsensoren wie das Yellow Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) entwickelt. Mit diesen neuen neurobiologischen Sensoren ist es nun möglich, die räumlich aufgelöste neuronale Aktivität in definierten Zellverbänden zu untersuchen.

Für diese Arbeit diente die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit ihrer gut beschriebenen Genetik und Neurobiologie als Untersuchungsobjekt. Bei der vorgelegten Arbeit lag eine zweigeteilte Aufgabenstellung vor: Zum einen musste die Technik des *in – vivo* Calcium Imagings mit Hilfe des genetisch codierten Sensors Yellow Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) am Lehrstuhl erst komplett neu etabliert werden, zum anderen sollte mit der neuen Technik das Zusammenspiel der funktionellen Elemente neuronaler Systeme anhand des olfaktorischen Systems von *Drosophila* untersucht werden.

## 5.1 Allgemeines zur Messmethode und Datendarstellung

Als Grundlage für die durchgeführten Messungen dient der Calciumeinstrom in aktive Neurone. Dieser Influx ist nicht nur auf die Endigungen der Axone beschränkt, sondern zieht sich über die gesamte Nervenzelle (Berridge, 1998). Die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration spiegelt also u.a. die neuronale Aktivität wider und kann mit Hilfe des Sensors Yellow Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) detektiert werden. Da die Entfernung der Calciumionen aus dem Zellcytosol viel länger dauert als die elektrische Repolarisation der Zelle, kommt es zu einer verminderten zeitlichen Auflösung der elektrischen Aktivität der Neurone. Aus diesem Grund können Effekte, die mit der zeitlichen Struktur der Aktivität zusammenhängen, nur ungenügend erfasst werden. Lediglich der Start des Calciumsignals und das Signalmaximum verschiedener Messungen lassen sich zur Analyse heranziehen. Zeitlich hoch aufgelöste Phänomene, wie die duftinduzierte Oszillation von Neuronen (Laurent et al. 1996; Friedrich und Laurent, 2001) sind mit der Methode des Calcium Imaging gegenwärtig nicht detektierbar. Der Vorteil der Methode liegt also eindeutig in ihrer sehr guten räumlichen Auflösung. Mit dem GAL4 – UAS – System (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002) kann das Zusammenspiel definierter Zellpopulationen, bis hinab auf den Einzelzellbereich, untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit diente hauptsächlich die GAL4 - Fliegenlinie GH146 (Stocker et al., 1997) als Treiberlinie. Sie ermöglicht die Expression von Yellow Cameleon 2.1 in den Projektionsneuronen von *Drosophila* und somit die Untersuchung von drei olfaktorischen Gehirnzentren: Das hauptsächlich postsynaptische Neuropil der Antennalloben und die hauptsächlich präsynaptischen Neuropile der Pilzkörper – Calyces und des lateralen Protocerebrums. Die zeitliche Auflösung der Messungen an diesen Gehirnarealen ist dabei in hohem Maße von der Fluoreszenzstärke des Calciumsensors abhängig: Die Yellow Cameleon 2.1 – Experimente wurden mit einer Bildaufnahmefrequenz von 3 Hz durchgeführt. Dabei betrug die Belichtungszeit für die großen und somit stark fluoreszierenden Antennalloben 80 – 110 ms, für die Calyces 160 – 220 ms und für das laterale Protocerebrum 180 ms. Da für jedes Einzelbild 333 ms zur Verfügung stehen, bleibt für das Sensorprotein genügend Zeit, um sich zu regenerieren. Bleicheffekte treten so nur in einem geringen Ausmaß auf. Für Versuche, die eine höhere zeitliche Auflösung bedingen, kann die

Bildaufnahmefrequenz bedenkenlos auf 5 Hz erhöht werden. Kurze Messungen mit 10 Hz wurden ebenfalls erfolgreich durchgeführt.

Muskuläre Kontraktionen und Pumpbewegungen der Hämolymphe stellen unter *in vivo* Bedingungen ein ernsthaftes Problem für die Calciummessungen dar. Durch solche Bewegungen kann das Gehirn während den Messungen in alle 3 Raumrichtungen verlagert werden. Solche Lageverschiebungen evozieren starke mechanische Artefakte, die evtl. auftretende Calciumsignale komplett überlagern können. Bei den Calyxmessungen wurden die Bewegungen durch Zugabe von Philanthotoxin vermindert. Es blockiert die muskulären Glutamatrezeptoren und wurde schon bei mehreren Insektenexperimenten verwendet (Karst et al., 1991; Benson et al., 1992). Effekte von Philanthotoxin auf die Acetylcholinrezeptoren wurden ebenfalls beschrieben (Nakanishi et al., 1997) und können für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden. Durch den Einsatz eines ratiometrischen Calciumsensors wie das Yellow Cameleon 2.1 ist es möglich, die Bewegung des Gehirns bis zu einem gewissen Maß "herauszurechnen". Durch den FRET – Effekt sind echte Calciumsignale deutlich von Bewegungsartefakten zu unterscheiden: Steigt die EYFP – Fluoreszenz an, während die ECFP – Fluoreszenz sinkt, handelt es sich um ein echtes Calciumsignal. Steigt oder sinkt sowohl die EYFP – als auch die ECFP – Fluoreszenz handelt es sich um ein Bewegungsartefakt. Kleinere Bewegungen des Gehirns äußern sich zwar in der EYFP – und ECFP – Fluoreszenz, durch die Bildung der Ratio aus EYFP / ECFP werden diese Bewegungen aber bis zu einem gewissen Maß herausgerechnet. Das Bewegungsartefakt tritt in der Ratio nur noch abgeschwächt oder gar nicht mehr auf. Diese sensorimmanente Bewegungskorrektur funktioniert vor allem für z – Bewegungen. Bewegt sich das zu messende Areal jedoch in x – oder y – Richtung aus dem Registrierbereich der CCD – Kamera heraus, ist keine Korrektur mehr möglich. Eine weitere Möglichkeit zur Bewegungskorrektur bietet die zur Datenauswertung erworbene Software *MetaMorph* (VisitronSystems, Puchheim, Deutschland). Mit ihrer Hilfe können die aufgenommenen Fluoreszenzbilder nach den Experimenten manuell zur Deckung gebracht werden, d.h. es kann eine postexperimentelle x – , y – Bewegungskorrektur durchgeführt werden. Da es sich bei den gemessenen Gehirnarealen um dreidimensionale Strukturen handelt, kommen auch sehr häufig komplexe Bewegungen vor: Sehr viele Verlagerungen des

Gehirns beruhen nicht auf einfachen linearen Bewegungen in x – , y – oder z – Richtung, sondern bilden eine Kombination aus allen möglichen Raumrichtungen, die auch Drehungen, Torsionen und Kontraktionen beinhalten. Hier trifft die postexperimentelle x – , y – Bewegungskorrektur auf ihre Grenzen. Insgesamt ist anzumerken, dass bei zu starker Bewegung des Fliegengehirns keine zufriedenstellende Korrektur mehr möglich ist. Der Einsatz von Sensoren, die stärkere Calciumsignale produzieren, kann das Problem umgehen: Sie sind bewegungsunabhängiger, da das evozierte Signal nicht so stark von den Bewegungsartefakten überlagert werden kann. Eine verbesserte Cameleonversion mit einem höheren Signal zu Rauschen Verhältnis ist bereits beschrieben (Truong et al., 2001). Alternativen zu den ratiometrischen Sensoren bilden die zirkulär permutierten Fluoreszenzproteine (Baird et al., 1999; Nagai et al., 2001; Nakai et al., 2001). Auch sie zeigen deutlich größere relative Fluoreszenzänderungen als das hier verwendete Cameleon 2.1 – Protein, besitzen jedoch andere Nachteile: Da es sich nicht um ratiometrische Sensoren handelt, kann bei diesen Fusionsproteinen nicht zwischen echtem Calciumsignal und evtl. mechanischen Bewegungsartefakten unterschieden werden. Außerdem zeigen sie eine sehr schwache Grundfluoreszenz, d.h. im nicht aktivierten Zustand sind sie nur schwer zu detektieren.

Um die duftinduzierte neuronale Aktivität innerhalb des gemessenen Gehirnareals optisch darstellen zu können, genügt es bei den Experimenten zur olfaktorischen Codierung nicht, die aufgenommenen Ratiobilder ohne vorherige Bearbeitung zu betrachten. Die Ratiowerte ändern sich bei einem Duftstimulus nur um wenige Prozent. Diese geringfügige Veränderung ist in den unbearbeiteten Ratiobildern jedoch kaum zu erkennen. Durch den Abzug eines vor dem Duftstimulus aufgenommenen Ratiobildes, von einem während des Duftstimulus aufgenommenen Ratiobildes, können sog. “Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster“ oder auch “Ratiosignal – Bilder“ erstellt werden. Nachdem die Bildattribute (Helligkeit, Kontrast) des resultierenden Differenzbildes (= Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster) angepasst wurden, wird ein Median – und ein Low Pass – Filter appliziert (s.a. Kapitel 3.4.6.1.2). Diese Bilder sind von besonderer Bedeutung, da sie das räumliche Aktivierungsmuster optisch darstellen. Bei ihrer Erstellung muss mit einem Höchstmaß an Kontrolle gearbeitet werden, da es für die vorgenommenen Veränderungen der Bildattribute und den Einsatz von optischen Filtern keine festgelegten Arbeitsvorschriften gibt. Die

Falschfarbenskalierung muss so gewählt sein, dass sich die duftvezierten Calicumsignale im Bild deutlich von den Bereichen ohne Signal unterscheiden (s.a. Kapitel 3.4.6.1.2). Außerdem ist ein Grundverständnis für die Auswirkungen des Einsatzes von optischen Filtern notwendig. Durch die Applikation des Median – und des Low Pass – Filters wird bildimmanentes Rauschen herausgerechnet, und das ganze Bild erfährt eine Art Glättung, d.h. signalstarke Areale, sog. Hot Spots, werden deutlicher hervorgehoben. Die Bilder erfahren also durch die diversen Bildbearbeitungsschritte eine morphologische Reduktion zur besseren optischen Signaldarstellung. Dabei ist es wichtig die Fenstergröße der eingesetzten Filter auf die Größe der gemessenen morphologischen Strukturen anzupassen. Zum weiteren Nachweis für die Verlässlichkeit der erstellten  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster, wurde das bildimmanente Rauschen berechnet (s.a. Kapitel 4.6.4). Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die duftinduzierten Signale in den  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster deutlich vom Rauschen abheben. Die Aktivitätsmuster zeigen also echte Calciumsignale, die Messungen sind konsistent.

## **5.2 Optomotorisches Verhalten der Cameleon 2.0 *in – vivo* Präparate**

Noch vor den ersten olfaktorischen Imaging – Experimenten stellte sich die Frage, in wie weit die Gehirnfunktion der Fliegen durch die *in – vivo* Präparation beeinträchtigt wird. Ein erster Ansatz zur Lösung dieser Frage waren die Untersuchungen der Optomotorik von *in – vivo* präparierten Fliegen, die den Calciumsensor Yellow Cameleon 2.0 (Miyawaki et al., 1997) in den Kenyonzellen des Pilzkörpers exprimieren (GAL4 – Treiberlinie: Fliegenstamm 17D (Pfister, 1997)). Die untersuchten 17D – UAS: Cameleon 2.0 Fliegen dienen dabei als allgemeines Beispiel für Fliegen, die das UAS: Cameleon – Konstrukt unter GAL4 – Kontrolle exprimieren (für die späteren Imaging – Experimente wurden GH146 – UAS: Cameleon 2.1 Fliegen verwendet).

Die zu messende Fliege ist in der Optomotorikapparatur von einem sich drehenden Streifenmuster umgeben (s.a. Kapitel 4.1, Abb. 4.1). Die Drehbewegung des Musters kann von der Fliege wahrgenommen werden und sie antwortet mit einer entgegengesetzten Rotation des Körpers, d.h. sie versucht die Musterrotation zu

kompensieren (Buchner, 1976; Heisenberg und Wolf, 1984). Für wildtypische, unpräparierte Fliegen ergibt sich mit steigender Lichtintensität des rotierenden Streifenmusters, ein Zunahme der Musterkompensation. Bei den höchsten Lichtintensitäten erreicht die Musterkompensation dann eine Sättigung (Melzig et al., 1996). Die gemessenen *in vivo* – Präparate der 17D – UAS: Cameleon 2.0 Fliegen zeigen ebenfalls einen ansteigenden Performance Index mit zunehmender Lichtintensität (s.a. Kapitel 4.1, Abb. 4.2), d.h. alle präparierten Fliegen können auf die Rotation des Streifenmusters reagieren und es kommt zur typischen Kompensationsbewegung. Allerdings überleben die präparierten Fliegen die Messprozedur nur für ca. 30 bis 90 Minuten – je nach individueller Fitness, so dass meist nicht alle zehn getesteten Lichtintensitäten getestet werden konnten. Wildtypische, unpräparierte Fliegen zeigen unter denselben Umständen über einen ganzen Tag hinweg Rotationsantworten. Hauptgrund für die schlechteren Kompensationsleistungen der 17D – UAS: Cameleon 2.0 *in vivo* Präparate ist sehr wahrscheinlich kein postpräparatives Trauma – die Fliegen zeigen ja die typische Kompensationsbewegung –, sondern die mangelhafte Abdichtung des Schädelloches durch Agarose: Das Gehirn trocknet im Laufe des Experiments aus und die Fliege stirbt.

Die beschriebenen Experimente wurden zu Beginn dieser Arbeit durchgeführt. Sie sollen als allgemeiner Nachweis dafür dienen, dass eine *in vivo* Präparation die Funktion des Fliegengehirns nicht nachhaltig beeinträchtigt. Da jedoch nur das optomotorische Verhalten der *in vivo* Präparate getestet wurde, d.h. die Lichtsensitivität der Photorezeptoren und der Zustand der neuronalen Netzwerke zur Bewegungsdetektion, ist mit den Experimenten kein Beweis geliefert worden, dass die olfaktorischen Neurone nach der Präparation ebenfalls noch intakt sind. Als Nachweis hierfür werden die erfolgreichen Imaging Experimente an den olfaktorischen Neuronen von *Drosophila* (s.a. Kapitel 4.4 und 4.6) herangezogen.

### 5.3 Molekularbiologie

Zur Charakterisierung der von Dr. Ch. Schuster (Tübingen) erhaltenen Cameleon 2.0 – Fliegenlinie (C2-6I), wurde eine Inverse PCR mit genomischer DNA durchgeführt um den Insertionsort des Vektors genau zu lokalisieren. Durch die Sequenzierung

der PCR - Produkte konnte nachgewiesen werden, dass es sich um eine doppelte Insertion des Vektors in der Region 70B2 sowie in der Region 84F handelt.

Da der Calciumsensor Yellow Cameleon 2.0 (Miyawaki et al., 1997) jedoch eine hohe pH – Sensitivität aufweist, wurde er von Sören Diegelmann mittels einer *in – vitro* Mutagenese in die verbesserte Version Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) überführt und durch Keimbahntransformation in die Fliege gebracht (Diegelmann et al, 2002). Die so erhaltene homozygote Fliegenlinie Cameleon 2.1/82 konnte als expressionstärkste Fliegenlinie charakterisiert werden und wurde deshalb für die folgenden Calcium Imaging Experimente verwendet. Um auch in dieser Fliegenlinie die Insertion des pUAST – Cameleon 2.1 Vektors zu lokalisieren, wurde von Sören Diegelmann eine Inverse PCR durchgeführt. Als Insertionsort ergab sich das 2. Chromosom, linker Arm, Region 26F (Diegelmann et al, 2002).

Um zu überprüfen, ob die Expression des Calciumsensors einen Effekt auf die synaptische Übertragung hat, wurden die exzitatorischen Potentiale (EJP = excitatory junctional potentials) aus Muskeln der Körperwand von Nrv2-Gal4-3 – UAS:Cameleon 2.1 – Tieren im 3. Larvenstadium abgeleitet und mit denen von *w<sup>1118</sup>* Larven verglichen. Bei der Gal4 – Linie Nrv2-Gal4-3 (Sun et al., 1998) handelt es sich um eine panneuronal exprimierende Treiberlinie. Dabei lagen die EJPs der Cameleon 2.1 – exprimierenden Tiere innerhalb der Streubreite wildtypischer EJPs. Die elektrophysiologischen Untersuchungen ergaben demnach keinen Hinweis auf einen offensichtlichen Einfluss des Cameleon 2.1 – Fusionsproteins auf die synaptische Transmission (Diegelmann et al., 2002). Weiterhin konnten Miyawaki et al (1999) *in – vitro* nachweisen, dass die Calmodulin – Einheit des Yellow Cameleon 2.1 bei steigender Calciumkonzentration bevorzugt mit dem Calmodulin – Bindungspeptid M13 interagiert, und nicht mit frei in der Analyselösung vorkommenden Calmodulin – abhängigen Enzymen. Insgesamt bedeutet dies, dass die intrazelluläre Expression des Calciumsensors keine negativen Auswirkungen auf die Zellphysiologie und – funktionalität hat.

## 5.4 *in – vitro* Cameleon 2.1 – Funktionsanalyse

Nachdem der neue Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1 durch *in – vitro* Mutagenese erstellt wurde, sollte die Funktionsfähigkeit des verbesserten Fusionsproteins überprüft werden. Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit keine Calcium Imaging Apparatur am Lehrstuhl vorhanden war, wurde eine *in – vitro* Funktionsanalyse von rekombinantem His – Tag – Cameleon 2.1 – Protein mit einer Photomultiplier – Anordnung durchgeführt. Die Apparatur bestand aus zwei Photomultipliern, die simultan die EYFP – und ECFP – Fluoreszenz der Analyselösungen detektieren konnten. Die *in – vitro* Funktionsanalyse ergab, dass mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$  – Konzentration in den Analyselösungen auch die Ratiowerte EYFP/ECFP signifikant ansteigen. Außerdem konnte eine signifikante Reduktion der Ratiowerte EYFP/ECFP bei Zusatz des Calcium – Chelators EGTA zu den Analyselösungen nachgewiesen werden. Das Cameleon 2.1 – Protein arbeitet also reversibel und ist somit als ratiometrischer Sensor für unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$  – Konzentrationen sehr gut geeignet.

Die Analyselösungen für die *in – vitro* Funktionsanalyse wurden in die Bohrungen eines Acrylblocks pipettiert, der eigens für diese Versuche von der Lehrstuhl – Werkstatt gefertigt wurde (s.a. Kapitel 3.2.2, Abb. 3.2). Aufgrund der leicht unterschiedlichen Bohrungstiefen und der Beobachtung, dass der Meniskus der Analyselösungen in den verschiedenen Bohrungen unterschiedlich ausgeprägt war, ergaben sich optische Unterschiede in den Analyselösungen. Zum Nachweis der optischen Unterschiede wurden alle Bohrungen des Blockschälchens mit derselben Analyselösung beschickt und die EYFP – , ECFP – und Ratiowerte gemessen: Für die gleichen Analyselösungen ergaben sich stark unterschiedliche EYFP – und ECFP – Werte, die Ratio aller Analyselösungen war jedoch annähernd gleich (Daten nicht dargestellt). Das gleiche Phänomen konnte auch bei den Analyselösungen mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen beobachtet werden: In Abb. 3.2 B (Kapitel 3.2.2) veranschaulichen die Werte der Proben 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM) und 5 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM + EGTA 2mM) den Vorteil von ratiometrischen  $\text{Ca}^{2+}$  - Sensoren: Im Vergleich zu Probe 3 ( $\text{Ca}^{2+}$  1mM) erhöht sich der EYFP – Wert von Probe 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM). Der ECFP – Wert erfährt ebenfalls eine leichte Erhöhung, sollte aber eine Reduktion bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentration erfahren. Da jedoch die Absoluterhöhung des EYFP

– Wertes deutlich höher ist als die des ECFP – Wertes, resultiert daraus eine gesteigerte Ratio. Durch die  $\text{Ca}^{2+}$  - bindende Wirkung des EGTA zeigt Probe 5 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM + EGTA 2mM) im Vergleich zu Probe 4 ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5mM) eine Erniedrigung des EYFP - Wertes. Der ECFP – Wert erfährt ebenfalls eine leicht Erniedrigung, sollte jedoch bei sinkender  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentration eine Erhöhung erfahren. Da jedoch die Absoluterniedrigung des EYFP – Wertes deutlich höher ist als die des ECFP – Wertes, resultiert daraus ein deutlich erniedrigter Ratiowert. Es zeigt sich also, dass der Einsatz von ratiometrischen Calciumsensoren wie Yellow Cameleon 2.1 gleich zwei Vorteile hat: Zum Einen kann durch den FRET – Effekt ganz einfach zwischen echten Calciumsignalen und mechanischen Artefakten unterschieden werden (s.a. Kapitel 5.1), zum Anderen wirken sich optische Veränderungen, wie die Unterschiede in den Bohrungstiefen und die verschiedenen Minisken der *in – vitro* Funktionsanalyse, kaum auf die gemessene Ratio aus. Im Endeffekt kann man die verschiedenen Tiefen und Minisken der Bohrungen mit einer Bewegung in z – Richtung vergleichen, wie jene, die bei den späteren *in – vivo* Imaging Experimenten durch Verlagerungen des Fliegengehirns auftraten.

Miyawaki et al. (1999) führten ebenfalls *in – vitro* Funktionsanalysen aus. Sie exprimierten das Yellow Cameleon 2.1 unter anderem in HeLa – Zellen und evozierten einen intrazellulären Calciumanstieg durch Applikation von 0,1 mM Histamin. Als Resultat zeigte der so calciumgesättigte Sensor einen Anstieg in der Ratio von ca. 25% (Ratio als  $\Delta R/R$  [%]). Diese Experimente bestätigen die Funktionsfähigkeit des Fusionsproteins als Calciumsensor, sind jedoch aufgrund komplett verschiedener Messsysteme und – techniken, nicht mit der für diese Arbeit durchgeführten *in – vitro* Funktionsanalyse vergleichbar.

## **5.5 *in – vivo* Imaging von Calcium – Signalen in den Antennalloben und Calyces von *Drosophila melanogaster* mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1**

Düfte sind komplexe externe Stimuli. Man nimmt an, dass sie in neuronalen Netzwerken des Gehirns als spatiotemporale Aktivitätsmuster repräsentiert werden.

Diese Aktivitätsmuster können mit optischen Imaging – Techniken aufgenommen werden. Mit konventionellen Fluoreszenzfarbstoffen kann man jedoch immer nur die Oberfläche von ganzen Gehirnen behandeln, sodass eine genaue Untersuchung von einzelnen Zellpopulationen nur schwer möglich ist. In dieser Arbeit dient der genetisch codierte Fluoreszenzfarbstoff Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) als Calciumsensor. Mit Hilfe der GAL4 – UAS – Technik (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002) kann der Sensor in beliebigen Zellpopulationen des *Drosophila* - Gehirns exprimiert werden (s.a. Kapitel 4.4.1, Abb. 4.6). Wählt man als GAL4 – Treiberlinie den Fliegenstamm GH 146 (Stocker et al., 1997) wird der Sensor in den olfaktorischen Projektionsneuronen von *Drosophila* exprimiert und erlaubt somit eine *in – vivo* Untersuchung der spatiotemporalen Duftrepräsentation im hauptsächlich postsynaptischen Bereich der Antennalloben und im hauptsächlich präsynaptischen Bereich des Calyx und lateralen Protocerebrums (s.a. Kapitel 4.4.2, Abb.4.7). Die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen der duftinduzierten Calciumsignale waren die ersten optischen *in – vivo* Imaging Aufnahmen der Antennalloben und Calyces von *Drosophila* (Fiala et al., 2002).

### 5.5.1 Duftevozierte Calciumsignale in den Antennalloben

Die Stimulation von 3 individuellen Fliegen mit den Düften Benzaldehyd (BEA), Isoamylacetat (IAA) und Octanol (OCT) liefert duftspezifische  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster (s.a. Abb 4.8 B, Kapitel 4.4.3.1). Die auf die Duftstimuli mit Calciumsignalen reagierenden Areale haben eine Größe von 10 – 30  $\mu m$ , liegen also in der Größenordnung von individuellen Glomeruli. Obwohl die auf den Duftstimulus reagierenden Glomeruli morphologisch nicht eindeutig identifizierbar sind, zeigen die räumlichen  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster der 3 Fliegen für die 3 verschiedenen Düfte ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Individuen. Die Duftrepräsentation in den Antennalloben zeigt einen kombinatorischen Aspekt: Jeder Duft evoziert ein charakteristisches Aktivitätsmuster bestehend aus einem oder mehreren Glomeruli. Die Aktivitätsmuster verschiedener Düfte können sich überlagern, d.h. individuelle Glomeruli können durch verschiedene Düfte aktiviert werden, das gesamte Aktivitätsmuster, d.h die Summe der aktivierten Glomeruli eines bestimmten Duftes ist jedoch charakteristisch (s.a. Kapitel 4.4.3.1, Abb 4.8 B). Die Duftrepräsentation in den Antennalloben von *Drososophila* geschieht also in

Form eines glomerulären Codes: Unterschiedliche Düfte evozieren duftspezifische glomeruläre Aktivitätsmuster, ein Prinzip der Duftverarbeitung, das auch in anderen Insekten wie der Honigbiene *Apis mellifera* (Lieke, 1993; Joerges et al., 1997; Galizia et al., 1999; Galizia und Menzel, 2001; Sachse und Galizia, 2003; Sandoz et al., 2003), der Ameise *Camponotus rufipes* (Galizia und Menzel, 1999) und der Motte *Spodoptera littoralis* (Carlsson et al., 2002) nachgewiesen werden konnte. Dass es sich beim glomerulären Code um ein Prinzip handelt, das nicht nur auf den Stamm der Invertebrata beschränkt ist, beweisen die Arbeiten über die olfaktorische Informationsverarbeitung bei Vertebraten: Das Analogon der Vertebraten zum Antennallobus der Invertebraten ist der olfaktorische Bulbus. An Zebrafischen (Friedrich und Korsching, 1997 und 1998; Fuss und Korsching, 2001) sowie an Ratten (Rubin et al., 1999) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die neuronale Repräsentation von Düften durch die kombinatorische Aktivierung eines für den gegebenen Duft spezifischen Sets von Glomeruli im Bulbus erreicht wird – ein Prinzip also, das sich über die Tierstämme hinweg als effektiv bewiesen hat. Ein direkter Vergleich mit Daten, die mit der  $^3\text{[H]2}$  – Desoxyglucose Autoradiographie – Methode erstellt wurden, ist aufgrund grundlegender Unterschiede in der Technik nicht möglich.

Der Mittelwert aller von den 6 Düften evozierten Ratio – Intensitäten EYFP / ECFP für das gesamte Antennalloben – Areal ( $n = 9 - 12$  Tiere, s.a. Kapitel 3.3.5) liegt bei  $1,23\% \pm 0,23\%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $t = 5,4$ ,  $p < 0,003$ ,  $t$  – test). Damit sind die hier gemessenen Cameleon 2.1 – Calciumsignale signifikant kleiner als die für Zellkulturen beschriebene Ratioerhöhung (Ratio als  $\Delta R/R$  [%]) um bis zu 30% bei Kaliumchlorid – Applikation (Miyawaki et al., 1999). Verantwortlich für diesen immensen Unterschied sind mehrere Gründe: Zum einen antworten auf einen Duftstimulus nur wenige der insgesamt ca. 90 Cameleon 2.1 – exprimierenden Projektionsneurone und zum anderen ist die Reaktion dieser Neurone räumlich begrenzt. Außerdem evozieren externe physiologische Stimuli, wie z.B. Düfte, bedeutend kleinere Signale als auf das Gehirn applizierte Transmitter oder Chemikalien, die den Calciumsensor in die Sättigung bringen können. Die durch die Applikation von 10 mM KCl in den Ringertropfen über der geöffneten Fliegenkopfkapsel ausgelöste Depolarisation der Neurone des Fliegengehirns erzielte mit der Imaging – Apperatur der Arbeitsgruppe von Prof. Giovanni Galizia am

Lehrstuhl für Neurobiologie der Freien Universität Berlin, ein EYFP/ECFP Ratiosignal von bis zu 5%. Die am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie der Universität Würzburg durchgeführten Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid zeigen sogar Erhöhungen der Ratio von bis zu 18% (s.a. Kapitel 4.5).

Berechnet man die maximalen Ratiowerte innerhalb des gesamten Antennalloben – Areal für die verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied für die 6 getesteten Düfte. Das bedeutet, dass sich die durch die 6 verschiedenen Düfte evozierten Aktivitätsmuster nicht aufgrund von unterschiedlichen Gesamtaktivitäten voneinander unterscheiden, sondern tatsächlich aufgrund der Lage und Anzahl der antwortenden Glomeruli. Es handelt sich also nicht um Intensitätsmuster, sondern um räumliche Aktivitätsmuster. Der zeitliche Verlauf der Calciumsignale bestätigt das (s.a. Kapitel 4.4.3.1, Abb. 4.8 C): Die Amplituden der duftinduzierten Signale für die beiden ausgewerteten Glomeruli sind abhängig vom jeweiligen Duftstimulus. Benzaldehyd evoziert in beiden Glomeruli nur schwache Ratiosignale, Isoamylacetat zeigt ein starkes Signal in Glomerulus 2, dafür ein schwaches Signal in Glomerulus 1. Im Gegensatz dazu, evoziert Octanol in Glomerulus 1 ein starkes Calciumsignal und ein schwaches in Glomerulus 2. Die Graphen zeigen also, dass es sich bei den Aktivitätsmustern der Antennalloben tatsächlich um echte Calciumsignale handelt und, dass unterschiedliche Düfte unterschiedliche Aktivitätsmuster evozieren. Die auftretende Variabilität in den in dieser Arbeit dargestellten Aktivitätsmustern des gleichen Duftes, ist in den unterschiedlichen räumlichen Orientierungen der Antennalloben der präparierten Fliegen begründet: Nach jeder *in vivo* – Präparation ist die Lage der Antennalloben individuell leicht unterschiedlich; darum sind die Aktivitätsmuster nicht deckungsgleich.

### 5.5.2 Duftevozierte Calciumsignale im Calyx

Der Pilzkörper spielt bei olfaktorischem Lernen und Gedächtnisbildung eine entscheidende Rolle (Heisenberg et al., 1985; de Belle und Heisenberg, 1994; Zars et al., 2000). Um die räumliche Duftrepräsentation im dichtgepackten neuronalen Netzwerk des Calyx zu untersuchen, wurde meist auf einen der beiden Calyces des Fliegengehirns fokussiert. Nur in wenigen Präparationen war es möglich beide

Calyces zu untersuchen. Auch hier wurde der Calciumsensor UAS:Yellow Cameleon 2.1 mit Hilfe der GAL4 – Linie GH 146 (Stocker et al., 1997) in den Projektionsneuronen der untersuchten Tiere exprimiert. So konnte die olfaktorische Codierung im präsynaptischen Neuropil des Calyx untersucht werden.

Die  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster für die 5 Düfte Benzaldehyd (BEA), Butanol (BUT), Isoamylacetat (IAA), Ethylacetat (ETA) und Octanol (OCT) zeigen eine deutliche räumliche Organisation des Calciumsignals, wobei die auf den Duftstimulus hin antwortenden Areale diskret über den Calyx hinweg verteilt sind (s.a. Kapitel 4.4.3.2, Abb. 4.9 B und Abb. 4.10 A). Bei wiederholter Stimulation des Calyx mit demselben Duft innerhalb eines Individuums, ergaben sich duftcharakteristische Aktivitätsmuster. Insgesamt zeigt das hohe Maß an Reproduzierbarkeit der Aktivitätsmuster für einen gegebenen Duft, dass im Calyx, wie in den Antennalloben, eine duftspezifische räumliche Repräsentation vorliegt. Ein Vergleich der Aktivitätsmuster zwischen verschiedenen Individuen war aufgrund der unterschiedlichen Lage der Calyces in den unterschiedlichen Präparationen nicht möglich.

Die präsynaptischen Endigungen der Projektionsneurone im Calyx antworten auf den Duftstimulus mit einer kürzeren Verzögerung als die postsynaptischen Dendrite im Antennallobus. In den meisten Calyxmessungen startet das Calciumsignal unmittelbar mit dem Duftstimulus. Dieser Unterschied im zeitlichen Verlauf der Calciumsignale zwischen präsynaptischem und postsynaptischem Neuropil der Projektionsneurone, spiegelt möglicherweise die unterschiedlichen Rollen der Calciumionen in den beiden Kompartimenten wider: z.B. sind die Calciumionen im Calyx (präsynaptisch) besonders wichtig für eine schnelle Ausschüttung der synaptischen Vesikel in den synaptischen Spalt, um die Übertragung der neuronalen Information zu gewährleisten. Im Antennallobus (postsynaptisch) übernehmen sie dagegen vermutlich eine Funktion bei der postsynaptischen Integration. Der Mittelwert aller von den 6 Düften evozierten Ratio – Intensitäten EYFP / ECFP für das gesamte Calyx – Areal ( $n = 6$  Düfte, 1 – 5 gemittelte Düfte in 10 Tieren) liegt bei  $0,6\% \pm 0,06\%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $t = 9,7$ ,  $p < 0,0002$ ,  $t$  – test) und ist damit hoch signifikant, bleibt aber deutlich niedriger als der von allen 6 Düften induzierte Ratio – Intensitätsmittelwert des Antennallobus ( $1,23\% \pm 0,23\%$ ). Grund

für diesen Unterschied ist, dass die Messungen am Calyx mit einer stärkeren Vergrößerung durchgeführt wurden und, dass das betrachtete Calyxareal deutlich kleiner ist als die untersuchten Antennalloben. Genau wie im Antennallobus sind die Unterschiede in den Ratiomaxima zwischen den verschiedenen Düften für das gesamte Calyxareal nicht signifikant. Das bedeutet, dass sich die durch die 6 verschiedenen Düfte evozierten  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster nicht aufgrund von unterschiedlichen Gesamtaktivitäten voneinander unterscheiden, sondern tatsächlich aufgrund der Lage und Anzahl der antwortenden neuronalen Areale innerhalb der untersuchten Calyces. Es handelt sich also bei den Aktivitätsmustern der Calyces ebenso wie bei den Aktivitätsmustern der Antennalloben nicht um Intensitätsmuster, sondern um räumliche  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster.

Interessanter Weise kann der kombinatorische Aspekt der Duftcodierung auch im Calyx beobachtet werden: Benzaldehyd evoziert starke Calciumsignale in beiden untersuchten ROIs 1 und 2, Isoamylacetat zeigt nur in ROI 1 ein Calciumsignal und Octanol zeigt ebenfalls in beiden ROIs Signale, die jedoch bedeutend schwächer sind als die von Benzaldehyd (s.a. Kapitel 4.4.3.2, Abb. 4.9 C). Die Graphen der Mittelwerte von jeweils 3 Messungen pro Duft innerhalb der beschriebenen Fliege verdeutlichen das hohe Maß an Reproduzierbarkeit der Messungen (s.a. Kapitel 4.4.3.2, Abb. 4.9 D). Da bei den Calyx – Messungen im Vergleich zu den Antennalloben – Messungen deutlich kleinere Calciumsignale evoziert werden, haben Bleicheffekte des Calciumsensors Cameleon 2.1 einen stärkeren Einfluss auf die neuronale Antwort. Das Bleichen ist bei den Calyx – Messungen ausgeprägter, da der Calyx mit derselben Energie der Lichtquelle angeregt wird wie die Antennalloben, das Calyxareal jedoch kleiner ist und bei höherer Vergrößerung vermessen wird. Das in den Graphen für die Calyx – Messungen auftretende Prästimulussignal (Calciumsignalstart vor Beginn des Duftstimulus) ist ein Artefakt dieses Bleicheffekts, bei dem die EYFP – Fluoreszenz stärker absinkt als die ECFP – Fluoreszenz.

Diese Arbeit weist nach, dass die zeitlichen Verläufe der Calciumsignale durch einen monotonen Verlauf charakterisiert sind: Sie steigen mit Beginn des Duftstimulus an und erreichen kurz nach Ende der Duftgabe ihre Höhepunkte, bevor sie wieder abklingen. Unter den gegenwärtigen Versuchsbedingungen werden also keine

komplexen Aktivitätswellen beobachtet, die sich über die Zeit verändern. Das bedeutet, dass Düfte im Calyx vermutlich in einer ähnlichen Weise wie im Antennallobus repräsentiert sind und das, obwohl die beiden Gehirnareale eine komplett unterschiedliche Morphologie aufweisen. Das dicht gepackte neuronale Netzwerk des Calyx besitzt keine vergleichbaren eindeutigen Strukturen wie die Glomeruli der Antennalloben. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Calyx haben große präsynaptische Boutons der Projektionsneuronenendigungen nachgewiesen, die von postsynaptischen Kenyonzellen und inhibitorischen Synapsen anderer Neurone umgeben sind (Yusuyama et al., 2002). Die einzelnen Spots der im Calyx gemessenen Aktivitätsmuster liegen in der Größenordnung von  $5 \pm 2 \mu\text{m}$  (berechnet aus 20 zufällig ausgewählten Aktivitätsspoten) und entsprechen somit in ihrer Größe den elektronenmikroskopisch beschriebenen präsynaptischen Boutons (Yusuyama et al., 2002). Diese sog. Microglomeruli entsprechen womöglich den gemessenen Aktivitätsspoten. Zukünftige Experimente sollen bei der Aufklärung dieser morphologisch – funktionellen Fragestellung helfen.

Elektrophysiologische Untersuchungen an den Projektionsneuronen von Heuschrecken (Laurent et al., 1996; Stopfer et al., 2003), Honigbienen (Stopfer et al., 1997; Müller et al., 2002) und *Drosophila* (Wilson et al., 2004), konnten nachweisen, dass unterschiedliche Düfte duftspezifische zeitliche Aktivitätsmuster evozieren. Elektrophysiologische Untersuchungen an den Mitralzellen von Vertebraten (Friedrich und Laurent, 2001) bestätigen diese Ergebnisse. Insgesamt zeigen die Experimente, dass es neben der räumlichen Codierung von Düften in Form eines glomerulären Codes, auch eine zeitliche Codierung gibt. Da die Imaging Experimente für diese Arbeit mit einer zeitlichen Auflösung von nur 3 Hz (Bildaufnahmefrequenz) durchgeführt wurden, konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. An Mäusen konnte nachgewiesen werden (Zou et al., 2001), dass die Duftinformation der Mitralzellen auf eine stereotypische sensorische Karte im olfaktorischen Cortex übertragen wird. Dabei ist das Aktivitätsmuster eines bestimmten Duftes über den gesamten Cortex geclustert und verschiedene Düfte zeigen überlappende Aktivitätsmuster, die für verschiedene Individuen gleich sind. Elektrophysiologische Untersuchungen an den Kenyonzellen von Heuschrecken (Perez – Orive et al., 2002), d.h. an den nachgeschalteten Zellen der Projektionsneurone, ergaben außerdem, dass das räumliche Muster von aktivierten Kenyonzellen über dem

gesamten Calyx verstreut ist. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den in dieser Arbeit gefundenen Aktivitätsmustern im Calyx überein: Auch hier sind die auf den Duftstimulus antwortenden Areale diskret über den Calyx hinweg verteilt und bilden ein duftspezifisches Aktivitätsmuster aus.

Die weitere Duftrepräsentation in den Kenyonzellen des Pilzkörpers ist gegenwärtig noch Thema spekulativer Diskussionen. Heisenberg (2003) betrachtet den Pilzkörper als Koinzidenzdetektor: Komplexe Duftgemische zeigen überlappende glomeruläre Aktivitätsmuster in den Antennalloben. Diese Aktivitätsmuster werden von den entsprechenden Projektionsneuronen über den inneren Antennocerebraltrakt in die präsynaptische Eingangsregion des Calyx transferiert. Dort könnten die postsynaptischen Kenyonzellen als Koinzidenzdetektoren wirken, d.h. eine bestimmte Kenyonzelle wird erst dann aktiviert, wenn alle mit ihr verschalteten Projektionsneurone ebenfalls aktiv sind. D.h. Düfte sollten als Sets von spezifisch aktivierten, über den gesamten Calyx verteilten Kenyonzellen repräsentiert sein. Unterstützt wird diese Hypothese ebenfalls von den elektrophysiologischen Untersuchungen an der Heuschrecke von Perez – Orive et al. (2002): Die Wahrscheinlichkeit einer über alle Projektionsneurone gemessenen duftinduzierten Aktivierung wird mit 64% angegeben, wohingegen die Kenyonzellen unter gleichen Umständen nur eine Aktivierungswahrscheinlichkeit von 11% zeigen. In den elektrophysiologischen Aufnahmen ihrer Arbeit zeigen die duftinduzierten Antworten der Projektionsneurone typischerweise 5 – 30 Aktionspotentiale, wohingegen die Kenyonzellen mit nur 1 oder 2 Aktionspotentialen auf die 17 getesteten Düfte reagierten. Im Vergleich zu den Projektionsneuronen haben die Kenyonzellen also eine reduzierte Aktivierungswahrscheinlichkeit und Signalstärke. Diese Ergebnisse sprechen für das Koinzidenzdetektor – Modell des Pilzkörpers, der demnach wie eine Art Filter die neuronale Information der Antennalloben verarbeiten könnte.

Die ersten Einblicke in die räumliche olfaktorische Codierung der Pilzkörper von *Drosophila* erlaubte die *in – vivo* Calcium Imaging Arbeit von Wang et al. (2001): Es wurde an ca. 70 Kenyonzellen gezeigt, dass verschiedene Düfte und Duftkonzentrationen ganz bestimmte duftspezifische räumliche Aktivitätsmuster in den Somata evozieren. Dabei waren die Aktivitätsmuster für individuelle Düfte über den gesamten gemessenen Calyxbereich verstreut. Das entspricht den

elektrophysiologischen Untersuchungen von Perez – Orive et al. (2002) und auch den in dieser Arbeit gefundenen Aktivitätsmustern im Calyx, die wie bereits beschrieben durch duftspezifische, über den gesamten Calyx hinweg verteilte Muster charakterisiert sind.

Das olfaktorische glomeruläre Aktivitätsmuster des Antennallobus könnte also in einer bisher unbekanntem Art und Weise, evtl. in Form einer Koinzidenzaktivierung, von den Projektionsneuronen auf den Pilzkörper übertragen werden, sodass diskrete Regionen der Kenyonzellen aktiviert werden. Das steht in Übereinstimmung mit anatomischen Studien die gezeigt haben, dass die Projektionsneurone stereotypische und räumlich definierte Verzweigungen im lateralen Protocerebrum ausbilden, und wahrscheinlich auch in höherer interindividueller Variabilität im Calyx (Wong et al., 2002; Marin et al., 2002).

## **5.6 *in – vivo* Imaging von Calcium – Signalen im lateralen Protocerebrum von *Drosophila melanogaster* mit dem genetisch codierten Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1**

Nachdem mit den Imaging – Experimenten an den Antennalloben und Calyces von *Drosophila* schon ein hauptsächlich postsynaptisches und ein hauptsächlich präsynaptisches Neuropil der Projektionsneurone untersucht werden konnte, lag es nahe, auch das dritte durch die GAL4 – Linie GH146 zugängliche Gehirnareal, das laterale Protocerebrum, zu untersuchen. Besonders spannend ist dieses Gehirnzentrum, weil ihm bisher in den Untersuchungen von duftinduzierter neuronaler Aktivität wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Die Experimente wurden mit homozygoten GH146 – UAS: Cameleon 2.1 – Tieren durchgeführt. Die durch Rekombination erstellten Fliegen tragen zwei Cameleon 2.1 – Konstrukte im Genom. Dadurch sollte die Sensorexpression in den Zellen verstärkt werden. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen homo – und heterozygoten Tieren in den EYFP – und ECFP – Intensitäten beobachtet werden (Daten nicht dargestellt). Jedoch scheinen die homozygoten Tiere detailgenauere EYFP – und ECFP – Bilder der untersuchten Gehirnareale zu liefern. Das könnte bedeuten, dass einige Neurone in den heterozygoten Tieren das Chameleon 2.1 – Protein nur schwach exprimieren,

wohingegen sie in den homozygoten Tieren eine stärkere Expression des Sensors aufweisen, was zu einer verbesserten Bildqualität führen könnte. Für diese Annahme gibt es zwei unterschiedliche Erklärungsansätze: Da es sich bei der Expression von Genen mit Hilfe des UAS – GAL4 – Systems schon um eine Überexpression handelt (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002), scheint eine Verdopplung der Cameleon2.1 – cDNA im Genom, keine erkennbare Erhöhung der Expression zu bewirken. Die Expression einer Kopie des Konstrukts scheint für die Zelle unbedenklich zu sein. Liegt eine zweite Kopie im Genom vor, muss die Expression also nicht zwangsläufig verdoppelt werden, sondern sie könnte auf ein für die Zelle physiologisch unbedenkliches Maß heruntergeregelt werden. Außerdem beschreiben Miyawaki et al. (1999), dass es bei einer starken Überexpression des Sensors zu Calciumpufferungseffekten kommt, d.h. dass das Calcium zwar gebunden wird, jedoch keine gesteigerte Fluoreszenz auftritt. Im Extremfall kann eine zu starke Cameleon 2.1 – Expression auch zu einer Reduktion der Fluoreszenz führen: Da das Fusionsprotein wie alle anderen Proteine auch einem Turn – Over unterzogen wird, liegt immer auch ein gewisser Bruchteil an gespaltenem Cameleon 2.1 – Protein in den Neuronen vor. Diese Fragmente können mit zellendogenem Calmodulin und Bindungsproteinen des Calmodulins Kreuzreaktionen eingehen. Als Effekt konnte eine Reduktion der gemessenen Ratiowerte in der Arbeit von Miyawaki aufgezeigt werden. Insgesamt können beide Erklärungsansätze als Argument dafür herangezogen werden, dass zwei Cameleon 2.1 – Konstrukte im Genom der Tiere keine signifikante Erhöhung der gemessenen Calciumsignale hervorrufen, aber, dass evtl. schwach exprimierende Neurone in heterozygoten Tieren durch das Vorhandensein von zwei Konstrukten in den homozygoten Tieren, eine Expressionsverstärkung erfahren.

Die durchgeführten Experimente belegen eindeutig, dass das *in – vivo* Imaging im lateralen Protocerebrum praktikabel ist. Für nahezu alle Verdünnungsstufen der 4 verwendeten Düfte Isoamylacetat, Benzaldehyd, Methylcyclohexanol und Ethylacetat konnten eindeutige Calciumsignale nachgewiesen werden. Am Ende jeder Messung wurde der “Duft“ von reinem Mineralöl als Negativkontrolle auf die Antennen der Versuchstiere appliziert (s.a. Kapitel 3.4.5.1.1). Da die Mineralölkontrolle immer nach dem am stärksten konzentrierten Duft gegeben wurde, evozierte sie in den meisten Fällen auch ein schwaches, aber deutliches Calciumsignal. Dies liegt daran, dass

noch Duftmoleküle vom vorherigen, hochkonzentrierten Duft im Applikator (Pasteurpipette) des Olfaktometers vorhanden waren. Diese Moleküle wurden vom Mineralölstrom mitgerissen und sind möglicherweise für die Signale verantwortlich. Die Mineralölkontrolle besitzt also keine Aussagekraft. Auf die Darstellung der Negativkontrolle im Ergebnisteil wurde deswegen verzichtet. Als erfolgreiche Negativkontrolle können jedoch die Graphen der Methylcyclohexanol – Messungen der Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  angesehen werden (s.a. Kapitel 4.6.2.1): Diese niedrig konzentrierte Lösung aus Methylcyclohexanol und Mineralöl evoziert keine Calciumsignale, d.h., dass auch das Lösungsmittel Mineralöl alleine keine Signale evoziert. Für zukünftige Experimente ist es also ratsam, die Mineralölkontrolle zu Beginn der Messungen durchzuführen. Alternativ kann die Negativkontrolle auch mit reiner Luft ausgeführt werden, da alterndes Mineralöl auch einen Eigengeruch annimmt.

Durch die Calcium Imaging Experimente konnte nachgewiesen werden, dass die Erhöhung der Duftkonzentration eine räumlichen Ausdehnung des aktivierten Neuropils im lateralen Protocerebrum zur Folge hat (s.a. Kapitel 4.6.1 und 4.6.2 + Anhang, Kapitel 9.2:  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster der Einzelmessungen). Dabei ist zu beachten, dass die dargestellte räumliche Signalausweitung nicht dem tatsächlichen Aktivitätszustand im lateralen Protocerebrum entsprechen muss: Die in dieser Arbeit dargestellten  $Ca^{2+}$  – Aktivitätsmuster zeigen bei niedrigen Duftkonzentrationen keine neuronale Aktivität in den peripheren Bereichen des lateralen Protocerebrums. Auch diese Areale könnten aktiv sein, evtl. liegen diese Aktivitäten jedoch unterhalb der Detektionsgrenze der Imaging – Apparatur. Aus demselben Grund kann auch nicht postuliert werden, dass mit steigender Duftkonzentration immer mehr Neurone des lateralen Protocerebrums zur olfaktorischen Codierung rekrutiert werden. Festzuhalten bleibt, dass die Erhöhung der Duftkonzentration mit einer messbaren räumlichen Ausweitung des antwortenden neuronalen Areals einhergeht.

Die EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten, die aus einer ROI (region of interest) im anterioren Bereich des lateralen Protocerebrums berechnet wurden, zeigen weiterhin, dass mit steigender Duftkonzentration auch die Stärke des Calciumsignals zunimmt. Dabei gibt es zwischen den 4 verschiedenen Düften statistisch signifikante Unterschiede: Methylcyclohexanol evoziert über den gesamten Verdünnungsbereich

die schwächsten Calciumsignale. Isoamylacetat evoziert in den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  die stärksten Ratiosignale (s.a. Kapitel 4.6.3, Abb. 4.17). Neben der räumlichen Ausweitung des Signals führt die Konzentrationserhöhung demnach auch zu einer gesteigerten Signalintensität, wobei sich die Signalintensitäten für verschiedene Düfte und Verdünnungsstufen unterscheiden können.

Aufgrund der Ergebnisse, die die Experimente zur olfaktorischen Codierung in den Antennalloben und Calyces liefern, könnte man auch für das laterale Protocerebrum eine räumliche Duftrepräsentation erwarten. Mit der verwendeten Versuchsanordnung und Datenauswertung, war es jedoch nicht möglich eine solche Repräsentation der 4 verschiedenen Düfte nachzuweisen. Die gefundenen  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster stellen sich zu einheitlich dar (s.a. Kapitel 9.2, Anhang). Grund hierfür ist zum einen die Anatomie des lateralen Protocerebrums: Die Neuronen bilden zwar stereotypische axonale Projektionen und Verzweigungen aus, die zwischen verschiedenen Individuen identisch sind. Dieses stereotypische Verzweigungsmuster ist jedoch durch eine starke Überlappung der einzelnen Projektionsneurone charakterisiert, welche zumeist ein großes Volumen im lateralen Protocerebrum einnehmen (Marin et al., 2002; Wong et al., 2002). Zum anderen konnten Perez – Orive et al. (2002) nachweisen, dass bei einem Duftstimulus ca. 60% der Projektionsneurone aktiviert werden. Ein Duftstimulus aktiviert also viele, im lateralen Protocerebrum räumlich schwer zu trennende Projektionsneurone – ein weiterer Umstand, der den optischen Nachweis einer räumlichen Musterkodierung nicht zuließ. Zukünftige Experimente mit evtl. verbesserter Datenauswertung können diese Fragestellung jedoch erneut angehen.

Untersuchungen an den Rezeptorneuronen des Zebrafisches (Vertebrata) ergaben, dass verschiedene Düfte und Duftkonzentrationen im glomerulären Code des olfaktorischen Bulbus codiert werden. Appliziert man einen bestimmten Duft mit steigender Konzentration, so steigt auch die Signal – Komplexität an. Bei niedriger Konzentration ( $10^{-7}$  M) kann kein Duft eine glomeruläre Antwort evozieren, mit steigender Konzentration nimmt die Anzahl aktivierter Glomeruli zu. In den mittleren Konzentrationsbereichen ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  M) ist die Duftcodierung am eindeutigsten. Bei hohen Konzentrationen ( $10^{-2}$  M) werden sich die glomerulären Muster verschiedener Düfte immer ähnlicher (Friedrich und Korsching, 1997; Fuss und Korsching, 2001).

D.h. mit steigender Konzentration rekrutieren die Düfte immer mehr Glomeruli, wobei das spezifische Grundmuster eines Duftes erhalten bleibt. Die Rezeptoren für einen bestimmten Duft müssen also unterschiedliche Affinitäten besitzen. Nur so kann ein Duft ein kombinatorisches Muster evozieren, das aus mehreren Glomeruli besteht (Friedrich und Korsching, 1997). Rubin et al. (1999) kommt bei Imaging – Experimenten am olfaktorischen Bulbus der Ratte (Vertebrata) zu denselben Ergebnissen: Individuelle Glomeruli zeigen unterschiedliche Sensitivitäten, d.h. Konzentrationserhöhung führt zu einem Anstieg an aktivierten Glomeruli. Die Sensitivität individueller Glomeruli hängt von der Affinität der mit ihm verschalteten Rezeptorneurone ab: Eine Gruppe von Rezeptoren zeigt eine hohe Affinität zu einem bestimmten Duft, wird also schon bei niedrigen Konzentrationen aktiv und aktiviert so den nachgeschalteten Glomerulus. Steigt die Konzentration werden weitere Gruppen von Rezeptoren aktiv, die eine geringere Affinität zum entsprechenden Duft besitzen. Sie aktivieren dann weitere Glomeruli. Dasselbe Prinzip der Duftkonzentrationscodierung konnte auch für die Projektionsneurone der Honigbiene (Invertebrata) nachgewiesen werden (Sachse und Galizia, 2003): Steigende Duftkonzentration führt zu einer Zunahme an aktiven Glomeruli. Dabei nehmen auch die Signalintensität und die Signaldauer zu. Das bedeutet zum einen, dass auch hier der räumliche glomeruläre Code in der Lage ist, unterschiedliche Düfte über ein breites Konzentrationsband zu codieren, und zum anderen, dass auch eine zeitliche Komponente der olfaktorischen Codierung existiert. Unterstützt wird diese Aussage von elektrophysiologischen Untersuchungen an den Projektionsneuronen der Heuschrecke (Stopfer et al., 2003), durch die gezeigt wurde, dass eine Konzentrationssteigerung mit einer zeitlichen Änderung des Feuermusters einhergeht. Calcium – Imaging Experimente an den Projektionsneuronen von *Drosophila* mit der Fliegenlinie GH146 (Wang et al., 2003) konnten zeigen, dass die meisten niedrig konzentrierten Düfte keine duftspezifischen glomerulären Muster evozieren können. Mit steigender Konzentration nimmt auch hier die Anzahl an aktiven Glomeruli zu. Im mittleren Konzentrationsbereich ist die olfaktorische Codierung am effektivsten, die glomerulären Muster verschiedener Düfte lassen sich klar trennen. Bei hohen Konzentrationen sind so viele Glomeruli aktiv, dass sich die Muster immer ähnlicher werden, eine Duftunterscheidung wird deutlich schwieriger. Insgesamt zeigen die Ergebnisse bei Vertebraten und Invertebraten, dass die Projektionsneurone die Information für Duftidentität und – konzentration aus dem

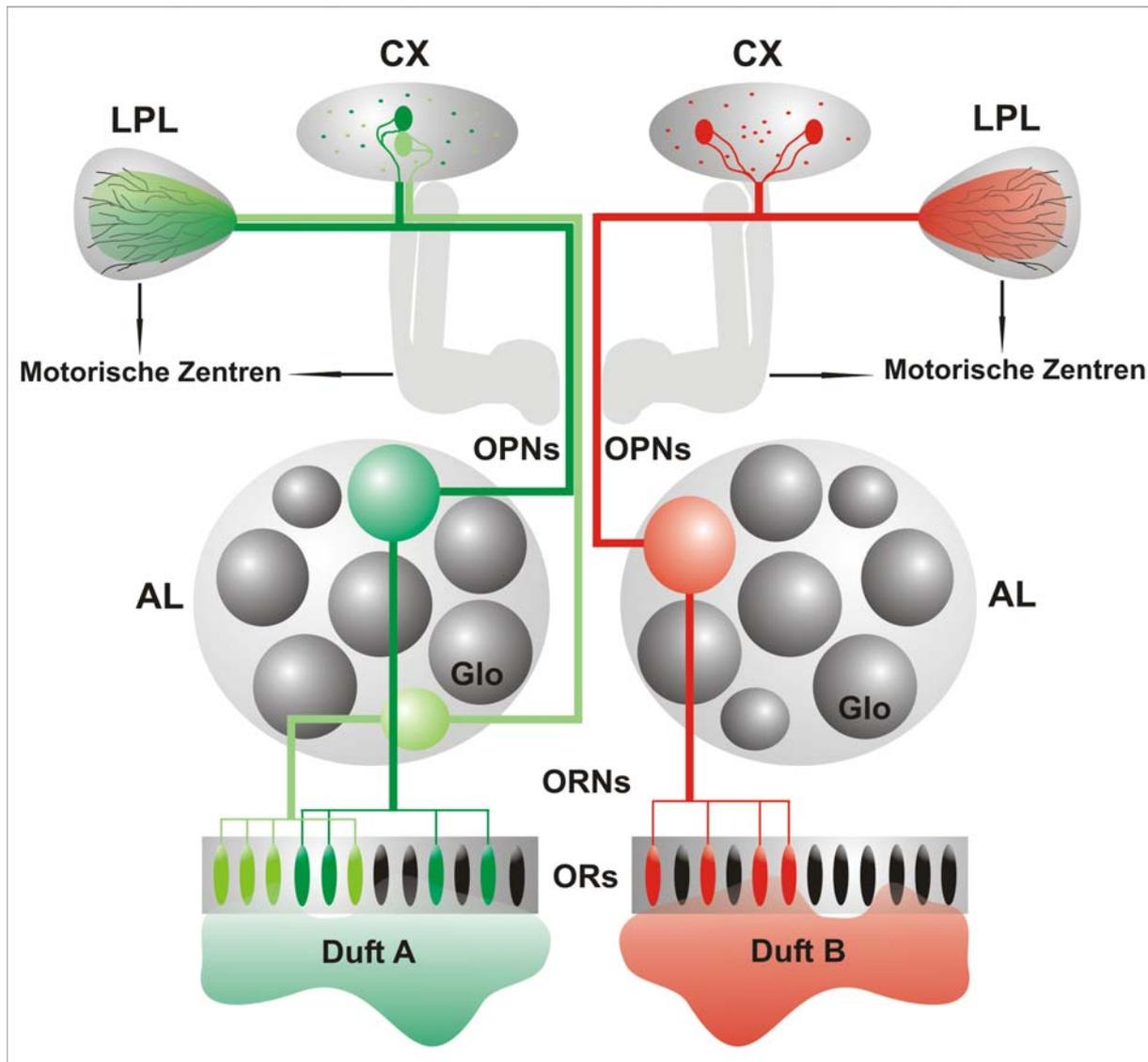
Antennallobus abgreifen und an die höheren Gehirnzentren weiterleiten. Für den Calyx von *Drosophila* konnte in dieser Arbeit eine Übertragung des räumlichen Glomerulären Codes auf das präsynaptische Neuropil des Pilzkörpers nachgewiesen werden. Aus den bereits beschriebenen Gründen konnten in den Projektionsneuronen des lateralen Protocerebrum keine solchen duftspezifischen räumlichen Aktivitätsmuster gefunden werden. Ähnlich wie die durch andere Arbeiten nachgewiesene Zunahme an aktivierten Glomeruli im Antennallobus, zeigen auch die für diese Arbeit durchgeführten Messungen am lateralen Protocerebrum eine Zunahme des antwortenden Areals bei Konzentrationserhöhung der applizierten Düfte. Durch die konzentrationsabhängige Zunahme an aktiven Glomeruli sollten aufgrund der anatomischen Stereotypie des olfaktorischen Systems mehr Projektionsneurone rekrutiert werden. Dies äußert sich sehr wahrscheinlich, in einer gesteigerten Aktivierung von individuellen, duft – und konzentrationspezifischen Projektionsneuronen im lateralen Protocerebrum. Diese Hypothese spricht also für eine räumliche Codierung von Düften und Duftkonzentrationen im lateralen Protocerebrum. Bestätigt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass mit steigender Duftkonzentration auch die Stärke des Calciumsignals im lateralen Protocerebrum zunimmt und, dass unterschiedliche Düfte unterschiedlich starke Signalintensitäten bei den jeweiligen Verdünnungsstufen evozieren. Zum einen könnten die steigenden Signalintensitäten im lateralen Protocerebrum bei steigender Duftkonzentration, die steigenden Signalintensitäten der neu rekrutierten Glomeruli im Antennallobus (Sachse und Galizia, 2003) widerspiegeln, zum anderen könnte man sich in einer weiteren hypothetischen Näherung, die signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten verschiedener Düfte bei den jeweiligen Verdünnungsstufen als physiologisch notwendigen Filtermechanismus vorstellen: Angenommen ein für die Fliege bedeutungsloser Duft A evoziert in den Antennalloben evtl. nur ein schwaches glomeruläres Muster von wenigen Glomeruli, dann äußert sich das im lateralen Protocerebrum in einem kleinen, schwach aktiven präsynaptischen Bereich der Projektionsneurone. Ein physiologisch bedeutender Duft B evoziert bei gleicher Konzentration ein signalstarkes glomeruläres Muster von mehreren Glomeruli. Als Resultat wäre im präsynaptischen Neuropil des lateralen Protocerebrums ein größeres Areal aktiv, das stärkere Signalintensitäten aufweist. Eine weitere Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeit von Sachse und Galizia (2003) am postsynaptischen Neuropil des Bienen – Antennallobus, ist die

Tatsache, dass mit steigender Duftkonzentration auch die Calciumsignaldauer im lateralen Protocerebrum ansteigt. Wie die eingehende olfaktorische Information im lateralen Protocerebrum postsynaptisch weiterverarbeitet wird, kann mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Dazu ist es notwendig weitere Experimente mit der neu etablierten Technik durchzuführen.

## **5.7 Modell der olfaktorischen Informationsverarbeitung für *Drosophila***

Das im Folgenden für *Drosophila* beschriebene Modell der olfaktorischen Informationsverarbeitung soll eine Zusammenfassung einiger Ergebnisse dieser Arbeit darstellen. Es beschränkt sich auf das Prinzip der Duftrepräsentation, das beispielhaft für zwei fiktive Düfte A und B erläutert wird. Die Ergebnisse werden in einer stark reduzierten Form präsentiert, erheben also keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Die Codierung der olfaktorischen Information beginnt auf der Ebene der olfaktorischen Rezeptoren, die in den entsprechenden Epithelien der Antennen und Maxillarpalpen lokalisiert sind. Jedes Rezeptorneuron exprimiert ein bestimmtes Rezeptorprotein. Rezeptorneurone, die dasselbe Rezeptorprotein exprimieren, bilden eine funktionelle Gruppe. Die Rezeptorproteine unterschiedlicher funktioneller Gruppen besitzen unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Düfte, d.h. es liegt schon hier ein kombinatorischer Code vor: Rezeptorneurone einer Gruppe können von verschiedenen Düften unterschiedlich stark aktiviert werden (Gesteland, 1965; Sicard und Holley, 1984, Sato et al., 1994), und ein Duft kann verschiedene Gruppen von Rezeptorneuronen unterschiedlich stark aktivieren (Malnic et al., 1999). In Abb. 9.1 ist dies für zwei fiktive Düfte A und B dargestellt: Duft A (linke Seite) aktiviert zwei Gruppen von Rezeptoren, davon wird eine Gruppe stärker aktiviert (dunkelgrün), die zweite Gruppe schwächer (hellgrün). Duft B (rechte Seite) aktiviert eine weitere Gruppe von Rezeptoren (rot). Der kombinatorische Code der Rezeptoren wird von den Rezeptorneuronen auf einen kombinatorischen präsynaptischen glomerulären Code im Antennallobus übertragen. Duft A aktiviert so zwei Glomeruli, davon wird ein Glomerulus stärker aktiviert (dunkelgrün), der zweite Glomerulus schwächer (hellgrün). Duft B aktiviert einen anderen Glomerulus (rot). Die Düfte werden auf der



**Abb 9.1** Modell der kombinatorischen Duftrepräsentation für *Drosophila melanogaster*

Die Abbildung zeigt die kombinatorische Duftencodierung für zwei fiktive Düfte A (grün) und B (rot). Die Encodierung von Duft A ist auf der linken Seite der Abbildung dargestellt, von Duft B auf der rechten Seite. Es handelt um zwei getrennte Vorgänge, die nicht gleichzeitig im Fliegenhirn ablaufen, sondern isoliert betrachtet werden müssen. ORs = olfaktorische Rezeptoren, ORNs = olfaktorische Rezeptorneurone, AL = Antennallobus, Glo = Glomerulus, OPNs = olfaktorische Projektionsneurone, CX = Calyx, LPL = laterales Protocerebrum. Man beachte, dass Duft A zwei Gruppen von Rezeptoren unterschiedlich stark aktiviert (dunkelgrün = starke Aktivierung, hellgrün = schwache Aktivierung). Daraus resultieren in der Folge unterschiedlich starke Aktivierungen in den nachgeschalteten Gehirnzentren. Zur genauen Erklärung der Abb. siehe Text.

Ebene der Antennalloben also durch einen räumlichen glomerulären Code repräsentiert und so diskriminiert. Die nachgeschalteten postsynaptischen Projektionsneurone können diesen Code aufnehmen und ihn an die höheren Gehirnzentren weiterleiten. Sie ziehen über den inneren Antennocerebraltrakt zum lateralen Protocerebrum, wobei sie en passant den Calyx innervieren. Hier

übertragen die Projektionsneurone den glomerulären Code, d.h. die Duftidentität, auf ein kombinatorisches, räumliches Aktivitätsmuster im präsynaptischen Neuropil des Calyx, der Eingangsregion des Pilzkörpers. Die auftretenden Aktivitätsmuster zeichnen sich durch Calciumsignale aus, die über das gesamte Calyxareal scheinbar diffus verteilt sind. Sie weisen jedoch hoch duftspezifische Signalarale auf, die auch als Hot Spots bezeichnet werden. Duft A evoziert eine neuronale Aktivität im zentralen Bereich des Calyx (grün + hellgrün), Duft B ist durch bilateral auftretende Hot Spots codiert (rot). Somit steht den postsynaptischen Kenyonzellen des Calyx die Duftidentität zur Weiterverarbeitung zur Verfügung. Die axonalen Endigungen der Projektionsneurone verzweigen sich im lateralen Protocerebrum stark und bilden dort ein komplexes neuronales Netzwerk aus. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass auch hier eine kombinatorische, räumliche Codierung der Düfte vorliegt. Da dies mit den Calcium – Imaging Experimenten aber nicht optisch auflösen war, ist das "Aktivitätsmuster" für beide Düfte A und B (grün und rot) als einheitliches Signal über das gesamte Areal des lateralen Protocerebrums dargestellt. Sowohl der Pilzkörper als auch das laterale Protocerebrum stehen über weitere Neuronen mit den motorischen Zentren der Fliege in Kontakt (Heimbeck et al., 2001). Dies spricht dafür, dass beide Gehirnzentren am olfaktorischen Verhalten beteiligt sind.

## 5.8 Perspektiven

Mit dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, einen genetisch codierten Calciumsensor zu exprimieren und *in – vivo* im olfaktorischen System von *Drosophila* zu testen. Die durchgeführten physiologischen Experimente geben neue, wichtige Einblicke in die olfaktorische Informationsverarbeitung im Fliegengehirn. Dennoch befindet sich diese junge Disziplin der Neurobiologie noch in den ersten Zügen, dies gilt vor allem für *Drosophila*. Aufgrund der steigenden Anzahl von bereits entwickelten Sensoren, bietet sich für zukünftige Untersuchungen ein weites Feld von Möglichkeiten an. Im Folgenden möchte ich mich jedoch auf die für unseren Lehrstuhl relevanten Perspektiven beschränken.

Für die Antennalloben und die präsynaptische Eingangsregion des Pilzkörpers, dem Calyx, konnte ein kombinatorisches, duftspezifisches räumliches Aktivitätsmuster

nachgewiesen werden. Obwohl alles dafür spricht, dass es im lateralen Protocerebrum ähnlich sein sollte, konnte dieser Nachweis hier nicht geführt werden. Hauptgrund ist die hochkomplexe Anatomie dieses Gehirnareals. Weitere Experimente sollten deswegen nicht mehr mit GAL4 – Linien wie der GH146 – Linie durchgeführt werden. Sie exprimiert den Calciumsensor in zu vielen Projektionsneuronen. Besser wäre es GAL4 – Linien zu verwenden, die nur in einem oder zwei distinkten Glomeruli und den dazugehörigen Projektionsneuronen exprimieren. Der Vorteil liegt auf der Hand: Durch Tests solcher Linien können spezifischen Glomeruli distinkte Düfte zugeordnet, und die wenigen so aktivierten Projektionsneurone im lateralen Protocerebrum auch räumlich voneinander unterschieden werden; dies wäre ein nächster wichtiger Schritt in der Aufklärung der olfaktorischen Codierung im lateralen Protocerebrum.

Für die Codierung unterschiedlicher Duftkonzentrationen im lateralen Protocerebrum konnte nachgewiesen werden, dass mit steigender Duftkonzentration auch die Signalstärke und das antwortende Areal zunimmt. Ähnliche Versuche können auch am Antennallobus und am Calyx von *Drosophila* durchgeführt werden. Interessant ist hier die Fragestellung, ob sich die Ergebnisse der Antennallobenexperimente anderer Organismen bestätigen: Eine Zunahme der Konzentration sollte sich auch bei *Drosophila* in einer steigenden Rekrutierung von zusätzlichen duftspezifischen Glomeruli äußern. Mit dem Einsatz weiterer GAL4 – Linien können andere wichtige Fragestellungen angegangen werden: Verwendet man GAL4 – Linien, die in den Kenyonzellen des Pilzkörpers exprimieren, kann die Frage nach der Informationsweitergabe von den präsynaptischen Projektionsneuronen auf die postsynaptische Eingangsregion der Pilzkörper bearbeitet, und das Modell des Pilzkörpers als Koinzidenzdetektor untersucht werden. Erste Experimente am Lehrstuhl haben schon gezeigt, dass Calciumsignale in den Pilzkörpern messbar sind. Ein anderes Projekt beschäftigt sich mit dem Zentralkomplex des Fliegenhirns: Mit einer GAL4 – Linie, die im Zentralkomplex exprimiert, sollen Verhaltensexperimente durchgeführt werden. Dazu wird bereits eine Apparatur entwickelt, bei der die Fliege, ähnlich wie bei optomotorischen Versuchen, auf einem frei schwebenden Ball sitzt, den sie in alle Richtungen bewegen kann. Die Fliege kann so auf aversive oder attraktive Düfte mit einem entsprechenden Laufverhalten antworten. Durch Calcium – Imaging können dabei die neuronalen Vorgänge im

Zentralkomplex sichtbar gemacht werden. Weitere klassische Experimente zur olfaktorischen Codierung, wie sie schon an anderen Tieren durchgeführt wurden, sind ebenfalls denkbar: So könnte auf der Ebene der Antennalloben, Calyces und lateralem Protocerebrum, die Codierung von unterschiedlichen funktionellen chemischen Gruppen (Aldehyde, Ketone, Alkohole, Carbonsäuren, Alkane), und der Einfluss der Kettenlängen dieser Moleküle, untersucht werden. Im Gegensatz zu diesen meist unphysiologischen Düften, wäre auch die olfaktorische Codierung von natürlichen verhaltensrelevanten Düften, wie z. B. Pheromonen, eine interessante Aufgabenstellung.

Für die Zukunft steht also eine große Auswahl an möglichen Projekten zur Verfügung. Für alle eventuellen Projekte gilt jedoch, dass der Erfolg der Experimente in einem hohen Maße von der *in vivo* Präparation der Fliegen und der Datenaufnahme bzw. -darstellung abhängt. Für die *in vivo* Präparation gilt, dass die Lebensdauer der präparierten Tiere durch eine permanente Sauerstoffzufuhr in die Ringerlösung verbessert werden könnte. Dazu ist es notwendig, eine komplett neue Präparationskammer zu entwickeln, die den entsprechenden Anforderungen genügt. Für die experimentell aufgenommenen Daten gilt, dass Veränderungen in der optischen Darstellung der Ratiosignale eine bessere räumliche Auflösung zur Folge haben können: So können die Bildattribute und die eingesetzten optischen Filter so gewählt werden, dass die resultierenden aktiven Areale mit den morphologischen Funktionseinheiten des untersuchten Gehirnareals übereinstimmen. Beispielsweise können durch Reduktion der Fenstergrößen von Low Pass – und Median – Filter, die Aktivitätsspotspots im Calyx auf die Größe von individuellen Boutons angepasst werden. Das resultierende Aktivitätsmuster wird dadurch zwar sehr viel komplexer, spiegelt jedoch die vorliegende Anatomie der neuronalen Verschaltung bedeutend besser wider. Zur Kontrolle der Morphologie können die nach jeder Messung angefertigten z – Stacks dekonvuliert und mit den Aktivitätsspotspots eines entsprechenden Aktivitätsmusters verglichen werden. Auf lange Sicht gesehen ist für eine detailgenaue Darstellung der neuronalen Aktivität auch der Einsatz der 2 – Photonen – Mikroskopie sicher lohnenswert.

Einen zweiten methodischen Ansatz bietet die Verwendung von weiteren Calciumsensoren wie z.B. Yellow Cameleon 3.1 oder 6.1, die sich durch deutlich

größere Calciumsignale auszeichnen. Der Vorteil dieser Sensoren sollte also im besseren Signal – zu – Rausch – Verhältnis liegen, ein Umstand, der auch den Einfluss von mechanischen Bewegungsartefakten auf die Messungen verringern würde. Interessant wäre auch der Einsatz eines weiteren Sensors, dem Clomeleon (Kuner und Augustine, 2000). Es arbeitet ähnlich wie ein Cameleon, detektiert die synaptische Aktivität jedoch über die Veränderungen der Chloridionen – Konzentration. In ganz neue Felder kann man durch den Einsatz des ART – Sensors vorstoßen. Er misst den intrazellulären Phosphorylierungsgrad. Phosphorylierungen spielen bei den unterschiedlichsten Prozessen auf zellulärer Ebene – von Signaltransduktion bis hin zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren – eine herausragende Rolle. In der Einleitung wurde bereits auf die elementare Funktion der Phosphorylierung im Prozess des Lernens eingegangen. Es ist geplant Fliegen, die diesen Sensor exprimieren, während Lernexperimenten mit einer Imaging – Apparatur zu untersuchen um so den exakten Ort und den Zeitpunkt der PKA – Aktivierung zu bestimmen.

Dieser kurze, allgemein gehaltene Abriss über mögliche zukünftige Experimente und Fragestellungen verdeutlicht das stetig wachsende Potential dieser Technik für viele Bereiche der Neurobiologie und darüber hinaus.

## 6. Zusammenfassung

Die Messung der räumlich aufgelösten Aktivität von neuronalen Zellverbänden ist ein wichtiges Werkzeug, um die Funktionsweise von Gehirnen zu verstehen. Für diese Arbeit diente die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit ihrer gut beschriebenen Genetik und Neurobiologie als Untersuchungsobjekt. Bei der vorgelegten Arbeit lag eine zweigeteilte Aufgabenstellung vor: Zum einen wurde die Technik des *in vivo* Calcium – Imagings mit Hilfe des genetisch codierten Sensors Yellow Cameleon 2.1 am Lehrstuhl komplett neu etabliert, zum anderen wurde mit der neuen Technik das Zusammenspiel der funktionellen Elemente neuronaler Systeme anhand der Fliegenolfaktorik untersucht.

Im Zuge der Etablierungsarbeit ist es gelungen, eine *in vivo* Präparation zu entwickeln, die einen optischen Zugang zum Fliegengehirn gewährleistet. Die präparierten Tiere zeigen ein qualitativ unbeeinträchtigtes optomotorisches Verhalten. Zusammen mit den erfolgreichen olfaktorischen Imaging – Experimenten, kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die *in vivo* Präparation die Funktion des Fliegengehirns nicht nachhaltig beeinträchtigt. Neben einer verlässlichen Präparation, konnte auch eine Imaging – Apparatur mitsamt der dazugehörigen Datenaufnahme – und Datendarstellungssoftware etabliert werden. Eine der Hauptaufgaben war hierbei die Entwicklung von Bildverarbeitungstechniken, die es erlauben, die gemessenen Daten zu interpretieren und optisch darzustellen. Zum ersten Nachweis für die erfolgreiche Etablierung der *in vivo* Calcium – Imaging Technik, wurden Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid (KCl) durchgeführt: Die KCl – induzierte intrazelluläre Zunahme von Calciumionen im lateralen Protocerebrum von *Drosophila* ergab hierbei Calciumsignale mit einer Erhöhung der Ratio EYFP / ECFP um bis zu 18%.

Sowohl die Experimente zur Depolarisation durch KCl, als auch die Experimente zur olfaktorischen Codierung, wurden mit dem Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1 durchgeführt. Es wurde ausgehend von der Vorgängerversion Yellow Cameleon 2.0 durch gezielte Mutagenese von Sören Diegelmann erstellt. Eine Photomultiplier – basierte *in vitro* Funktionsanalyse des rekombinanten Sensorproteins ergab eine Zunahme der Ratio EYFP / ECFP mit steigender Calciumkonzentration. Dabei

konnte auch der ratiometrische FRET – Effekt des Cameleons verdeutlicht werden: Mit steigender Calciumkonzentration verschiebt sich das Verhältnis von EYFP – Fluoreszenz zu ECFP – Fluoreszenz zu höheren Ratiowerten. Durch Zugabe des Calciumchelators EGTA konnte außerdem die reversible Arbeitsweise des Sensors nachgewiesen werden.

Das in die Fliege eingebrachte Yellow Cameleon 2.1 – Konstrukt wurde mittels der GAL4 – UAS – Technik in verschiedenen olfaktorischen Gehirnzentren exprimiert. Von besonderer Relevanz für die Experimente zur olfaktorischen Codierung war dabei die GAL4 – Treiberlinie GH146. Mit ihrer Hilfe konnte das Fusionsprotein in den olfaktorischen Projektionsneuronen des Fliegengehirns exprimiert, und so die Duftrepräsentation im postsynaptischen Neuropil der Antennalloben bzw. in den präsynaptischen Neuropilen der Calyces und des lateralen Protocerebrums untersucht werden: Die Stimulation von 3 individuellen Fliegen mit den Düften Benzaldehyd, Isoamylacetat und Octanol liefert duftspezifische neuronale Aktivitätsmuster im **Antennallobus**. Die auf die Duftstimuli mit Calciumsignalen reagierenden Areale haben eine Größe von 10 – 30  $\mu\text{m}$ , liegen also in der Größenordnung von individuellen Glomeruli. Die Duftrepräsentation in den Antennalloben zeigt außerdem einen kombinatorischen Aspekt: Jeder Duft evoziert ein charakteristisches Aktivitätsmuster bestehend aus einem oder mehreren Glomeruli. Die Aktivitätsmuster verschiedener Düfte können sich überlagern, d.h. individuelle Glomeruli können durch verschiedene Düfte aktiviert werden, das gesamte Aktivitätsmuster, d.h. die Summe der aktivierten Glomeruli eines bestimmten Duftes, ist jedoch charakteristisch. Die Duftrepräsentation in den Antennalloben von *Drososophila* geschieht also in Form eines glomerulären Codes, ein Prinzip der Duftverarbeitung, das auch in anderen Insekten und Vertebraten nachgewiesen werden konnte. Für den **Calyx** des Pilzkörpers ergaben sich innerhalb eines Individuums, bei wiederholter Stimulation mit demselben Duft, ebenfalls duftspezifische Aktivitätsmuster. Dabei waren die auf den Duftstimulus hin antwortenden neuronalen Areale diskret über den Calyx hinweg verteilt. Insgesamt zeigt das hohe Maß an Reproduzierbarkeit der Aktivitätsmuster für einen gegebenen Duft, dass im Calyx, wie in den Antennalloben, eine duftspezifische räumliche Repräsentation vorliegt. Der kombinatorische Aspekt der Codierung konnte auch hier beobachtet werden. Die einzelnen Spots der im Calyx gemessenen Aktivitätsmuster liegen in der

Größenordnung von  $5 \pm 2 \mu\text{m}$  und entsprechen somit in ihrer Größe den elektronenmikroskopisch beschriebenen Microglomeruli. Durch die Calcium – Imaging Experimente am **lateralen Protocerebrum** konnte nachgewiesen werden, dass die Erhöhung der Duftkonzentration eine räumliche Ausdehnung des aktivierten Neuropils zur Folge hat. Die EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten, die aus einer “Region of Interest“ im anterioren Bereich des lateralen Protocerebrums berechnet wurden, zeigen weiterhin, dass mit steigender Duftkonzentration auch die Stärke des Calciumsignals zunimmt. Dabei gibt es zwischen den 4 getesteten Düften statistisch signifikante Unterschiede: Methylcyclohexanol evoziert über den gesamten Verdünnungsbereich hinweg die schwächste neuronale Aktivität, Isoamylacetat evoziert in den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  die stärkste neuronale Aktivität. D.h. neben der räumlichen Ausdehnung des Signals, führt die Konzentrationserhöhung auch zu einer gesteigerten Intensität des Calciumsignals, wobei sich die Signalintensitäten für verschiedene Düfte und Verdünnungsstufen unterscheiden können. Mit der verwendeten Versuchsanordnung und Datenauswertung, war es jedoch bislang nicht möglich eine räumliche Repräsentation der Düfte im lateralen Protocerebrum nachzuweisen. Die erfolgreiche Etablierung des Calcium – Imagings verspricht jedoch für zukünftige Experimente neue Einblicke in bisher ungelöste Fragestellungen.

## 7. Summary

Measuring the spatiotemporal activity of neuronal cell populations is an important tool towards a further understanding of brain functions. This thesis investigates the brain activity of the model system *Drosophila melanogaster* with its well described genetics and neurobiology, thereby consisting of two major parts: On the one hand the *in vivo* Calcium – Imaging technique by means of the genetically encoded sensor Yellow Cameleon 2.1, had to be newly established in our laboratory, on the other hand the interaction of functional elements within the neuronal olfactory pathway of the fruitfly was to be examined using this new technique.

We managed to establish an *in vivo* preparation allowing optical access to the fly brain. The dissected animals showed a qualitatively unimpaired optomotoric response such that, together with the successful olfactory Imaging experiments, it can be assumed that the *in vivo* preparation does not impair the function of the fly's brain substantially. Apart from a reliable preparation, the Calcium – Imaging set up with pertinent data acquisition and – presentation software could be established as well. Within this reference, one major task was the development of image processing techniques, permitting an interpretation and optical representation of the acquired data. As a first proof for the successful establishment of the *in vivo* Calcium – Imaging technique, the experiments on systemic depolarization were accomplished: The measured KCl – induced intracellular increase of Calcium ions in the lateral protocerebrum of *Drosophila* resulted in a change of the Calcium signal of up to 18%.

Both the experiments on KCl – induced depolarization and the experiments on olfactory coding were accomplished with the Yellow Cameleon 2.1 sensor. This molecular probe was generated by Sören Diegelmann by targeted *in vitro* mutagenesis of the previous version Yellow Cameleon 2.0. A photomultiplier based *in vitro* functional analysis of the recombinant sensor protein resulted in an increase of Calcium signals with rising Calcium ion concentrations, thereby revealing the ratiometric FRET effect of the Cameleons: With rising Calcium concentration the relationship between EYFP – fluorescence and ECFP – fluorescence shifts towards higher ratio values EYFP / ECFP. By application of the Calcium chelator EGTA the reversible function of the sensor could be demonstrated as well.

By means of the GAL4 – UAS – technique, the Yellow Cameleon 2.1 construct transformed into the fly's germline could be expressed in different olfactory brain centers. In the present work the GAL4 – strain GH146 was of special relevance for the experiments on olfactory coding. The GH146 – driven Cameleon 2.1 line expresses the sensor protein in olfactory projection neurons of the fly's brain and therefore permits the examination of odorant coding within the postsynaptic neuropile of the antennal lobes, the presynaptic neuropiles of the calyces and the lateral protocerebrum, respectively: The stimulation of 3 individual flies with the odorants benzaldehyde, isoamylacetate and octanol revealed odorant – specific spatial activity patterns within the **antennal lobes**. The areas activated by the odorant stimulation were of similar size as individual glomeruli (~10 – 30  $\mu\text{m}$ ). The glomerular – like odor representation in the antennal lobes shows a combinatorial aspect: Each odorant induces a characteristic activity pattern consisting of one or more glomeruli. Activity patterns evoked by different odorants can overlap, i.e. individual glomeruli can be activated by different odorants. In spite of from this combinatorial aspect, the activity pattern for a given odorant remains specific. Odorants are therefore represented in a glomerular code within the antennal lobes of *Drosophila*. The glomerular code represents an olfactory processing principle which could be demonstrated for other insects and vertebrates as well. Repeated stimulation of an individual fly with the same odorant revealed that intraindividual optical recordings from the mushroom body **calyx** were reproducible and generated odorant – specific activity patterns as well. The response patterns to different odorants were clearly spatially organized, with discrete areas of activity distributed over the calyx area. The reproducibility of the different patterns strongly suggest that odorant representations within the calyx are spatially specific, i. e. the spatial glomerular code of the antennal lobes could be somehow transformed into a spatial odorant – specific activity pattern in the calyx. Interestingly, the combinatorial aspect of olfactory encoding could be seen in the calyces as well. The spots of activity observed in the calyx are within the range of 5 +/- 2  $\mu\text{m}$  and thus correspond in size to the boutons forming the presynaptic part of the so called microglomeruli described by electron microscopy. The Calcium – Imaging experiments at the level of the **lateral protocerebrum** showed a spatial expansion of the activated neuropiles with increasing odorant concentrations. The EYFP – , ECFP – intensities and their ratio values, which were computed from a region of interest within the anterior range of the lateral protocerebrum, reveal an

---

increase in signal intensity with rising odorant concentrations. Within this reference the 4 odorants examined show statistically significant differences: methylcyclohexanol evoked the weakest Calcium signals over the entire dilution range, isoamylacetate evoked the strongest Calcium signals at the dilutions  $10^{-3}$  and  $10^{-1}$ . This means that apart from the spatial expansion of the signal, the concentration increase leads to an increase in signal intensity, while the signal intensities for different odorants at a given dilution can differ. However, using the described experimental assembly and data evaluation, it was not possible to prove a spatial odorant representation within the lateral protocerebrum. Improved future experiments can address these questions again.

## 8 Literaturverzeichnis

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin G.M., und

Venter, J.C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287 (5461), 2185-95.

Baird, G.S., Zacharias, D.A., und Tsien, R.Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96 (20), 11241-11246.

Ballinger, D.G., und Benzer, S. (1989). Targeted gene mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9402-9406.

Ben-Arie, N., Lancet, D., Taylor, C., Khen, M., Walker, N., Ledbetter, D.H., Carrozzo, R., Patel, K., Sheer, D., Lehrach, H., und North, M.A. (1994). Olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17: possible duplication of an ancestral receptor repertoire. *Hum. Mol. Genet.* 3, 229-235.

Benson, J.A., Schürmann, F., Kaufmann, L., Gsell, L., und Piek, T. (1992). Inhibition of dipteran larval neuromuscular synaptic transmission by analogues of philanthotoxin-4.3.3: a structure-activity study. *Comp. Biochem. Physiol.* 120C, 267-272.

Benzer, S., Quinn, W.G., und Harris, W.A. (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 708-712.

Berridge, M.J. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* 21, 13-26.

Bollag, D.M., Rozycki, M. D., und Edelstein S.J. (1996). Bradford Assay. In: Bollag, D.M., Rozycki, M. D., und Edelstein S.J. (Ed.): *Protein Methods*, second edition, 62-67. London-New York: Wiley-Liss, Inc..

Brand, A.H., und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118 (2), 401-415.

Broadwell, M.D., und Cataldo, A.M. (1984). The neuronal endoplasmatic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system. II. Axons and terminals. *J. Comp. Neurol.* 230, 231-248

Buchner, E. (1976). Elementary movement detectors in an insect visual system. *Biol. Cybern.* 24, 85-101.

Buchner, E., und Buchner, S. (1980). Mapping stimulus-induced nervous activity in small brains by [<sup>3</sup>H]2-deoxy-D-glucose. *Cell. Tissue Res.* 211 (1), 51-64.

Buck, L., und Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187.

Burchiel, S.W., Edwards, B.S., Kuckuck, F.W., Lauer, F.T., Prossnitz, E.R., Ransom, J.T., und Sklar, L.A. (2000). Analysis of free intracellular calcium by flow cytometry: multiparameter and pharmacologic applications. *Methods* 21, 221-230.

Carlsson, M.A., Galizia, C.G., und Hansson, B.S. (2002). Spatial representation of odours in the antennal lobe of the moth *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Senses.* 27(3), 231-244.

Clyne, P.J., Warr, C.G., und Carlson, J.R. (2000). Candidate Taste Receptors in *Drosophila*. *Science* 287, 1830-1834.

Crittenden, J.R., Skoulakis, E.M., Han, K.A., Kalderon, D., Davis R.L. (1998). Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn. Mem.* 5 (1-2), 38-51.

Dalby, B., Pereira, A.J., und Goldstein, L.S.B. (1995). An Inverse PCR Screen for the Detection of P- Element Insertions in Cloned Genomic Intervals in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139, 757-766.

de Belle, J.S., Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263 (5147), 692-695.

Diegelmann, S. (2004). Molekulare und phänotypische Charakterisierung von *Drosophila melanogaster* Synapsin Mutanten und In-vivo Calcium Imaging. Dissertationsschrift. Fakultät für Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Diegelmann, S., Fiala, A., Leibold, C., Spall, T., und Buchner, E. (2002). Transgenic flies expressing the fluorescence calcium sensor Cameleon 2.1 under UAS control. *Genesis* 34, 95-98.

Duffy, J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34, 1-15.

Estes, P.S., Roo, J., van der Blik, A., Kelly, R.B., Krishnan, K.S. und Ramaswami, M. (1996). Traffic of dynamin within individual *Drosophila* synaptic boutons relative to compartment – specific markers. *J. Neurosci.* 1;16(17), 5443-5456.

Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J.M., Buchner, E., und Galizia, C.G. (2002). Genetically Expressed Cameleon in *Drosophila melanogaster* Is Used to Visualize Olfactory Information in Projection Neurons. *Curr. Biol.* (12), 1877-1884.

Friedrich, R.W., und Korsching, S.I. (1997). Combinatorial and Chemotopic Odorant Coding in the Zebrafish Olfactory Bulb Visualized by Optical Imaging. *Neuron* 18, 737-752.

Friedrich, R.W., und Korsching, S.I. (1998). Chemotopic, Combinatorial, and Noncombinatorial Odorant Representation in the Olfactory Bulb Using a Voltage-Sensitive Axon Tracer. *J. Neurosci.* 18(23), 9977-9988.

Friedrich, R.W., und Laurent, G. (2001). Dynamic Optimization of Odor Representation by slow Temporal Patterning of mitral Cell Activity. *Science* 291, 889-894.

Fuss, S.H., und Korsching, S. I. (2001). Odorant Feature Detection: Activity Mapping of Structure Response Relationships in the Zebrafish Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 21(21), 8396-8407.

Galizia, C.G., Küttner, A., Joerges, J., und Menzel, R. (2000). Odour representation in honeybee olfactory glomeruli shows slow temporal dynamics: an optical recording study using a voltage-sensitive dye. *J. Insect Physiol.* 46(6), 877-886.

Galizia, C.G., und Menzel, R. (1999). Optical Imaging of Odor-Evoked Glomerular Activity Patterns in the Antennal Lobes of the Ant *Camponotus rufipes*. *Naturwissenschaften* 86, 533-537

Galizia C.G., und Menzel, R. (2001). The role of glomeruli in the neural representation of odours: results from optical recording studies. *J. Ins. Physiol.* 47, 115-130.

Galizia, C.G., Sachse, S., Rappert, A., und Menzel, R. (1999). The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nat. Neurosci.* 5, 473-478.

Gesteland, R. (1965). Chemical transmission in the nose of the frog. *J. Physiol.* (Lond.) 181, 525-559.

Gonzalez, J.E., und Tsien, R.Y. (1997). Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer. *Chem. & Biol.* 4, 269-277.

Grinvald, A., Mankner, A., und Segal, M. (1982). Visualization of the spread of electrical activity in rat hippocampal slices by voltage-sensitive optical probes. *J. Physiol.* 333, 269-91.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., und Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.

Guerrero, E., und Isacoff, E.Y. (2001). Genetically encoded optical sensors of neuronal activity and cellular function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 601-607.

Guerrero, G., Siegel, M.S., Roska, B., Loots, E., und Isacoff, E.Y.(2002). Tuning FlaSH: Redesign of the Dynamics, Voltage Range, and Color of the Genetically Encoded Optical Sensor of Membrane. Potential. *Biophys. J.* 83 (6), 3607-18.

Guo, A., Simone, D.A., Stone, L.S., Fairbanks, C.A., Wang, J., und Elde, R. (2001). Developmental shift of vanilloid receptor 1 (VR1) terminals into deeper regions of the superficial dorsal horn: correlation with a shift from TrkA to Ret expression by dorsal root ganglion neurons. *Europ. J. Neurosci.* 14, 293-304.

Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P., und Webb, W.W. (1998). Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13573-13578.

Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Keller, A., und Stocker, F. (2001). A central neural circuit for experience-independent olfactory and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 15336-16341.

Heisenberg, M. (2003). MUSHROOM BODY MEMOIR: FROM MAPS TO MODELS. *Nature* 4, 266-275.

Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., und Byers, D. (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J. Neurogenet.* 2, 1-30.

Heisenberg, M., und Wolf, R. (1984). *Vision in Drosophila*. Berlin, Springer-Verlag

Hodgkin, A.L., und Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500-544.

Jefferis, G.S., Marin, E.C., Stocker, R.F., und Luo, L. (2001). Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature* 414, 204-208.

Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C.G., und Menzel, R. (1997). Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* 387, 285-288.

Kaiser, K., und Goodwin, S.F. (1990). Site-selected transposon mutagenesis of *Drosophila*. *PNAS* 87, 1686-1690.

Karst, H., Piek, T., Van Marle, J., Lind, A., und Van Weeren-Kramer, J. (1991). Structure-activity relationship of philanthotoxins-I. Pre- and postsynaptic inhibition of the locust neuromuscular transmission. *Comp. Biochem. Physiol.* C98, 471-477.

Keller, A., Sweeney, S.T., Zars, T., O'Kane, C.J., und Heisenberg, M. (2002). Targeted expression of tetanus neurotoxin interferes with behavioral responses to sensory input in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 50(3), 221-233

Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Sakurada, O., Shinohara, M., Reivich, M., Jehle, J.W., und Sokoloff, L. (1976). Metabolic mapping of the primary visual system of the monkey by means of the autoradiographic [<sup>14</sup>C] deoxyglucose technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (11), 4230-4234.

Kuner, T., und Augustine, G.J. (2000). A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 27(3), 447-459.

Laissue, P.P., Reiter, C., Hiesinger, P.R., Halter, S., Fischbach, K.F., und Stocker, R.F. (1999). Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 405, 543-552.

Laurent, G., MacLeod, K., Stopfer, M., und Wehr, M. (1998). Spatiotemporal structure of olfactory inputs to the mushroom bodies. *Learn. Mem.* 5, 124-132.

Laurent, G., Wehr, M., und Davidowitz, H. (1996). Temporal Representation of Odors in an Olfactory Network. *J. Neurosci.* 16(12), 3837-3847.

Levy, N.S., Bakalyar, H.A., und Reed, R.R. (1991). Signal transduction in olfactory neurons. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 39, 633-637

Lieke, E.E. (1993). Optical recording of neuronal activity in the insect central nervous system: odorant coding by the antennal lobes of honeybees. *Eur. J. Neurosci.* 5 (1), 49-55.

Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., und Buck, L.B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96, 713-723.

Marin, E.C., Jefferis, G.S., Komiyama, T., Zhu, H., und Luo, L. (2002). Representation of the Glomerular Olfactory Map in the *Drosophila* Brain. *Cell* 109, 243-255.

Martone, M.E., Zhang, Y., Simpliciano, V.M., Carrager, B.O., und Ellisman, M.H. (1993). Three-dimensional visualization of the smooth endoplasmic reticulum in Purkinje cell dendrites. *J. Neurosci.* 13, 4636-4646.

Mayhew, J., Johnston, D., Berwick, J., Jones, M., Coffey, P., und Zheng, Y. (2000). Spectroscopic analysis of neural activity in brain: increased oxygen consumption following activation of barrel cortex. *Neuroimage* 12(6), 664-675.

Melzig, J., Buchner, S., Wiebel, F., Wolf, R., Burg, M., Pak, W. L., und Buchner E. (1996). Genetic depletion of histamine from the nervous system of *Drosophila* eliminates specific visual and mechanosensory behavior. *J. Comp. Physiol. A* 179, 763-773.

Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., und Tsien, R.Y. (1999). Dynamic and quantitative  $\text{Ca}^{2+}$  measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2135-2140.

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., und Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$  based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882-887.

Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., und Axel, R. (1996). Visualizing an Olfactory Sensory Map. *Cell* 87, 675-686.

Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H., und Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochem.* 13, 2656-2662.

Müller, D., Abel, R., Brandt, R., Zöckler, M., und Menzel, R. (2002). Differential parallel processing of olfactory information in the honeybee, *Apis mellifera* L.. *J. Comp. Physiol.* 188, 359-370.

Nagai, T., Sawano, A., Park, E.S., und Miyawaki, A. (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3197-3202.

Nagai, Y., Masami, M., Ryoko, A., Takeru, Z., Satoshi, I., Kenzo, H., Masamitsu, I., und Masatoshi, H. (2000). A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo. *Nat. Biotech.* 18, 313-316.

Nakai, J., Ohkura, M., und Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 19, 137-141.

Nakanishi, K., Huang, X., Jiang, H., Liu, Y., Fang, K., Huang, D., Choi, S.K., Katz, E., und Eldefrawi, M. (1997). Structure-binding relation of philanthotoxins from nicotinic acetylcholine receptor binding assay. *Bioorg. Med. Chem.* 5, 1969-1988.

Neher, E., Sakmann, B., und Steinbach, J.H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch.* 375 (2), 219-28.

Ngai, J., Chess, A., Dowling, M.M., Necles, N., Macagno, E.R., und Axel, R. (1993). Coding of olfactory information: topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. *Cell* 72, 667-680.

Perez-Orive, J., Mazor, O., Turner, G.C., Cassenaer, S., Wilson, R.I., und Laurent, G. (2002). Oscillations and Sparsening of Odor Representations in the Mushroom Body. *Science* 297, 359-365.

Pfister, H. (1997). Etablierung und Charakterisierung Pilzkörper-spezifischer Gal4-enhancer-trap-Linien in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie der Universität Würzburg, Deutschland.

Poremba, A., Saunders, R.C., Crane, A.M., Cook, M., Sokoloff, L., und Mishkin, M. (2003). Functional mapping of the primate auditory system. *Science* 299 (5606), 568-572.

Rodrigues, V., und Buchner, E. (1984). [<sup>3</sup>H]2-deoxyglucose mapping of odor-induced neuronal activity in the antennal lobes of *Drosophila melanogaster*. *Brain. Res.* 324 (2), 374-8.

Rohr, S. und Salzberg, B.M. (1994). Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures: assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale. *Biophys. J.* 67, 1301-1315.

Romoser, V.A., Hinkle, P.M., und Persechini, A. (1997). Detection in living cells of Ca<sup>2+</sup>-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *J. Biol. Chem.* 272 (20), 13270-4.

Rubin, B.D., und Katz, L.C. (1999). Optical Imaging of Odorant Representations in the Mammalian Olfactory Bulb. *Neuron* 23, 499-511.

Sachse, S., und Galizia, C.G. (2002). Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J. Neurophysiol.* 87, 1106-1117.

Sachse, S., und Galizia, C.G. (2003). The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: local computation optimizes odour representation. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2119-2132.

Sakai, R., Repunte-Canonigo, V., Raj, C.D., und Knopfel, T. (2001). Design and characterization of a DNA-encoded, voltage-sensitive fluorescent protein. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2314-2318.

Sandoz, J.C., Galizia, C.G., und Menzel, R. (2003). Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honeybee antennal lobes. *Neurosci.* 120(4), 1137-1148.

Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *PNAS* 74, 5463-5467.

Sato, T., Hirono, J., Tonoike, M., und Takebayashi, M. (1994). Tuning specificities to aliphatic odorants in mouse olfactory receptor neurons and their local distribution. *J. Neurophysiol.* 72, 2980-2989.

Schwärzel, M. (2003). Localizing engrams of olfactory memories in *Drosophila*. Dissertationsschrift. Fakultät für Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

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

Sejnowski, T.J., Reingold, S.C., Kelley, D.B., und Gelperin, A. (1980). Localization of [<sup>3</sup>H]-2-deoxyglucose in single molluscan neurones. *Nature* 287 (5781), 449-51.

Shimomura, O., und Johnson, F.H. (1978). Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein Aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2611-2615.

Shymala, B.V., und Chopra, A. (1999). *Drosophila melanogaster* chemosensory and muscle development: identification and properties of a novel allele of scalloped and a new locus SG-18.1, in a Gal4 enhancer trap screen. *J. Genet.* 78, 87-97.

Siegel, M.S., und Isacoff, E.Y. (1997). A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* 19, 735-741.

Sicard, G., und Holley, A. (1984). Receptor cell responses to odorants: similarities and differences among odorants. *Brain Res.* 292, 283-296.

Spradling, A. C. und Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P-element into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-347.

Stewart, W.B., Kauer, J.S., und Shepherd, G.M. (1979). Functional organization of rat olfactory bulb analyzed by the 2-deoxyglucose method. *J. Comp. Neurol.* 185 (4), 715-34.

Stocker, R.F., Gendre, N., und Batterham, P. (1993). Analysis of the antennal phenotype in the *Drosophila* mutant *lozenge*. *J. Neurogene.* 9 (1), 29-53.

Stocker, R.F., Heimbeck, G., Gendre, N., und De Belle, J.S. (1997). Neuroblast Ablation in *Drosophila* P[GAL4] Lines Reveals Origins of Olfactory Interneurons. *J. Neurobiol.* 32, 443-456.

Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B.H., und Laurent, G. (1997). Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature* 390, 70-74.

Stopfer, M., Jayaraman, V., und Laurent, G. (2003). Intensity versus Identity Coding in an Olfactory System. *Neuron* 39, 991-1004.

Südhof, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653.

Sun, B., Wang, W., und Salvaterra, P.M. (1998). Functional analysis and tissue-specific expression of *Drosophila* Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase subunits. *J. Neurochem.* 71(1), 142-151.

Terasaki, M., Traverse Slater, N., Fein, A., Schmidek, A., und Reese, T.S. (1994). Continuous network of endoplasmatic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7510-7514.

Truong, K., Swano, A., Mizuno, H., Hama, H., Tong, K.I., Mal, T.K., Miyawaki, A., und Ikura, M. (2001). FRET-based in vivo Ca<sup>2+</sup> imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1069-1073.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544.

Vanzetta, J., und Grinvald, A. (1999). Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging. *Science* 286(5444), 1555-1558.

Vosshall, L.B., Wong, A.M, und Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102, 147-159.

Wang, Y., Chiang, A.S., Xia, S., Kitamoto, T., Tully, T., und Zhong, Y. (2003). Blockade of Neurotransmission in *Drosophila* Mushroom Bodies Impairs Odor Attraction, but Not Repulsion. *Curr. Biol.* 13, 1900-1904.

Wang, Y., Wright, N.J.D., Guo, H.F., Xie, Z., Svoboda, K., Malinow, R., Smith, D.P., und Zhong, Y. (2001). Genetic manipulation of the odor-evoked distributed neural activity in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* 29, 267-276.

Wilson, R.I., Turner, G.C., und Laurent, G. (2004). Transformation of Olfactory Representation in the *Drosophila* Antennal Lobe. *Science* 303, 366-370.

Wong, A.M., Wang, J.W., und Axel, R. (2002). Spatial Representation of the Glomerular Map in the *Drosophila* Protocerebrum. *Cell* 109, 229-241.

Yang, M.Y., Armstrong, J.D., Vilinsky I., Strausfeld, N.J., und Kaiser, K. (1995). Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. *Neuron* 15, 45-54.

---

Yusuyama, K., Meinertzhagen, I.A., und Schürmann, F.W. (2002). Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 445, 211-226.

Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., und Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288, 672-675.

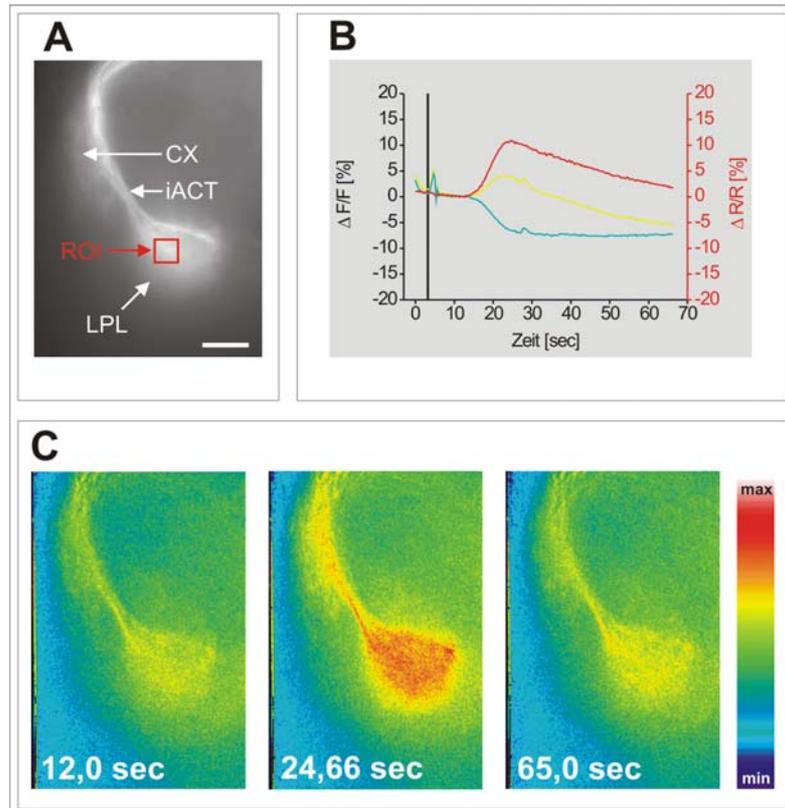
Zemelman, B.V., und Miesenbock, G. (2001). Genetic schemes and schemata in neurophysiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11 (4), 409-14.

Zou, Z., Horowitz, L.F., Montmayeur, J.P., Snapper, S., und Buck, L.B. (2001). Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature* 414, 173-179.

## 9 Anhang

### 9.1 Experimente zur Depolarisation mit Kaliumchlorid

#### Fliege 2:



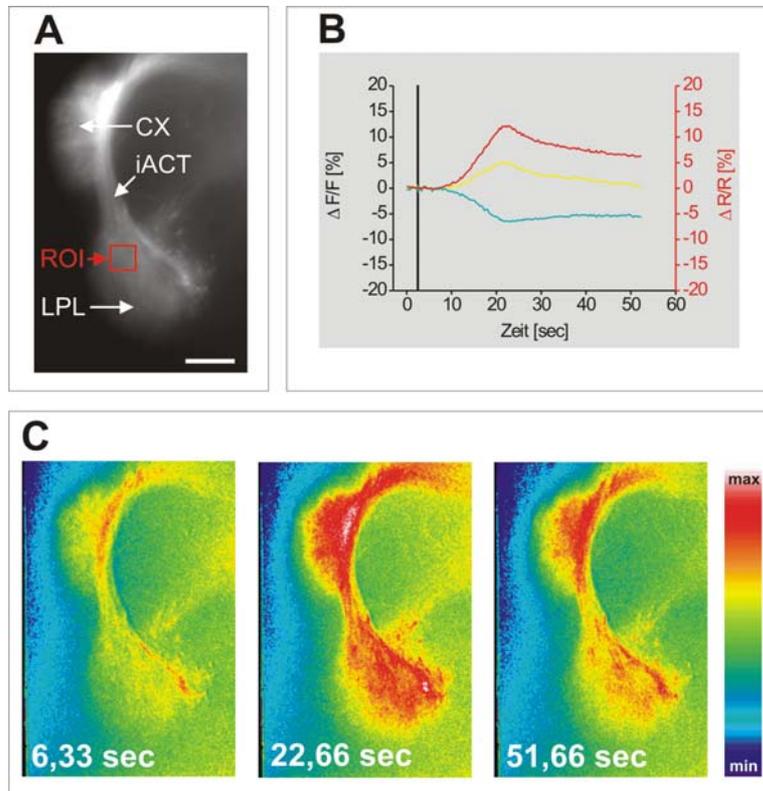
**Abb. 9.1** Experiment zur Depolarisation mit Kaliumchlorid; Fliege 2

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Intensitäten in **B** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25 $\mu$ m.

**B** Zeitlicher Verlauf der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) auf den KCl – Stimulus. Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio als  $\Delta R/R$  [%]. Die KCl – Injektion (10 $\mu$ l, 1M) wird durch einen schwarzen Balken symbolisiert.

**C** Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster. Muster 1 (Zeitpunkt der Messung: 12,0 Sek) wurde nach der KCl – Injektion und vor dem Signalstart aufgenommen, es stellt die neuronale Aktivität vor der Depolarisation dar. Muster 2 (Zeitpunkt der Messung: 24,66 Sek) steht für das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum, Calyx und innerem Antennocerebraltrakt. Muster 3 (Zeitpunkt der Messung: 65,0 Sek) steht für das Ende des Calciumsignals. Abgebildet ist der Skalierungsbalken für die Falschfarbencodierung der Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster.

### Fliege 3:



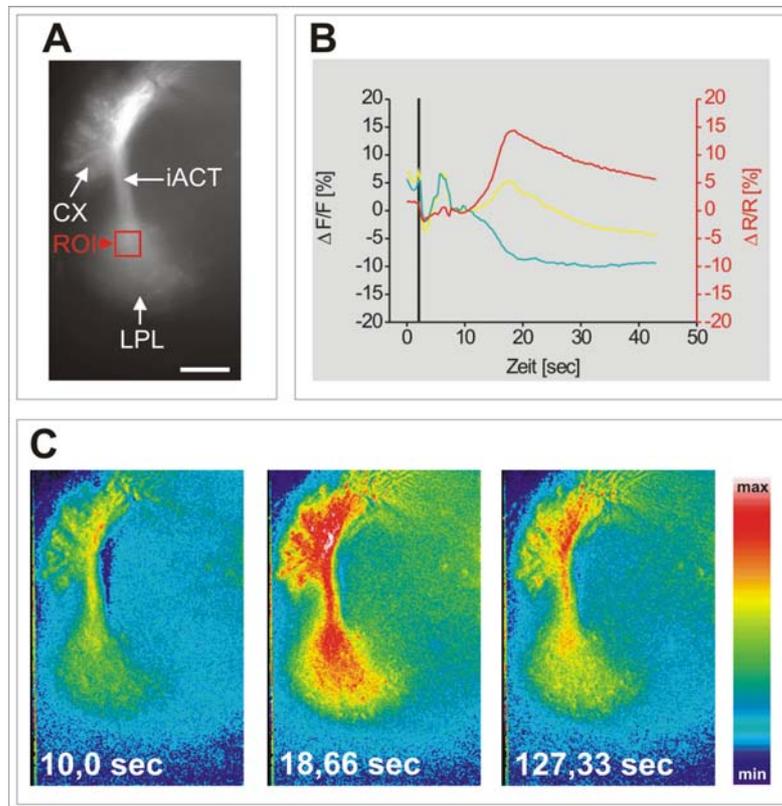
**Abb. 9.2** Experiment zur Depolarisation mit Kaliumchlorid; Fliege 3

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Intensitäten in **B** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

**B** Zeitlicher Verlauf der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) auf den KCl – Stimulus. Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio als  $\Delta R/R$  [%]. Die KCl – Injektion (10µl, 1M) wird durch einen schwarzen Balken symbolisiert.

**C** Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster. Muster 1 (Zeitpunkt der Messung: 6,33 Sek) wurde nach der KCl – Injektion und vor dem Signalstart aufgenommen, es stellt die neuronale Aktivität vor der Depolarisation dar. Muster 2 (Zeitpunkt der Messung: 22,66 Sek) steht für das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum, Calyx und innerem Antennocerebraltrakt. Muster 3 (Zeitpunkt der Messung: 51,66 Sek) steht für das Ende des Calciumsignals. Abgebildet ist der Skalierungsbalken für die Falschfarbencodierung der Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster.

## Fliege 4:



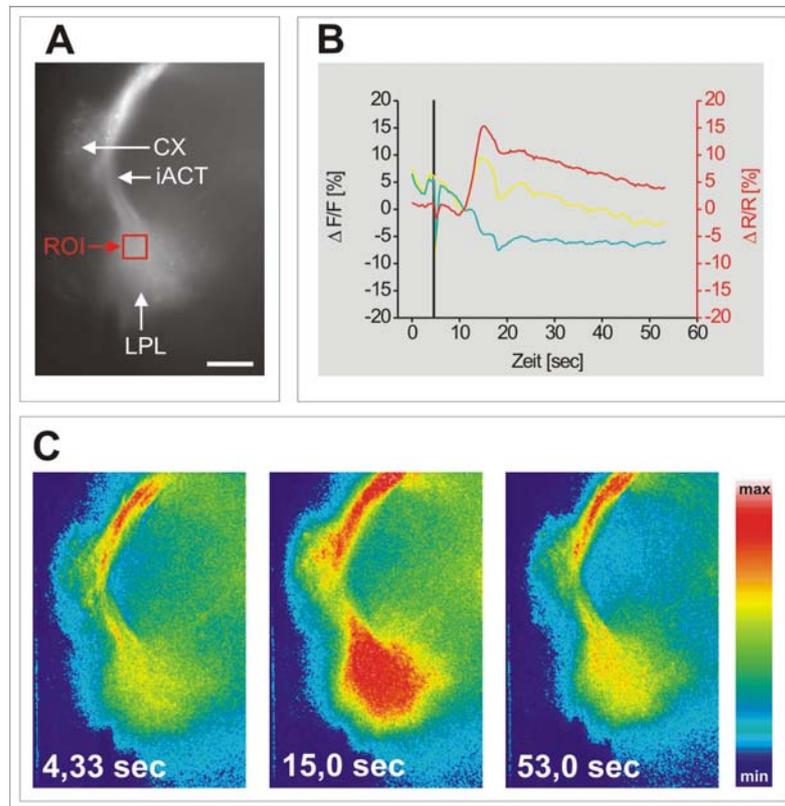
**Abb. 9.3** Experiment zur Depolarisation mit Kaliumchlorid; Fliege 4

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Intensitäten in **B** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25μm.

**B** Zeitlicher Verlauf der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) auf den KCl – Stimulus. Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio als  $\Delta R/R$  [%]. Die KCl – Injektion (10μl, 1M) wird durch einen schwarzen Balken symbolisiert.

**C** Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster. Muster 1 (Zeitpunkt der Messung: 10,0 Sek) wurde nach der KCl – Injektion und vor dem Signalstart aufgenommen, es stellt die neuronale Aktivität vor der Depolarisation dar. Muster 2 (Zeitpunkt der Messung: 18,66 Sek) steht für das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum, Calyx und innerem Antennocerebraltrakt. Muster 3 (Zeitpunkt der Messung: 127,33 Sek) steht für das Ende des Calciumsignals. Abgebildet ist der Skalierungsbalken für die Falschfarbencodierung der Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster.

## Fliege 5:



**Abb. 9.4** Experiment zur Depolarisation mit Kaliumchlorid; Fliege 5

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Intensitäten in **B** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25μm.

**B** Zeitlicher Verlauf der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) auf den KCl – Stimulus. Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio als  $\Delta R/R$  [%]. Die KCl – Injektion (10μl, 1M) wird durch einen schwarzen Balken symbolisiert.

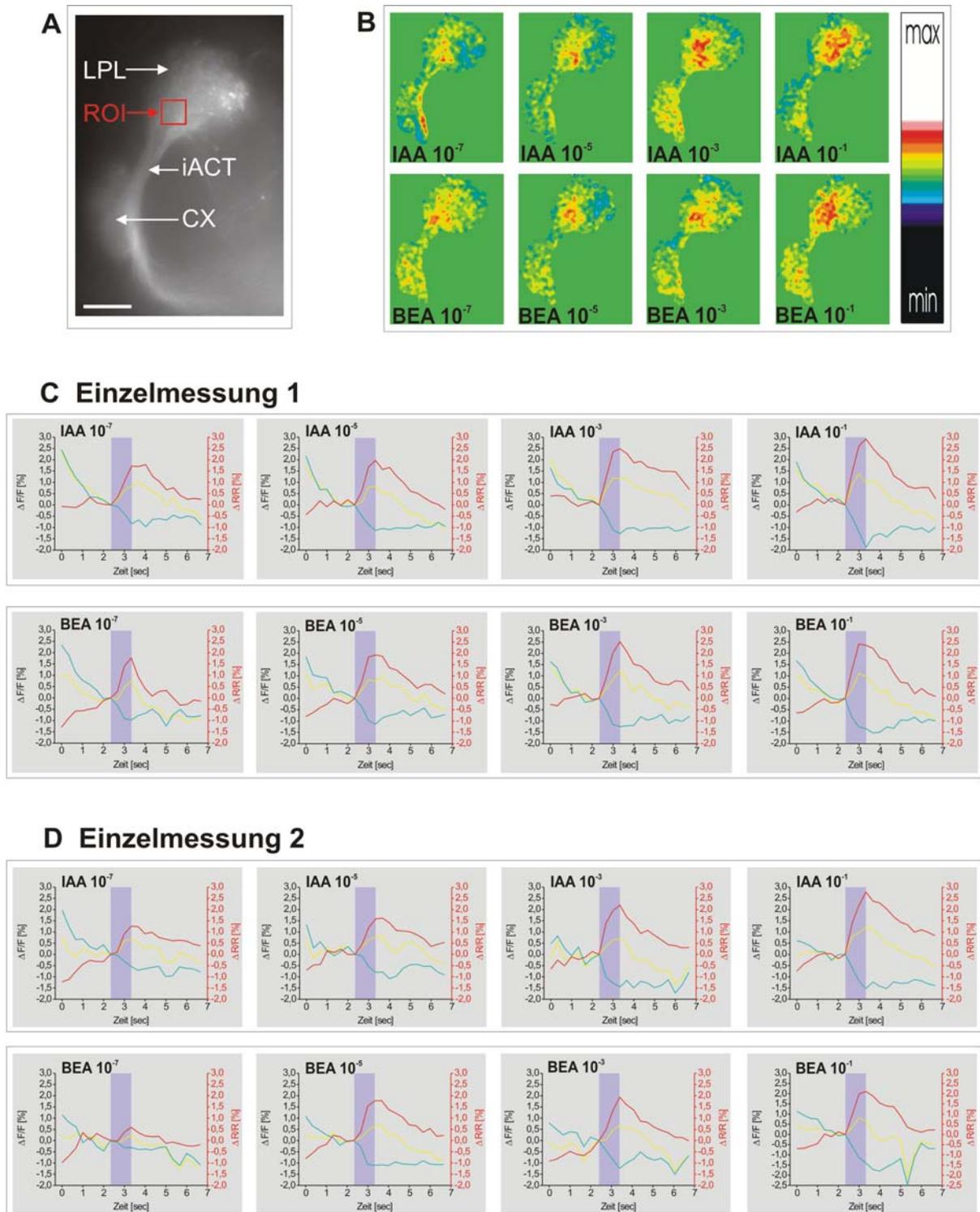
**C** Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster. Muster 1 (Zeitpunkt der Messung: 4,33 Sek) wurde nach der KCl – Injektion und vor dem Signalstart aufgenommen, es stellt die neuronale Aktivität vor der Depolarisation dar. Muster 2 (Zeitpunkt der Messung: 15,0 Sek) steht für das Maximum des Calciumsignals in lateralem Protocerebrum, Calyx und innerem Antennocerebraltrakt. Muster 3 (Zeitpunkt der Messung: 53,0 Sek) steht für das Ende des Calciumsignals. Abgebildet ist der Skalierungsbalken für die Falschfarbencodierung der Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster.

---

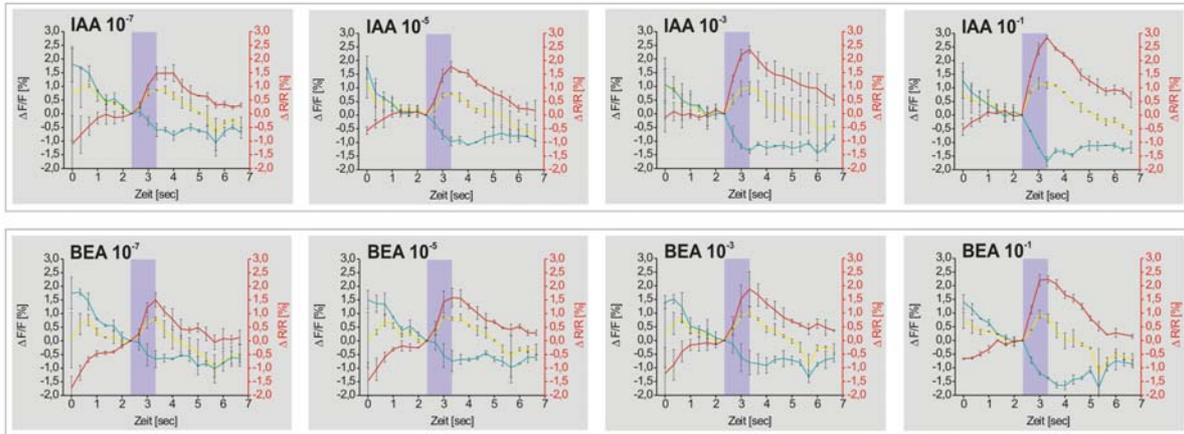
## **9.2 Experimente zur olfaktorischen Codierung im lateralen Protocerebrum**

## 9.2.1 Isoamylacetat / Benzaldehyd – Fliegen

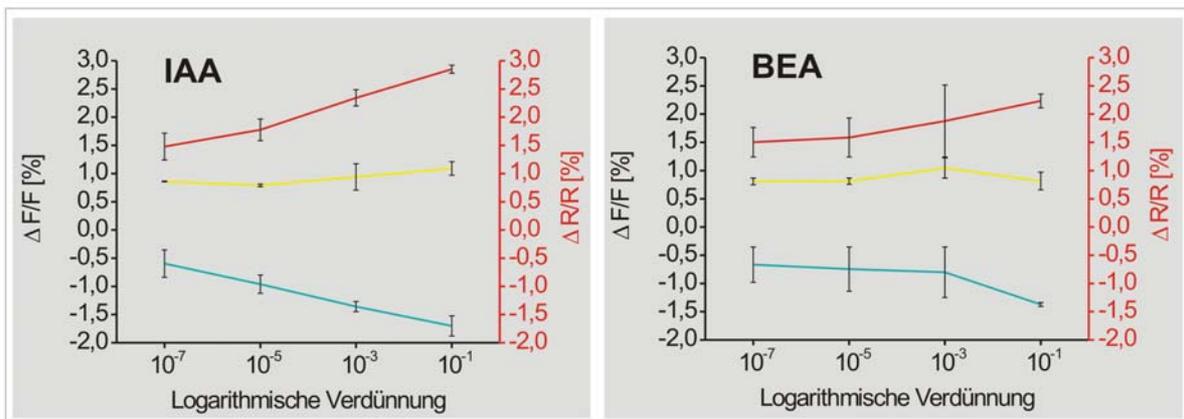
### IAA / BEA – Fliege 1:



## E Mittelwerte



## F Übersicht



**Abb. 9.5** Messung gegen den IAA – und BEA – Konzentrationsgradienten; Fliege 1

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C + D** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

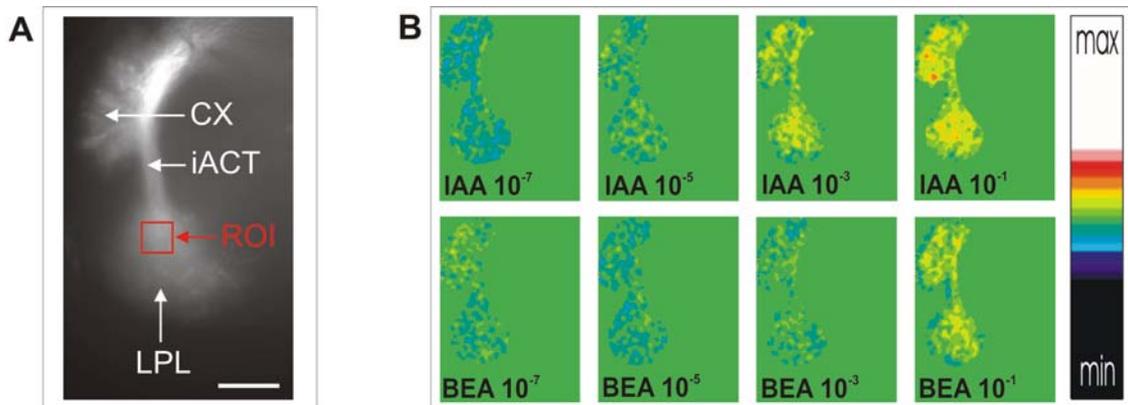
**B**  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster von Einzelmessung 1. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C+D** Zeitlicher Verlauf von Einzelmessungen 1 und 2. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

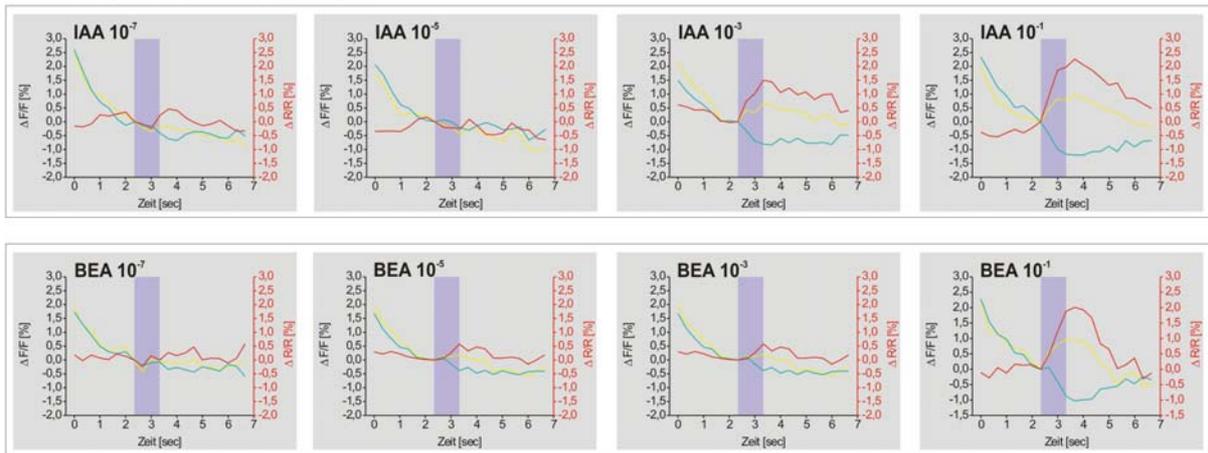
**E** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 2.

**F** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 1. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **E** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 2.

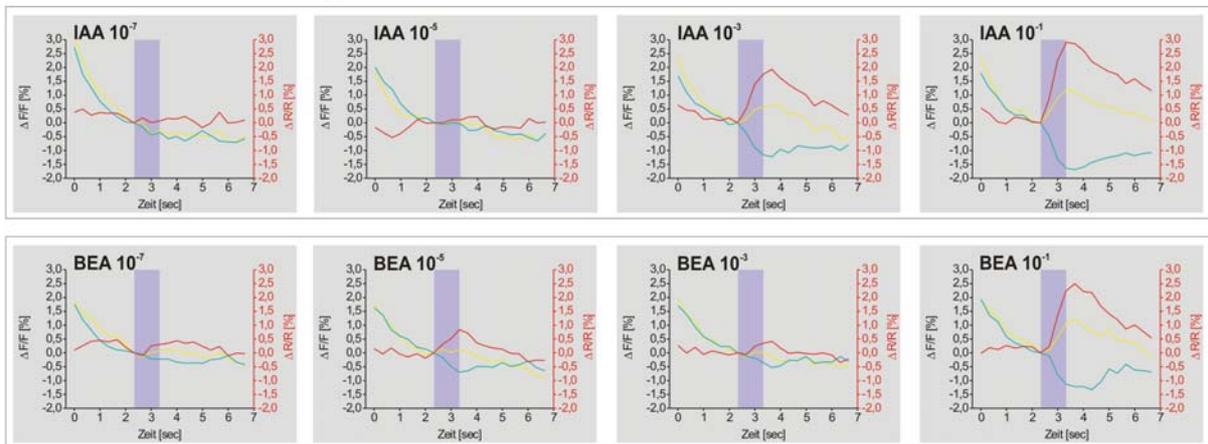
## IAA / BEA – Fliege 2:



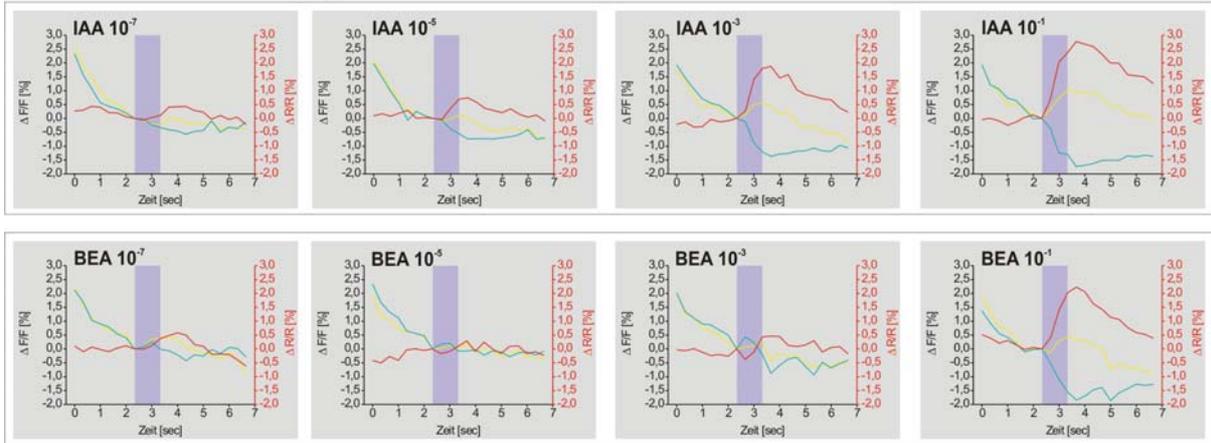
### C Einzelmessung 1



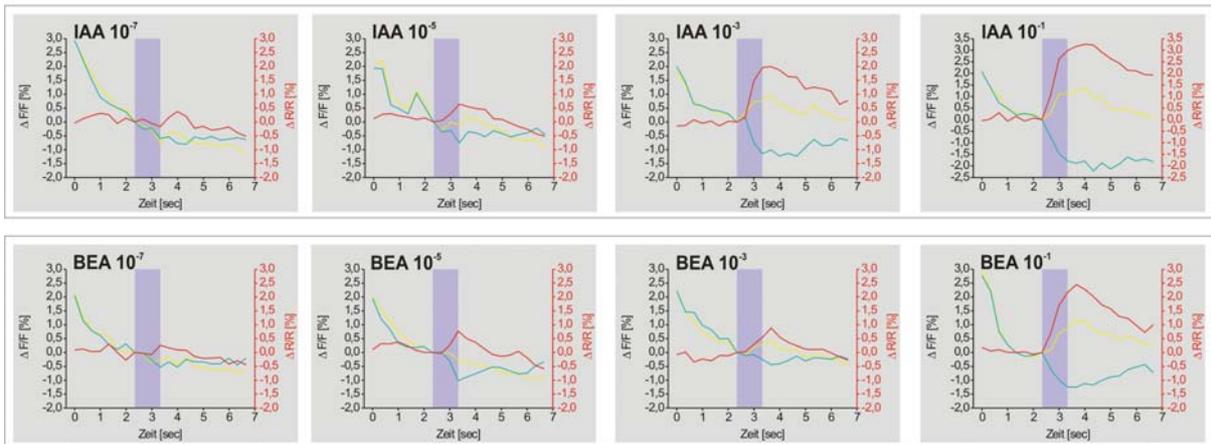
### D Einzelmessung 2



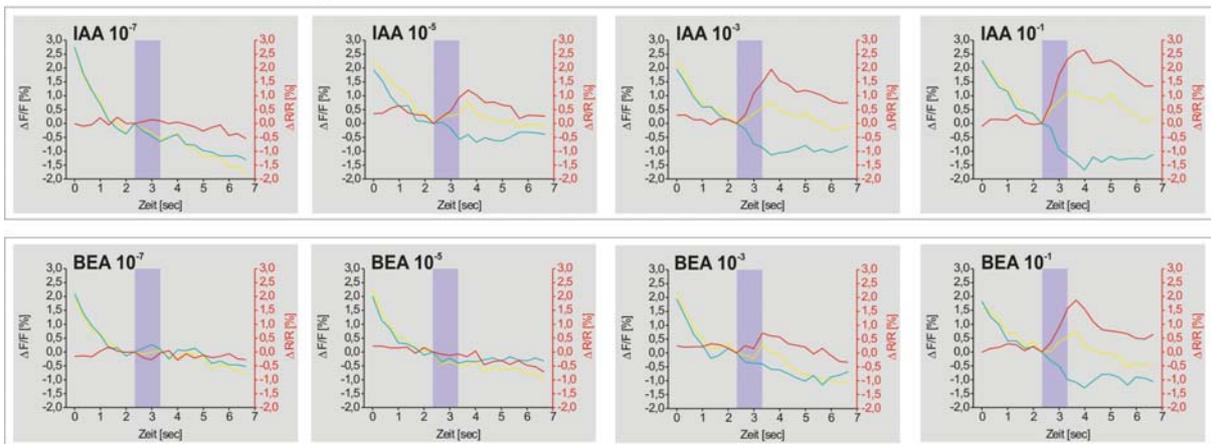
### E Einzelmessung 3



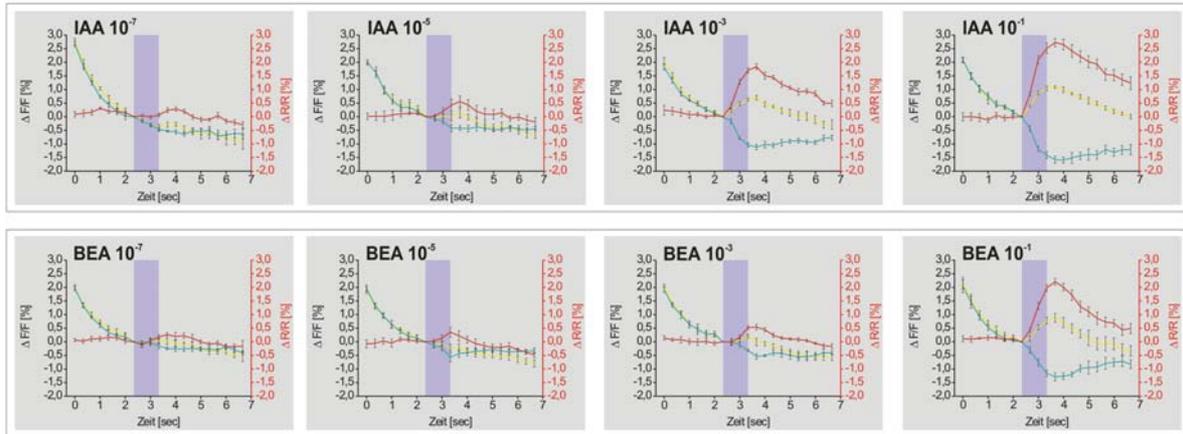
### F Einzelmessung 4



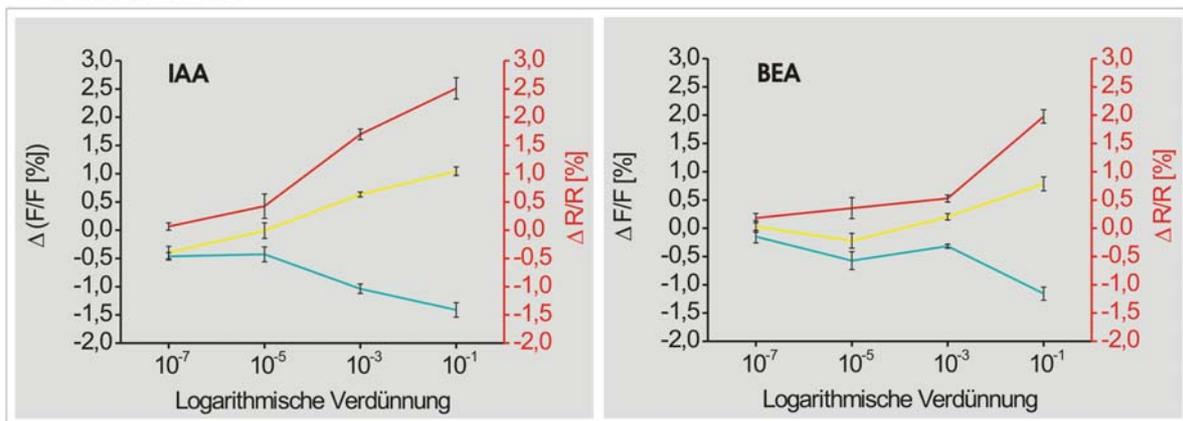
### G Einzelmessung 5



## H Mittelwerte



## I Übersicht



**Abb. 9.6** Messung gegen den IAA – und BEA – Konzentrationsgradienten; Fliege 2

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C – G** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

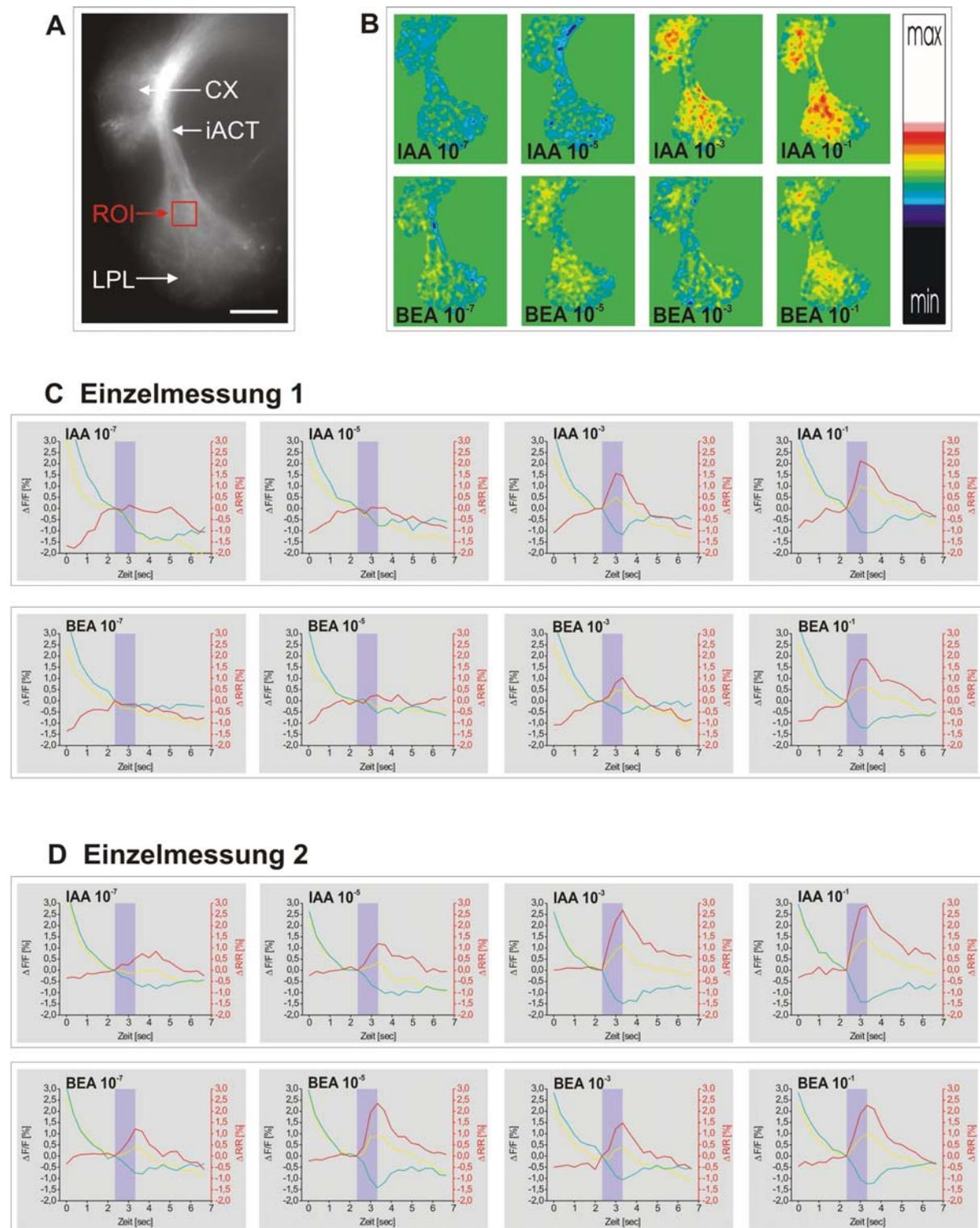
**B**  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster von Einzelmessung 3. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C – G** Zeitlicher Verlauf von Einzelmessungen 1 – 5. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

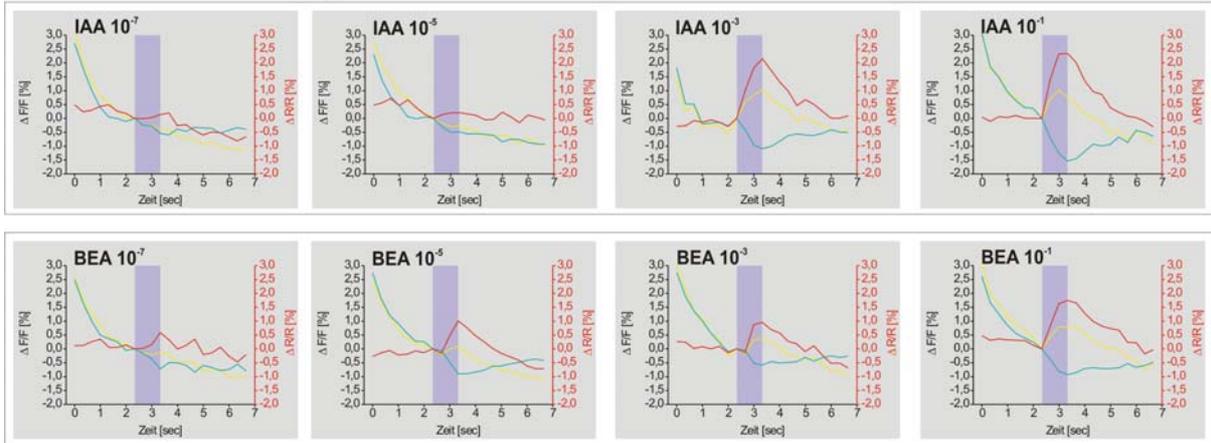
**H** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 5.

**I** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 2. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **H** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 5.

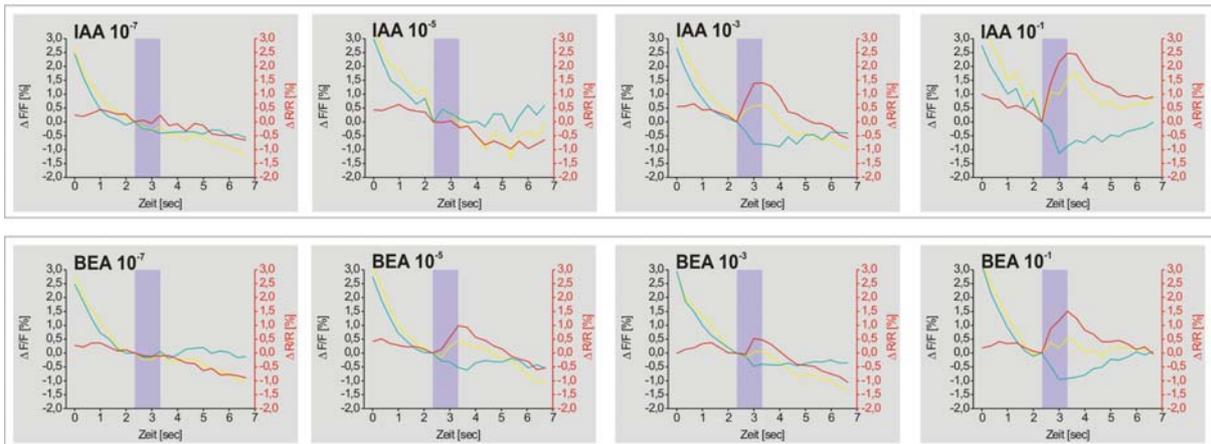
## IAA / BEA – Fliege 3:



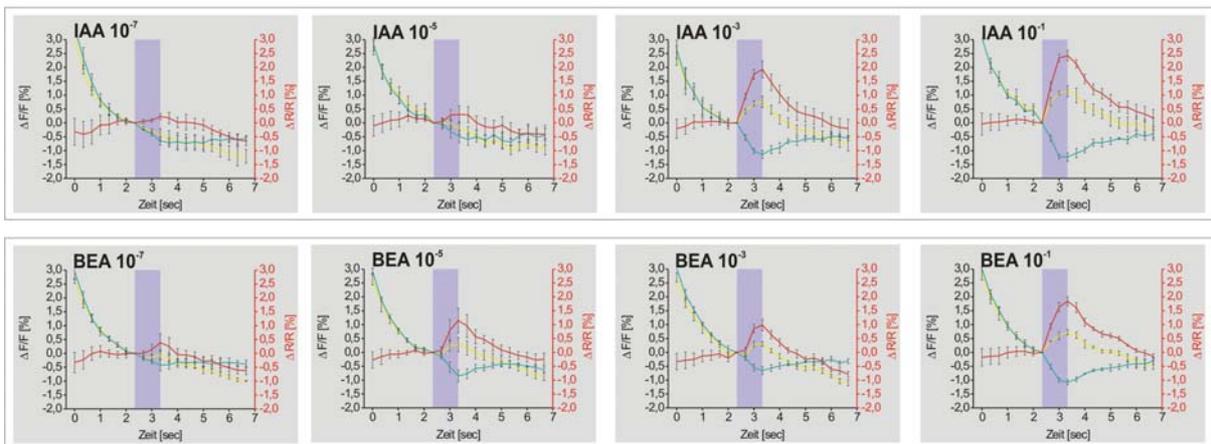
### E Einzelmessung 3



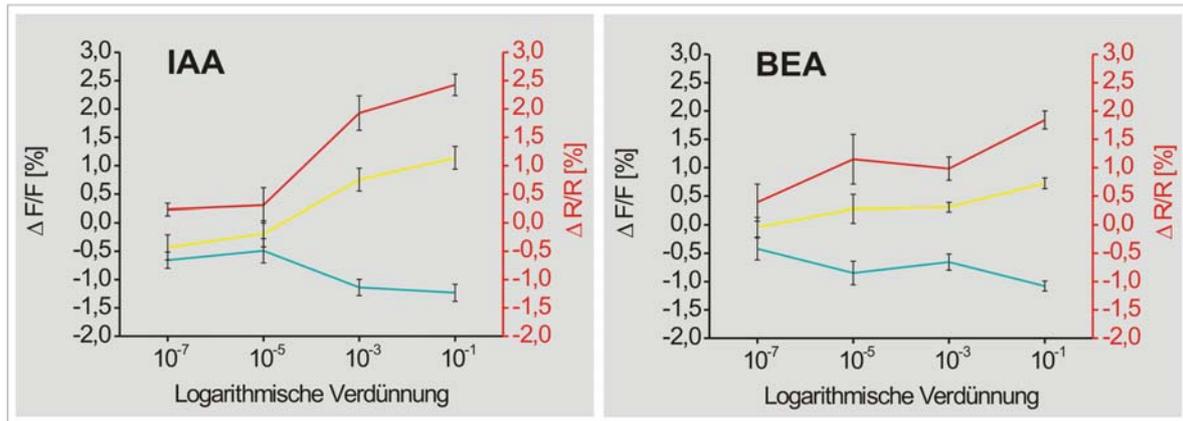
### F Einzelmessung 4



### G Mittelwerte



## H Übersicht



**Abb. 9.7** Messung gegen den IAA – und BEA – Konzentrationsgradienten; Fliege 3

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C – F** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25 $\mu$ m.

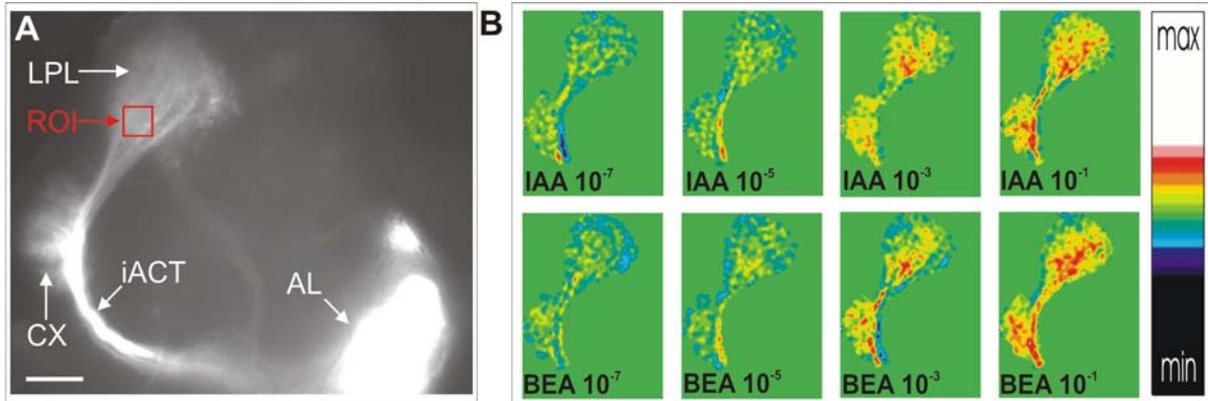
**B** Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster von Einzelmessung 3. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C – F** Zeitlicher Verlauf von Einzelmessungen 1 – 4. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

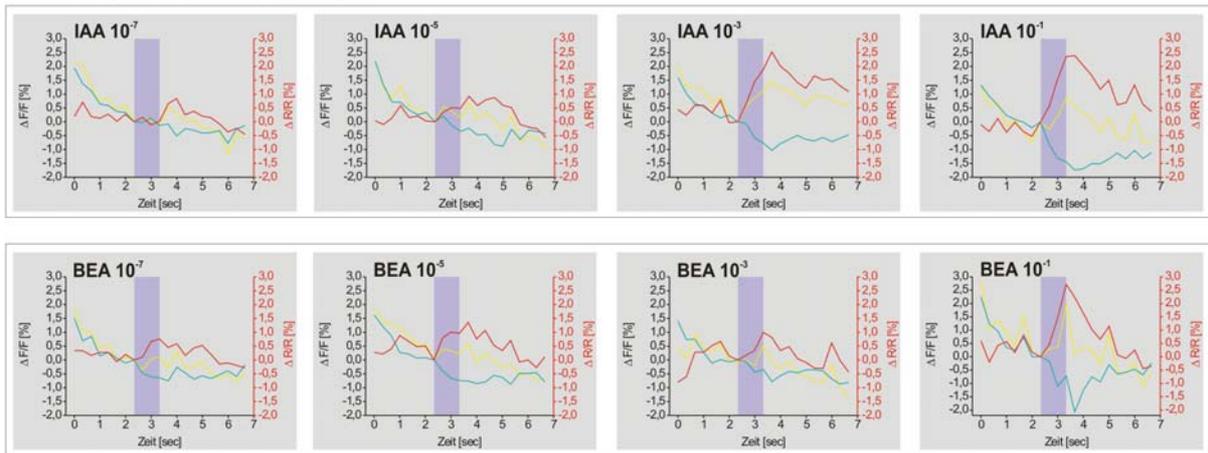
**G** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 4.

**H** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 2. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **G** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 4.

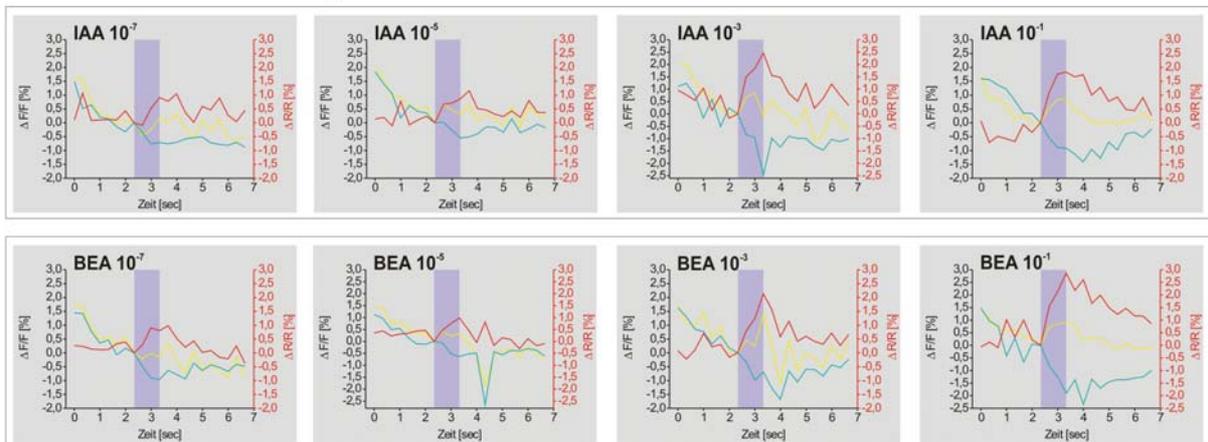
### IAA / BEA – Fliege 4:



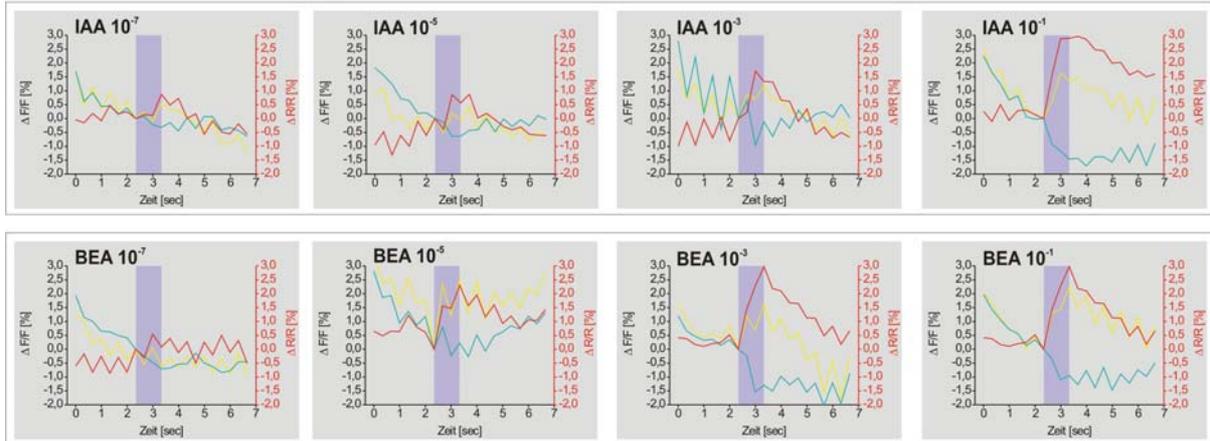
### C Einzelmessung 1



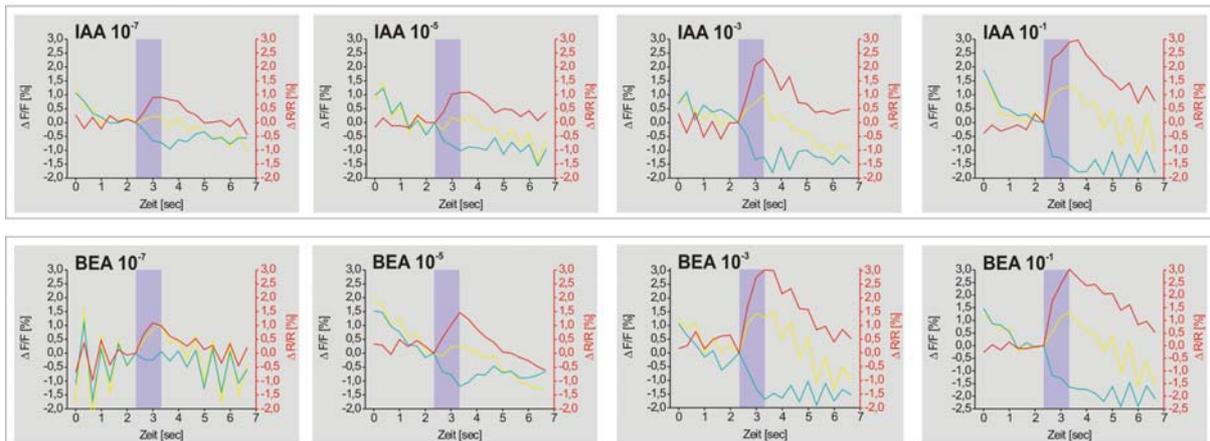
### D Einzelmessung 2



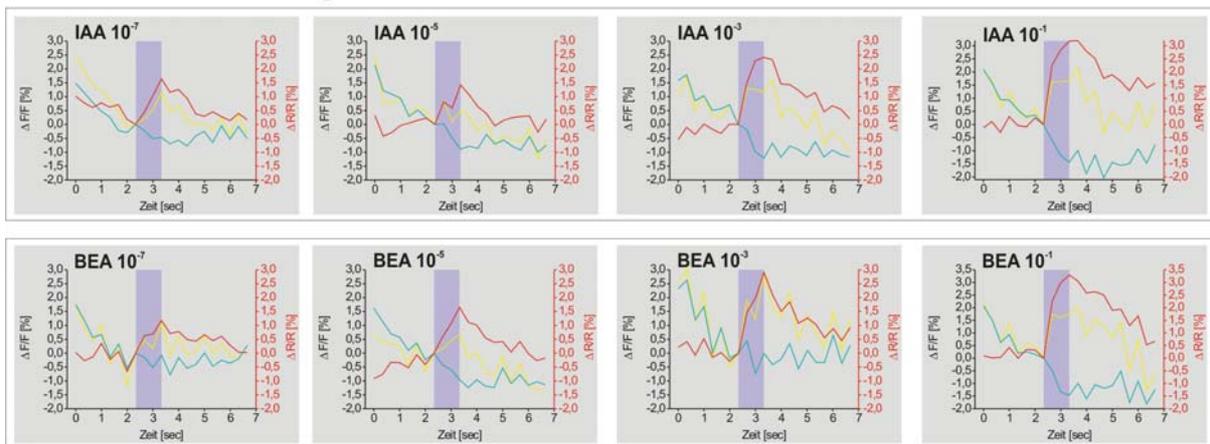
### E Einzelmessung 3



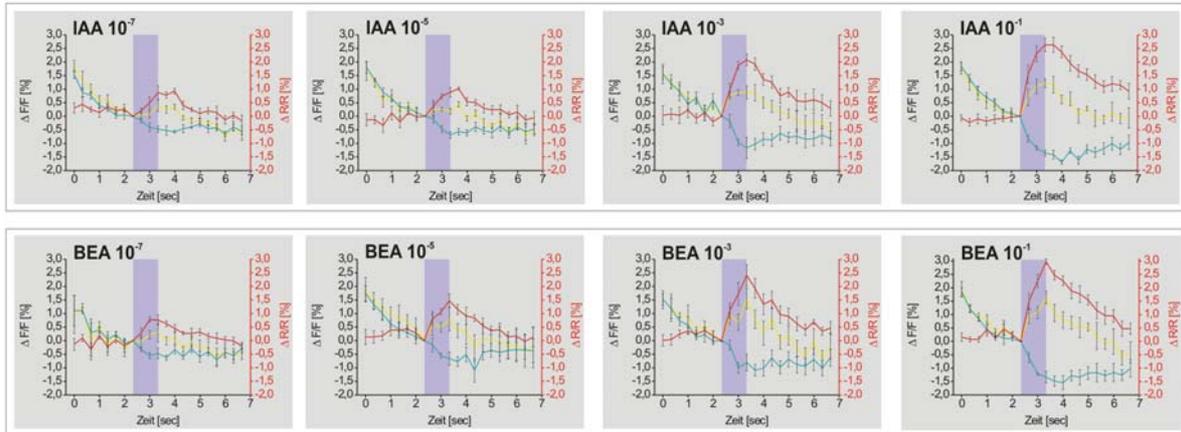
### F Einzelmessung 4



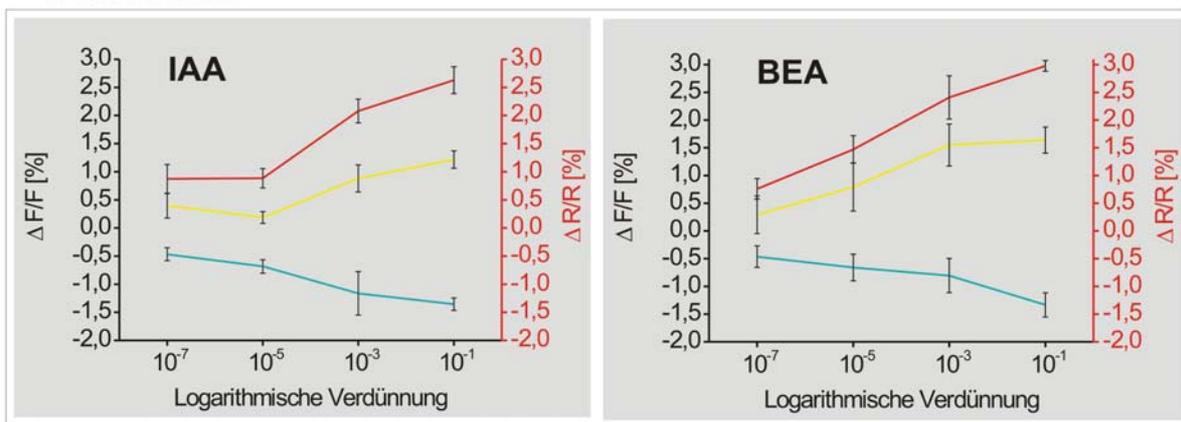
### G Einzelmessung 5



## H Mittelwerte



## I Übersicht



**Abb. 9.8** Messung gegen den IAA – und BEA – Konzentrationsgradienten; Fliege 4

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C – G** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

**B**  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster von Einzelmessung 4. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

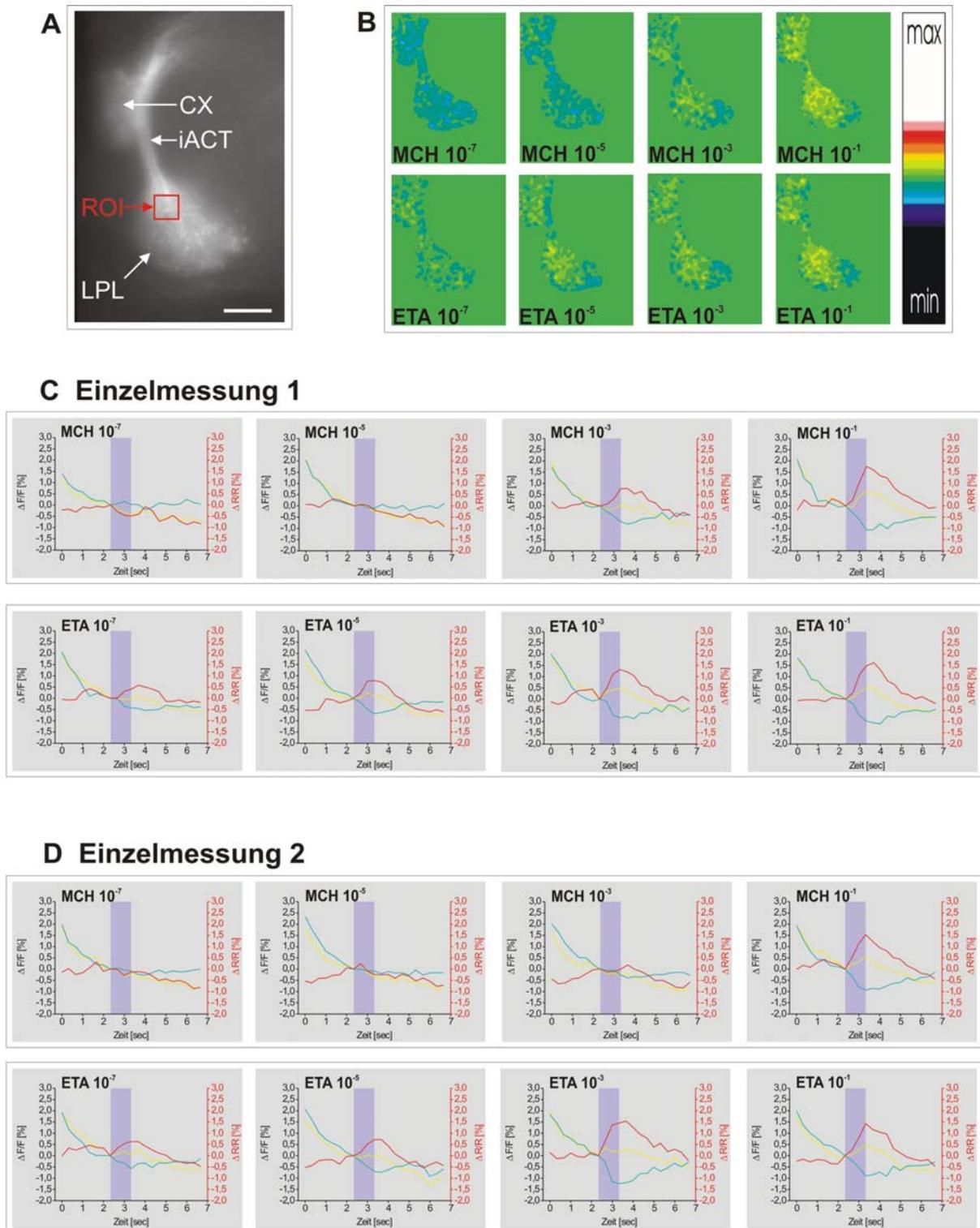
**C – G** Zeitlicher Verlauf von Einzelmessungen 1 – 5. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

**H** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Isoamylacetat (IAA) und Benzaldehyd (BEA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 5.

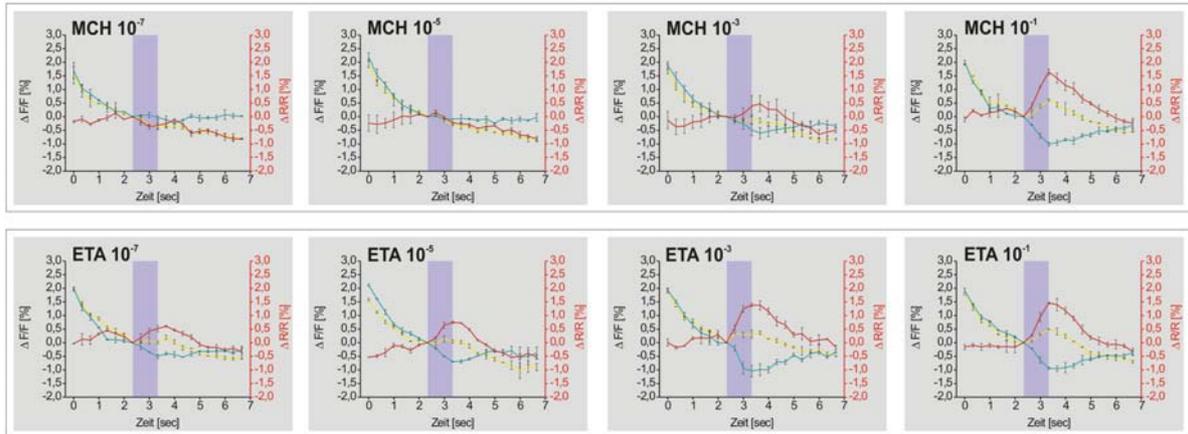
**I** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 2. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **H** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 5.

## 9.2.2 Methylcyclohexanol / Ethylacetat – Fliegen

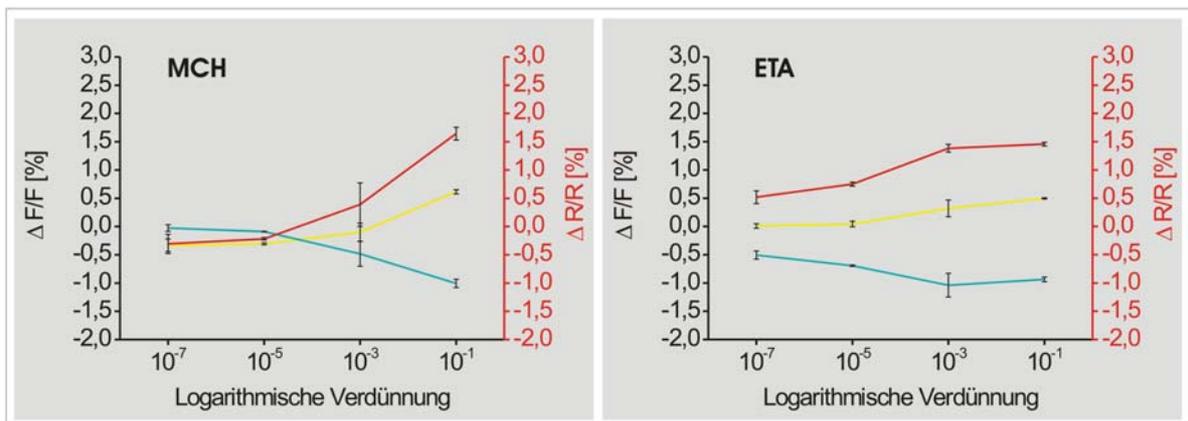
### MCH / ETA – Fliege 1:



## E Mittelwerte



## E Übersicht



**Abb. 9.9** Messung gegen die MCH – und ETA – Konzentrationsgradienten; Fliege 1

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C** und **D** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25 $\mu$ m.

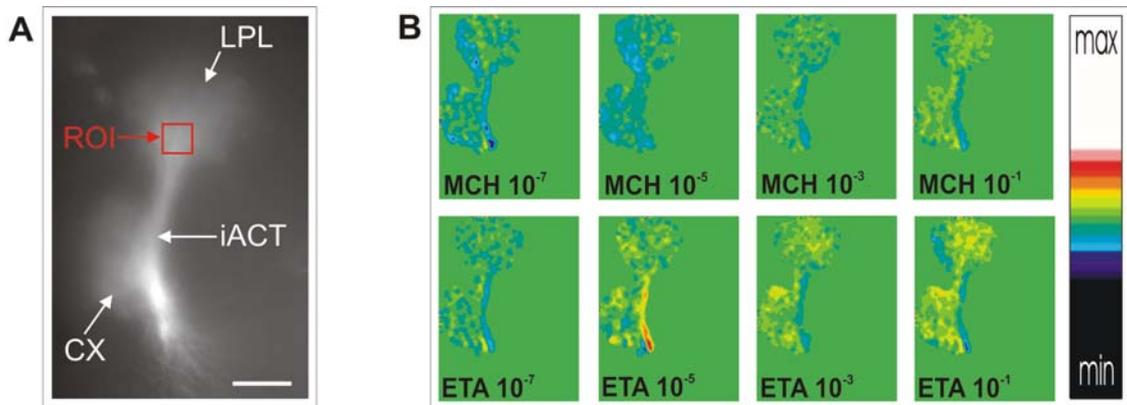
**B** Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster von Einzelmessung 1. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C + D** Zeitlicher Verlauf von Einzelmessungen 1 + 2. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

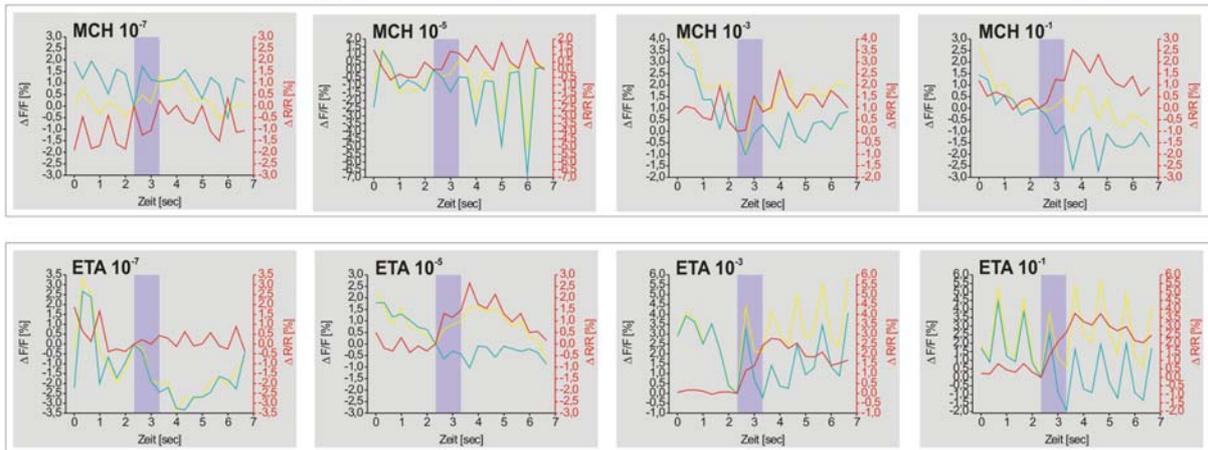
**E** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 2.

**F** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 1. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **E** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessung) = 2.

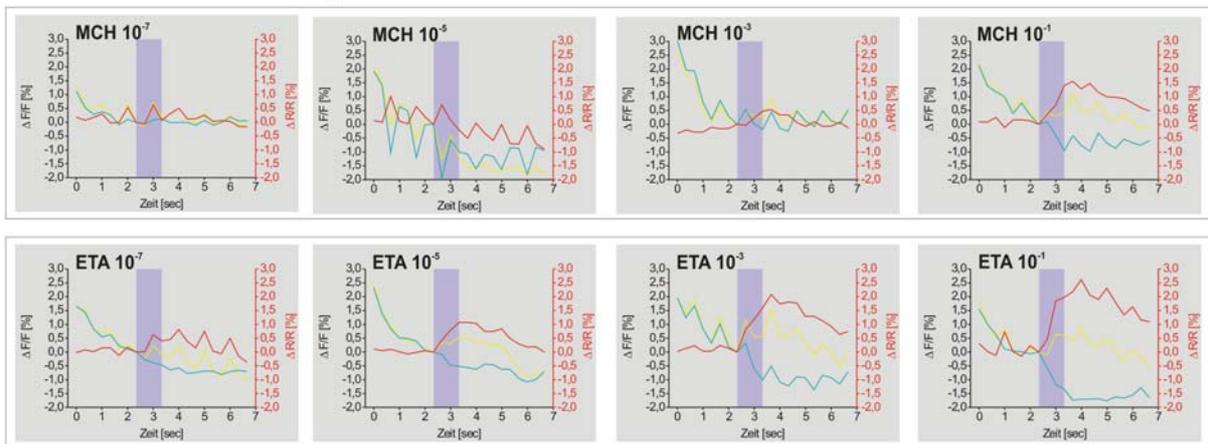
**MCH / ETA – Fliege 2:**



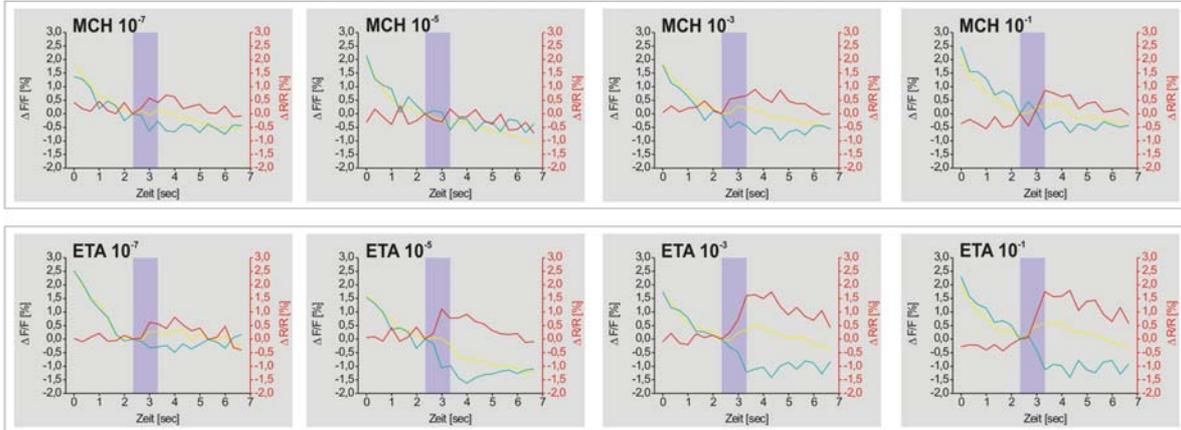
**C Einzelmessung 1**



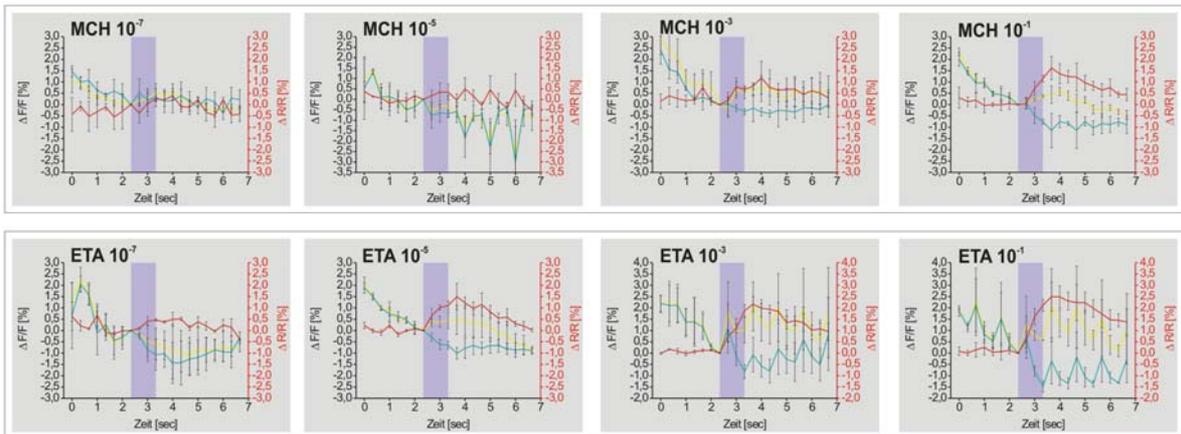
**D Einzelmessung 2**



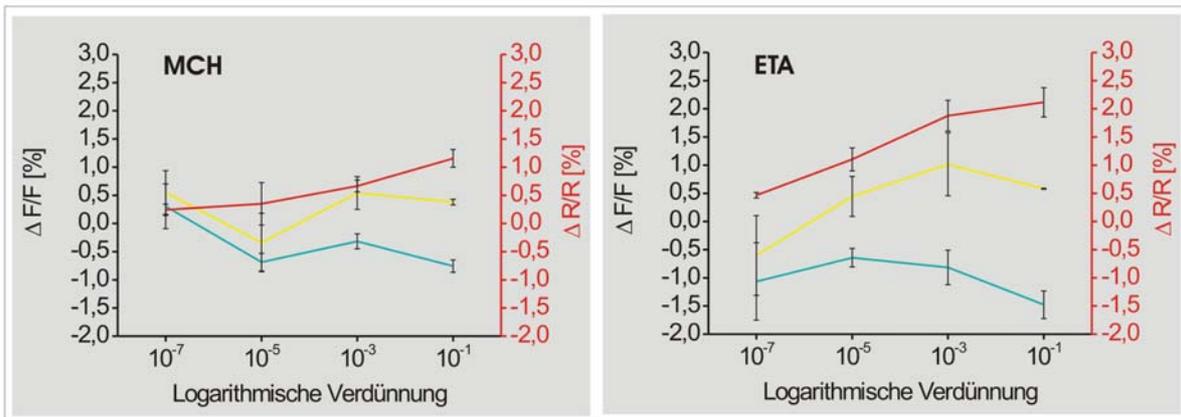
### E Einzelmessung 3



### F Mittelwerte



### G Übersicht



**Abb. 9.10** Messung gegen den MCH – und ETA – Konzentrationsgradienten; Fliege 2

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C – E** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

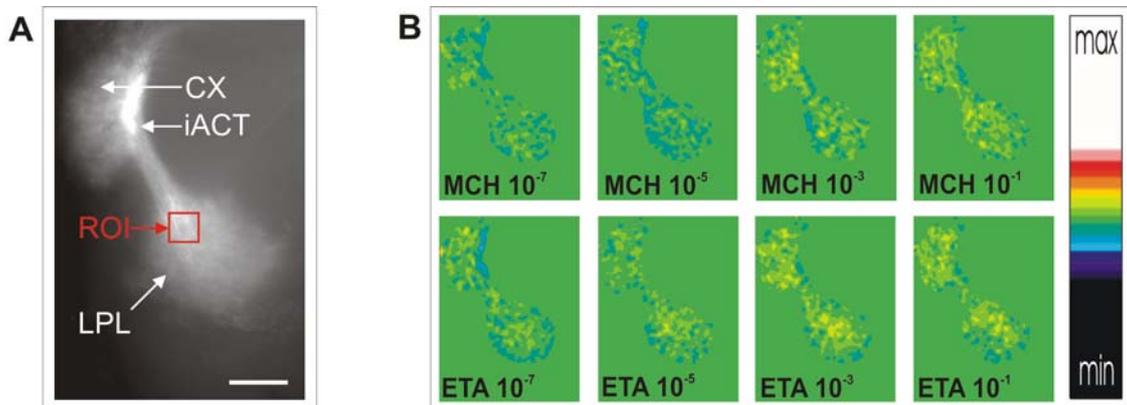
**B**  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster von Einzelmessung 2. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C - E** Zeitlicher Verlauf von Einzelmessungen 1 - 3. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

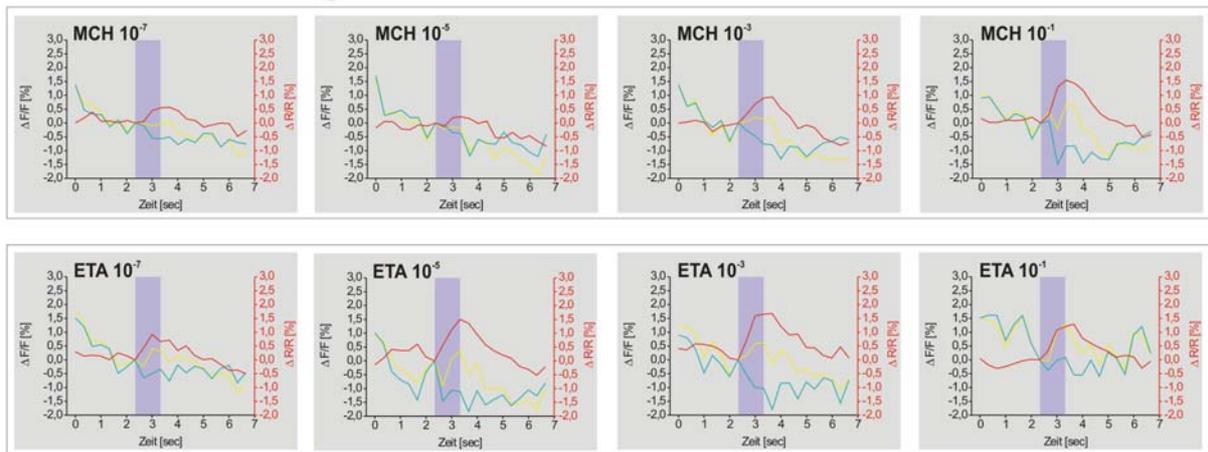
**F** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 3.

**G** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 2. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **F** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 3.

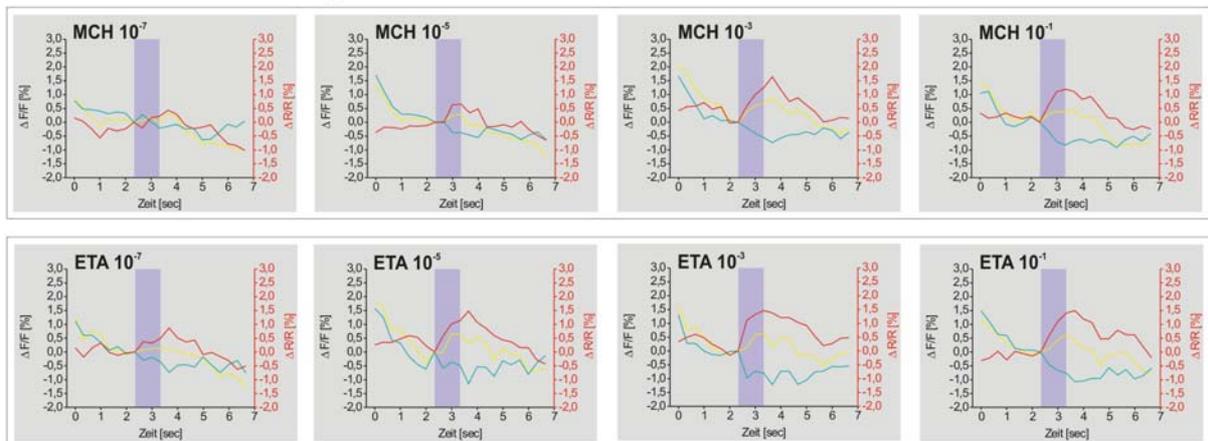
### MCH / ETA – Fliege 3:



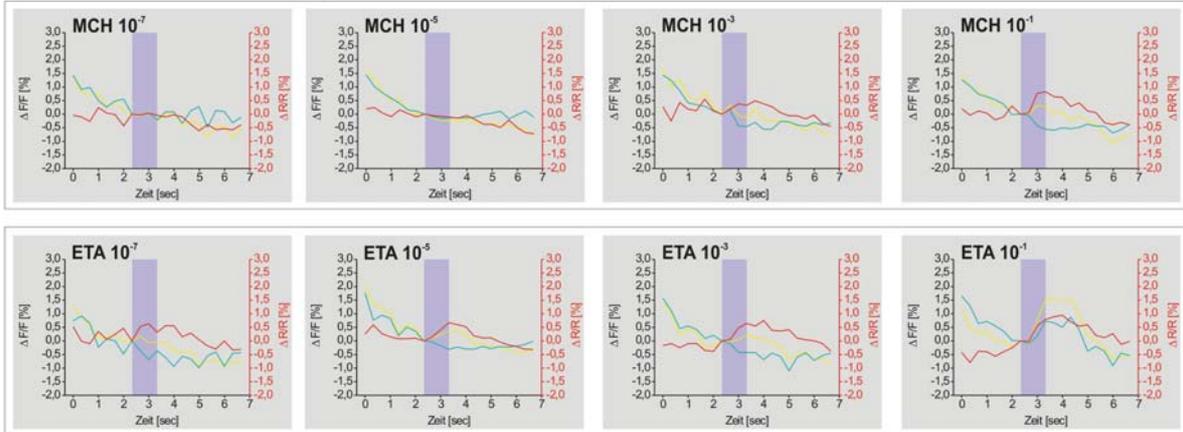
### C Einzelmessung 1



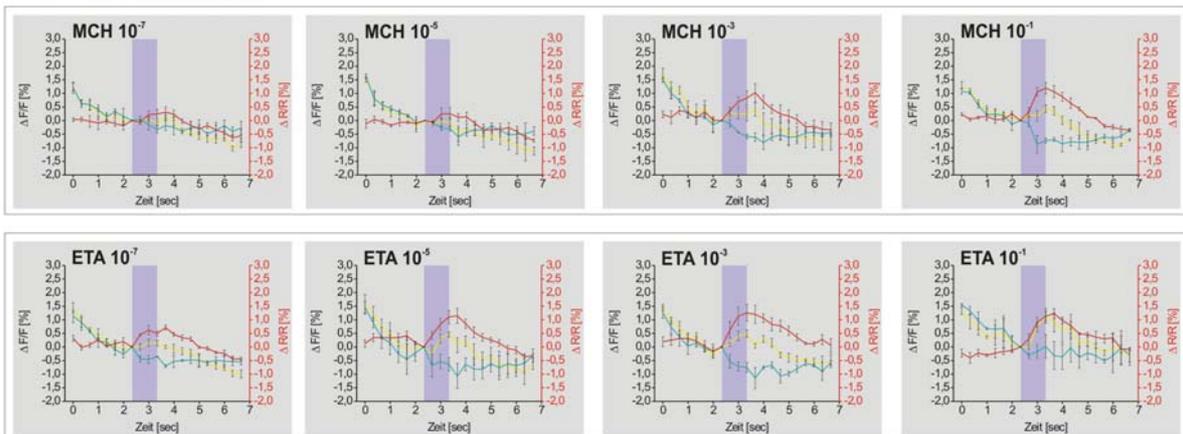
### D Einzelmessung 2



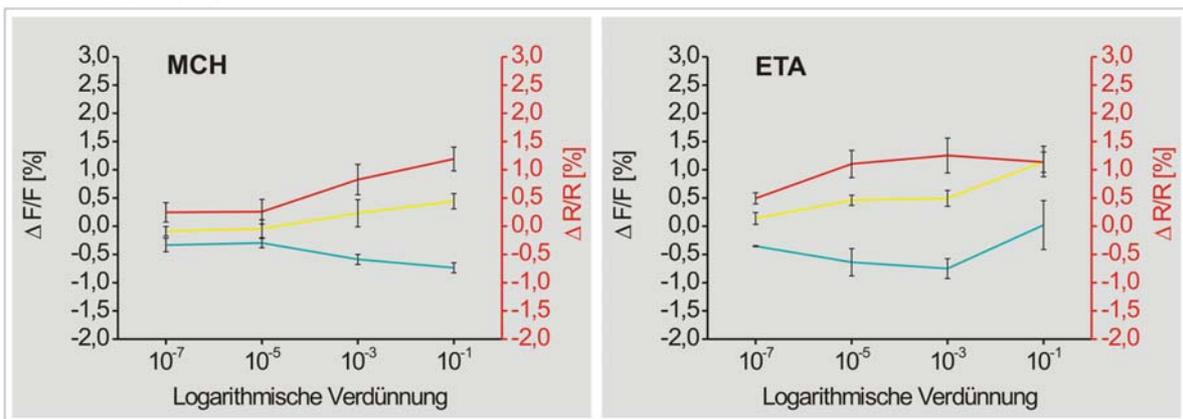
### E Einzelmessung 3



### F Mittelwerte



### G Übersicht



**Abb. 9.11** Messung gegen den MCH – und ETA – Konzentrationsgradienten; Fliege 3

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C – E** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

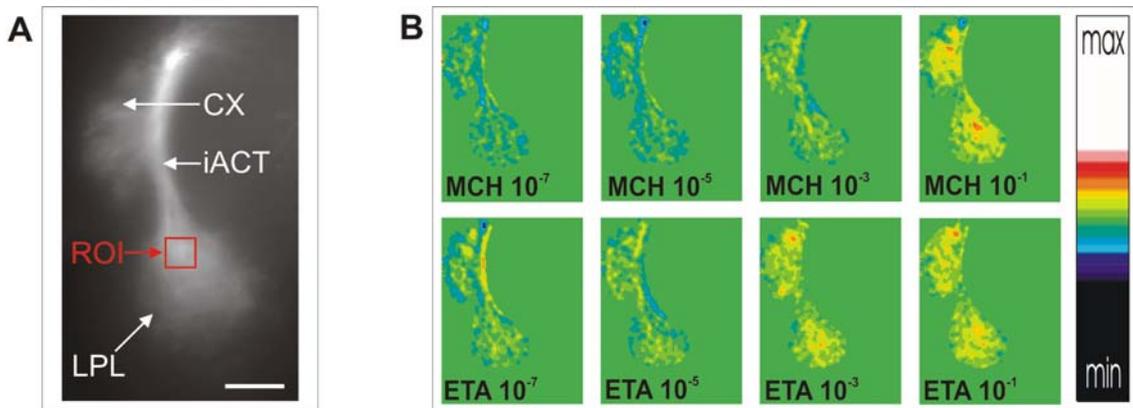
**B**  $\text{Ca}^{2+}$  – Aktivitätsmuster von Einzelmessung 1. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C - E** Zeitlicher Verlauf von Einzelmessungen 1 – 3. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

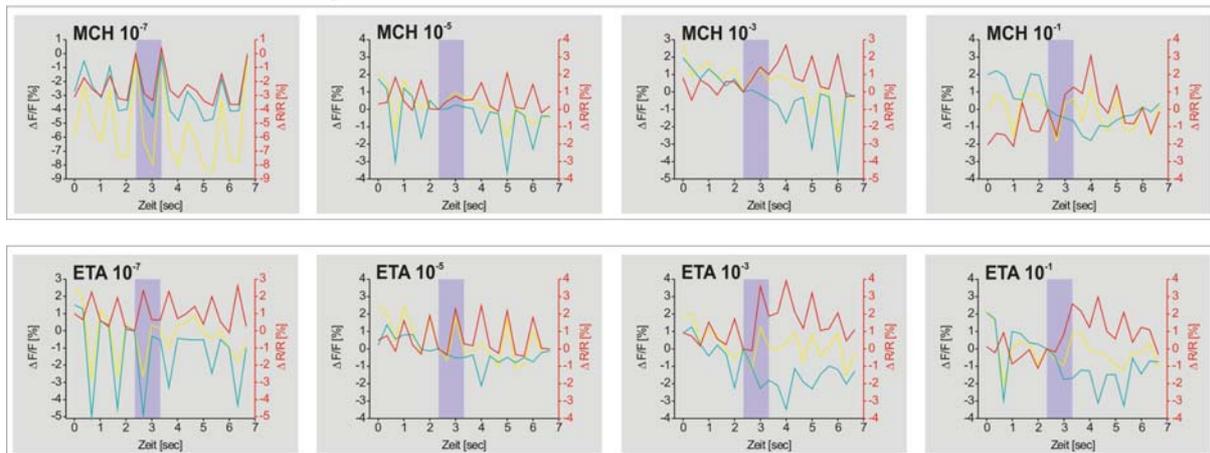
**F** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als  $\Delta F/F$  [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als  $\Delta R/R$  [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 3.

**G** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 3. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **F** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 3.

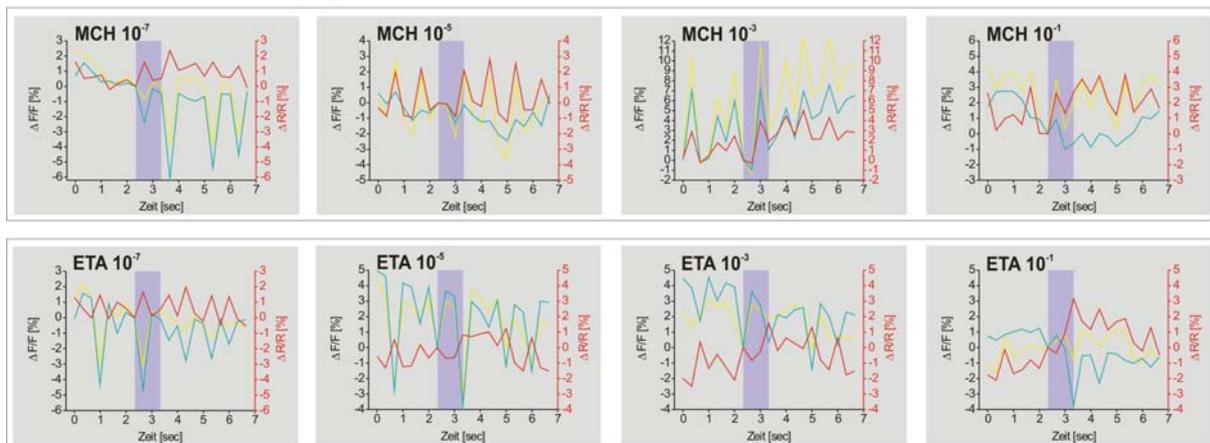
### MCH / ETA – Fliege 4:



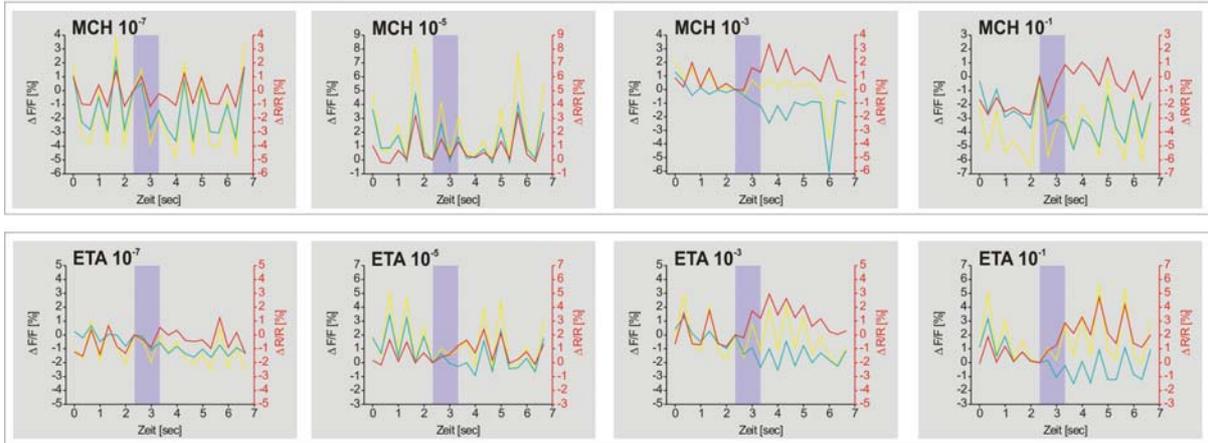
### C Einzelmessung 1



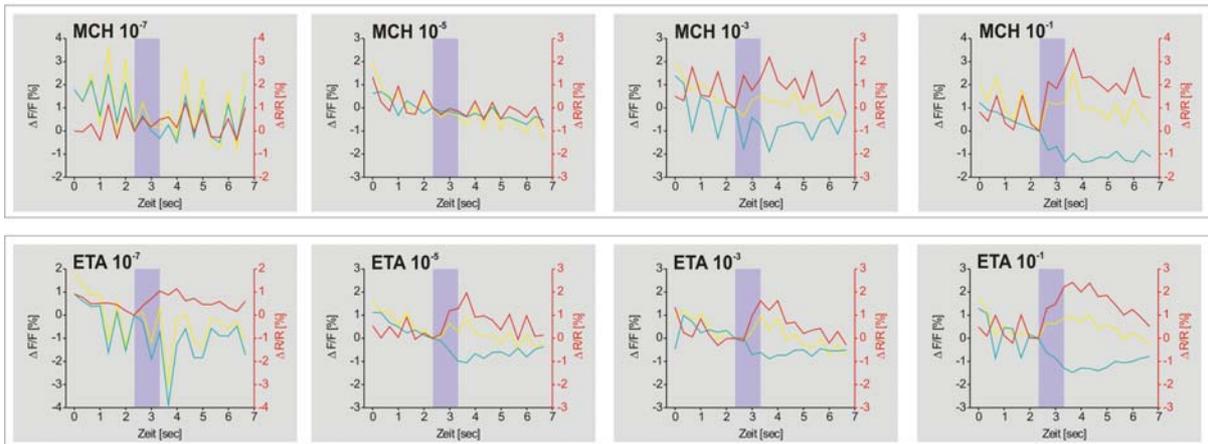
### D Einzelmessung 2



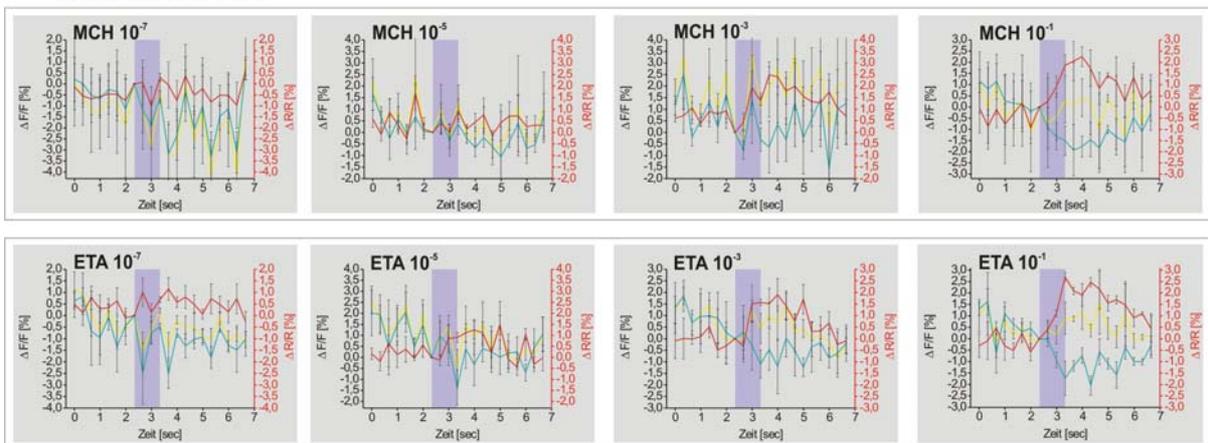
### E Einzelmessung 3



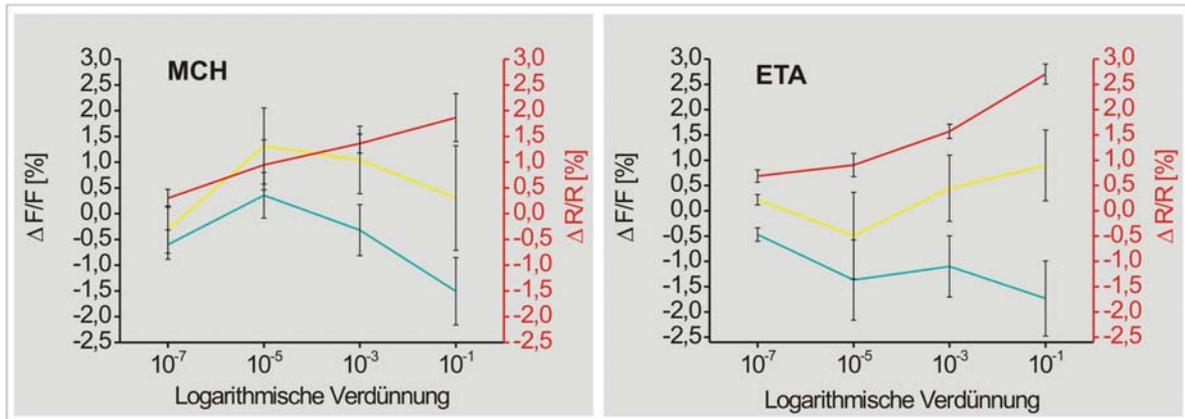
### F Einzelmessung 4



### G Mittelwerte



## H Übersicht



**Abb. 9.12** Messung gegen den MCH – und ETA – Konzentrationsgradienten; Fliege 4

**A** EYFP – Fluoreszenz der Projektionsneurone. Die Graphen in **C – F** sind aus der region of interest (ROI, rotes Quadrat) berechnet. LPL = laterales Protocerebrum, CX = Calyx, iACT = innerer Antennocerebraltrakt. Skalierungsbalken = 25µm.

**B** Ca<sup>2+</sup> – Aktivitätsmuster von Einzelmessung 3. Abgebildet sind die Aktivitätsmuster für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA), und der Falschfarbenskalierungsbalken.

**C - F** Zeitlicher Verlauf von Einzelmessungen 1 – 4. Abgebildet sind die EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als ΔF/F [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als ΔR/R [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert.

**G** Zeitlicher Verlauf der arithmetischen Mittelwerte aller Einzelmessungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup> der Düfte Methylcyclohexanol (MCH) und Ethylacetat (ETA). Die EYFP – und ECFP – Intensitäten sind als ΔF/F [%] dargestellt, die Ratio EYFP / ECFP als ΔR/R [%]. Die Duftgabe wird durch einen blauen Balken symbolisiert. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 4.

**H** Übersicht über die Mittelwerte der EYFP (gelb) –, ECFP (cyan) – und Ratio – Intensitäten (rot) für alle Einzelmessungen von Fliege 4. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Mittelwerte der EYFP –, ECFP – und Ratio – Intensitäten aus Abb. **G** zum Zeitpunkt 3,33 Sek. verwendet. Abgebildet ist der Standardfehler. n (Einzelmessungen) = 4.

## 9.3 Molekularbiologie

### 9.3.1 Inverse PCR an der Cameleon 2.0 Linie C2-6/STM

Im folgenden Abschnitt werden die erhaltenen Sequenzen aus den verschiedenen Ansätzen zur Lokalisation der P-Element Insertion in der Cameleon 2.0 Fliegenlinie dargestellt. Dabei gibt die Sequenz in rot den gefundenen Vektoranteil in der erhaltenen Sequenz an.

Inverse PCR mit den Primern pUAST-Hpall-1 und 2

```
TATCGACGGGACCACCTTATCGTTATTTTCATCATGGCTGCGCCTTTCTTTTGCTTCTTCCTGCTGCAATCAATAA
TACTCCGATACACAGGCTGCTCCTATCGATTGGGATATAAGGAACAGAAGTGTATCGATAAGTGGCTTCGAATTT
AATGAGTTATATTGACGATCGGTAATTTGCTAATTTTTATACTATAATATATTTCAAGTAATTATACTGGGCGGT
TATAAACGTAAAAGTTAAAAATTTAGAAATTAACCTCTTGCTAACCGATATCAATCACGGTGCGCATCTCTAATG
AAAATAGGAAAAGCGAAAGTCACGCAAAGCAGTAAACAAATTTAAGGTATATCGATAGACGTACACCCACAACCC
CAATTCCAACCGGGATATATTTTTTATATACATAC
```

Inverse PCR mit den Primern pUAST-HaeIII-3 und 4

```
CATCAGACTTATAAATAGAAAGTTGG
```

### 9.3.2 Lage der Primer

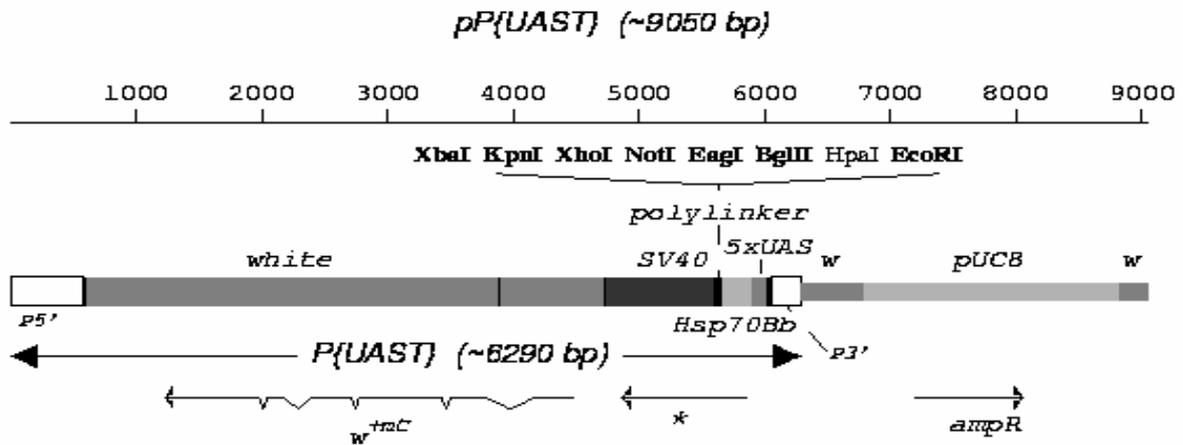
Die Primer für die Inverse PCR am pUAST-Vektor liegen im folgenden Bereich des Vektors:

pUAST-Hpall-1 :	912-929 bp im Vektor
pUAST-Hpall-2 :	87-104 bp im Vektor
pUAST-HaeIII-3:	6244-6261 bp imVektor
pUAST-HaeIII-4:	5796-5813 bp im Vektor
72-HaeIII-5:	1247-1263 bp im Vektor

### 9.3.3 Verwendete Vektoren

pP{UAST}

Brand und Perrimon, 1993



**Abb. 9.13** Klonierungsvektor pP{UAST} zur P-Element Keimbahntransformation. Abbildung entnommen aus Diegelmann, 2004.

Er enthält 5 in Tandem angeordnete Gal4 Bindungsstellen (5xUAS, upstream activating sequence), einen Hsp70Bb Promotor (heat shock promotor), einen Polylinker und ein SV40 Polyadenylierungssignal sowie eine Ampicillin-Resistenz (*ampR*) und ein modifiziertes *white*-Gen als Marker (Brand und Perrimon, 1993).

## 9.4 Software für *in – vitro* Cameleon 2.1 – Funktionsanalyse

Eigenhändig programmierte Turbo – Pascal – Software “OnlineRatioing” mit dazugehörigen Units.

Programm und Units dienen zur Datenaufnahme (EYFP –, und ECFP – Rohdaten) von den beiden Photomultipliern der Messapparatur zur *in – vitro* Cameleon 2.1 – Funktionsanalyse, der Berechnung der Ratio aus EYFP / ECFP und der grafischer Datendarstellung. Es besteht die Möglichkeit, die Daten zu speichern, in Excel zu konvertieren, gespeicherte Daten aufzurufen und grafisch darzustellen.

```

program OnlineRatioing
uses crt,dos,graph,world,dr_pcl_2;

type datarec = array [0..1000] of integer;
   arttyp = (load,save);
   flagrec = array [1..4] of boolean;
var
  dataexcel: text;
  datafile : file of datarec;
  datafilesave : file of flagrec;
  filename,filename,path,s,{sws,}pm1,pm2,filename1,rat: string;
  v_,i,a,p,n,graphdriver,graphmode,y_,y_{sw} : integer;
  x,y,ratior : real;
  datarat : array [0..1000] of real;
  ch: char;
  oldtime,newtime,triggertime: word;
  datasi,datasae: datarec;
  saveflag: flagrec;
  key,sf,h,m,sec,hs: word;
  triggered,frezed,clip,sinus,saegezahn,ratio,
  monitormenue1flag,monitormenue2flag,monitormenue3flag,
  monitormenue4flag: boolean;
{-----}
procedure Entergraphics;
  var Errcode : integer;
  const path = 'c:\tp\bgi';
begin
  graphdriver:=detect;
  initgraph(graphdriver,graphmode,path);
  Errcode:=graphresult;
  if Errcode <> grok then begin
    writeln('Graphicserror ',Errcode,' : ',grapherrormsg (Errcode));
    repeat until keypressed;
  closegraph;
  end;
  setbkcolor(black);
  setcolor(green);
end;
{-----}
procedure ClearArray;
begin
  for i:= 0 to 1000 do begin
    datasi[i]:= 0;
    datasae[i]:=0;
    datarat[i]:=0;
  end;
end;
{-----}
procedure createmonitor;
begin

```

```

setcolor(green);
defineworld(0,-10,5410,420);
linew(0,0,5410,0);
linew(0,0,0,410);
y:=0;
repeat
  linew(0,y,100,y);
  y:=y+41;
until y>411;
x:=0;
repeat
  linew(x,0,x,6);
  x:=x+541;
until x>=5411;
end;
{-----}
procedure createmonitor2;
begin
  setcolor(green);
  defineworld(0,-10,1000,420);
  linew(0,0,1000,0);
  linew(0,0,0,410);
  y:=0;
  repeat
    linew(0,y,10,y);
    y:=y+41;
  until y>411;
  x:=0;
  repeat
    linew(x,0,x,6);
    x:=x+100;
  until x>=1000;
end;
{-----}
procedure monitormenu1;
begin
  setcolor(white);
  { outtextxyw(100,400,'sweep: ');}
  outtextxyw(25,20,'Quit:      Press any Key');
  outtextxyw(25,10,'Freeze monitor: Press <Strg>+<left Shift>');
  { outtextxyw(25,30,'Stop:      Press <Strg>+<Alt>+<left Shift>');}
  outtextxyw(25,40,'Start:      Press <Strg>+<Alt>+<right Shift>'); }
  setcolor(yellow);setfillstyle(1,yellow); fillellipse(440,437,5,3);
  setcolor(white);outtextxyw(3860,30,' : EYFP/PM1');
  monitormenu1flag:=true;
  saveflag[1]:=true;
end;
{-----}
procedure monitormenu2;
begin
  setcolor(white);
  { outtextxyw(100,400,'sweep: ');}
  outtextxyw(25,20,'Quit:      Press any Key');
  outtextxyw(25,10,'Freeze monitor: Press <Strg>+<left Shift>');
  { outtextxyw(25,30,'Stop:      Press <Strg>+<Alt>+<left Shift>');}
  outtextxyw(25,40,'Start:      Press <Strg>+<Alt>+<right Shift>');}
  setcolor(lightcyan);setfillstyle(1,lightcyan);fillellipse(440,437,5,3);
  setcolor(white);outtextxyw(3860,30,' : ECFP/PM2');
  monitormenu2flag:=true;
  saveflag[2]:=true;
end;
{-----}
procedure monitormenu3;
begin
  setcolor(white);
  { outtextxyw(100,400,'sweep: ');}
  outtextxyw(25,20,'Quit:      Press any Key');
  outtextxyw(25,10,'Freeze monitor: Press <Strg>+<left Shift>');
  { outtextxyw(25,30,'Stop:      Press <Strg>+<Alt>+<left Shift>');}
  outtextxyw(25,40,'Start:      Press <Strg>+<Alt>+<right Shift>');}
  setcolor(lightred);setfillstyle(1,lightred);fillellipse(442,437,5,3);
  setcolor(white);outtextxyw(3860,30,' : Ratio EYFP/ECFP');
  monitormenu3flag:=true;
  saveflag[3]:=true;
end;
{-----}
procedure monitormenu4;

```

```

begin
  setcolor(white);
  outtextxyw(25,20,'Quit: Press any key');
  { outtextxyw(100,400,'sweep: '); }
  outtextxyw(25,10,'Freeze: <Strg>+<left Shift>');
  { outtextxyw(25,30,'Stop: <Strg>+<Alt>+<left Shift>'); }
  outtextxyw(25,40,'Start: <Strg>+<Alt>+<right Shift>');
  setcolor(7);
  outtextxyw(2700,10,'ON/OFF Sinus: <Alt>+<right shift>');
  outtextxyw(2700,20,'ON/OFF Sägezahn: <Alt>+<left shift>');
  outtextxyw(2700,30,'ON/OFF Ratio: <Strg>+<right shift>');
  setcolor(yellow);setfillstyle(1,yellow);fillellipse(62,474,5,3);
  setcolor(7);outtextxyw(660,-3,': EYFP/PM1');
  setcolor(lightcyan);setfillstyle(1,lightcyan);fillellipse(258,474,5,3);
  setcolor(7);outtextxyw(2260,-3,': ECFP/PM2');
  setcolor(lightred);setfillstyle(1,lightred);fillellipse(412,475,5,3);
  setcolor(7);outtextxyw(3560,-3,': Ratio EYFP/ECFP');
  monitormenue4flag:=true;
  saveflag[4]:=true;
end;
{-----}
procedure scankeyboard;
begin
  key:=mem[0:$417] and $0f;
  case key of
    $0d: begin
      trigger;
      triggered:=true;
      setttime(0,0,0,0);
      gettime(h,m,sec,hs);
      oldtime:=sec;
      { sw:=1;}
      clearviewport;
      createmonitor;
      if monitormenue1flag then monitormenue1;
      if monitormenue2flag then monitormenue2;
      if monitormenue3flag then monitormenue3;
      if monitormenue4flag then monitormenue4;
      { str(sw,sws);}
      { outtextxyw(550,400,sws);}
      cleararray;
      i:=-1;
      end;
    $0e: begin
      triggered:=false;
      { sw:=0;}
      end;
    $06: frozen:=true;
    $09: begin
      if sinus then sinus:=false else sinus:=true; end;
    $0a: begin
      if saegezahn then saegezahn:=false else saegezahn:=true; end;
    $05: begin
      if ratio then ratio:=false else ratio:=true; end;
  end;
end;
{-----}
procedure createdata;
begin
  i:=-1;
  p:=0;
  n:=0;
  { sw:=0;}
  { str(sw,sws);}
  { outtextxyw(550,400,sws);}
  repeat
    scankeyboard;
    inc(i);
    inc(n);
    if triggered then begin;
      gettime(h,m,sec,hs);
      newtime:=sec;
      triggertime:=newtime -oldtime;
      if triggertime >= 20 then begin
        trigger;
        oldtime:=newtime;
        { sw:=sw+1;}
      end;
    end;
  until i=4;
end;

```

```

clearviewport;
createmonitor;
if monitormenue1flag then monitormenue1;
if monitormenue2flag then monitormenue2;
if monitormenue3flag then monitormenue3;
if monitormenue4flag then monitormenue4;
{ str(sw,sws);}
{ outtextxyw(550,400,sws);}
cleararray;
i:=-1;
end;
end;
y_ := datapoint+2049; {Sägezahn}{+2049=Offset,d.h.alle Datenpunkte positiv}
y__:= datapoint+2049; {Sinus}
rator:=((y_/y__)*273);
if n = 6 then begin
inc(p);
datasi[p]:=trunc(y_/10);
datasae[p]:=trunc(y_/10);
datarat[p]:=rator;
n:=0;
end;
movetow(i,y_/10);
if sinus then begin
setcolor(lightcyan);
linetow(i,y_/10);
end;
if saegezahn then begin
setcolor(yellow);
movetow(i,y_/10);
linetow(i,y_/10);
end;
if ratio then begin
setcolor(lightrd);
movetow(i,rator);
linetow(i,rator);
end;
movetow(i,y_/10);
setcolor(yellow);
if freezed then begin
ch:=readkey;
movetow(i,y_/10);
freezed:=false;
end;
if i >= 5400 then begin
clearviewport;
createmonitor;
if monitormenue1flag then monitormenue1;
if monitormenue2flag then monitormenue2;
if monitormenue3flag then monitormenue3;
if monitormenue4flag then monitormenue4;
cleararray;
i:=-1;
p:=0;
n:=0;
end;
until keypressed;
ch:= readkey;
triggered:=false;
end;
{-----}
procedure displaydata (monitormenuechoice: word);
begin
saveflag[1]:=false;
saveflag[2]:=false;
saveflag[3]:=false;
saveflag[4]:=false;
entergraphics;
createmonitor;
if monitormenuechoice = 1 then monitormenue1;
if monitormenuechoice = 2 then monitormenue2;
if monitormenuechoice = 3 then monitormenue3;
if monitormenuechoice = 4 then monitormenue4;
createdata;
clearviewport;
closegraph;
ratio:=true;

```

```

sinus:=true;
saegezahn:=true;
monitormenue1flag:= false;
monitormenue2flag:= false;
monitormenue3flag:= false;
monitormenue4flag:= false;
end;
{-----}
function filecheck (filename:string; art:arttyp):boolean;
var testfile: file;
begin
  {$I-}
  assign(testfile,filename);
  if art=save then rewrite(testfile) else reset(testfile);
  close(testfile);
  {$I+}
  filecheck:=IOResult=0;
end;
{-----}
procedure savedata;
const path = 'C:\data\';
var taste:char;
begin
  clrscr;
  textcolor(12);writeln;writeln;writeln;
  write(' Save data as .dat-File. ');
  textcolor(7);
  writeln(' Please type filename (without path and .dat) : '); textcolor(lightred);
  gotoxy(32,7);
  readln(filename);
  filename:=path+filename+'.dat';
  if filecheck(filename,save) then begin
    assign(datafile,filename);
    rewrite(datafile);
    write(datafile,datasae);
    write(datafile,datasi);
    close(datafile);
    filename:=path+filename+'.flag';
    assign(datafilesave,filename);
    rewrite(datafilesave);
    write(datafilesave,saveflag);
    close(datafilesave);
    writeln;
    textcolor(7);
    writeln('          File saved!');
  delay(1000);
  cleararray;
  end
  else begin
    writeln('          File-/Disk-/Drive-Error! <Taste>');
    taste:=readkey;
  end;
end;
{-----}
procedure Excelconversion;
const path2 = 'C:\datacon\';
begin
  clrscr;
  textcolor(12);writeln;writeln;writeln;
  write(' Save data as Excel-File. ');
  textcolor(7);
  writeln(' Please type filename (without path and .dat) : '); textcolor(lightred);
  gotoxy(32,7);
  readln(filename1);
  filename:=path2+filename1+'.dat';
  if filecheck(filename,save) then begin
    assign(dataexcel,filename);
    rewrite(dataexcel);
    p:=0;
    repeat
      inc(p);
      str((datasi[p]):4,pm1);
      str((datasae[p]):4,pm2);
      str(trunc(datarat[p]):4,rat);
      write(dataexcel,pm1,pm2,rat,#13);
    until p >=900;
  end;
end;

```

```

end;
{-----}
procedure loaddata;
const path = 'C:\data\';
var taste:char;
begin
  clrscr;
  textcolor(12);writeln;writeln;writeln;
  write('  Load .dat-Files. ');
  textcolor(7);
  writeln(' Please type filename (without path and .dat) :');textcolor(lightred);
  gotoxy(32,7);
  readln(filename);
  filename:=path+filename+'.dat';
  if filecheck(filename,load) then begin
    assign(datafile,filename);
    reset(datafile);
    read(datafile,datasi);
    read(datafile,datasae);
    close(datafile);
    filename:=path+filename+'.flag';
    assign(datafilesave,filename);
    reset(datafilesave);
    read(datafilesave,saveflag);
    close(datafilesave);
    entergraphics;
    createmonitor2;
    if saveflag[1] then saegezahn:= true else saegezahn := false;
    if saveflag[2] then sinus:=true else sinus := false;
    if saveflag[3] then ratio:=true else ratio:=false;
    if saveflag[4] then begin
      saegezahn:=true;
      sinus:=true;
      ratio:=true;
    end;
    i:=-1;
    repeat
      Inc(i);
      y_ := datasi[i]; {S,gezahn}
      y__:= datasae[i]; {Sinus}
      if y__ > 0 then begin
        rator:=(y_/y__)*273;
        movetow(i-1,y__);
        if sinus then begin
          setcolor(lightcyan);
          linetow(i,y__);
        end;
        if saegezahn then begin
          setcolor(yellow);
          movetow(i-1,y__);
          linetow(i,y__);
        end;
        if ratio then begin
          setcolor(lightred);
          movetow(i-1,rator);
          linetow(i,rator);
        end;
        movetow(i-1,y__);
        setcolor(yellow);
      end;
    until keypressed;
    ch:= readkey;
    clearviewport;
    closegraph;
    for i:= 1 to 4 do begin
      saveflag[i]:= false;
    end;
  end
end
else begin
  textcolor(7);
  writeln;
  writeln('          File-/Disk-/Drive-Error! ');delay(1000);
  writeln('  Make sure, that you enter the correct filename. Try again? <Y/N>');
  taste:=readkey;
  case taste of
    'n' : exit;
    'y' : loaddata;
  end;
end;

```

```

end;
end;
end;
{-----}
procedure menue;
begin
  clrscr;
  writeln;writeln;writeln;textcolor(lightred);
  writeln('          ***** OnlineRatiaoing *****');
  writeln;
  writeln;
  writeln;
  textcolor(7);
  writeln('          <0> EYFP / PM1');
  writeln('          <1> ECFP / PM2');
  writeln('          <2> Ratio EYFP/ECFP');
  writeln('          <3> EYFP / ECFP / Ratio');
  textcolor(8);
  writeln('          <4> Load Data');
  writeln('          <5> Save Data');
  writeln('          <6> Save Data in Excelformat');
  writeln('          <Esc> Exit');
  ch:=readkey;
  case ch of
    '0': begin sound(1000);delay(90);nosound;SetScanchannel(0,0); ratio:=false;sinus:=false;displaydata(1); end;
    '1': begin sound(1000);delay(90);nosound;Setscanchannel(1,1); ratio:=false;saegezahn:=false;displaydata(2); end;
    '2': begin sound(1000);delay(90);nosound;Setscanchannel(0,1); sinus:=false;saegezahn:=false;displaydata(3); end;
    '3': begin sound(1000);delay(90);nosound;setscanchannel(0,1); displaydata(4); end;
    '4': begin sound(1000);delay(90);nosound;loaddata;end;
    '5': begin sound(1000);delay(90);nosound;savadata;end;
    '6': begin sound(1000);delay(90);nosound;excelconversion;end;
    #27: exit;
  end;
end;
{-----}
begin
  Init812;
  cleararray;
  triggered:=false;
  ratio:=true;
  saegezahn:=true;
  sinus:=true;
  repeat
    menue;
  until ch=#27;
end.

```

---

```

unit dr_pcl_2;

```

```

interface

```

```

procedure Init812;
procedure SetScanChannel (channel0,channel1 : byte);
function Datapoint: Integer;
function sweepend: Integer;
procedure trigger;

```

```

implementation

```

```

uses Crt;
{$F+}
{$L 812tpf}

```

```

type smallarray=array[0..5] of integer;
   data_array=array[0..10000] of integer;

```

```

var parm:smallarray;
    ary1,ary2:data_array;
    k,er,fun:integer;
    port,start,stop:integer;
    number,y:char;

```

```

procedure pcl812(func:integer;var a,b,c,d:integer);external;
{-----}
procedure Init812;

```

```

{ ***** STEP 1: INITIALIZE DRIVER USING FUNC 0 ***** }

begin
  port:=$300;
  parm[0]:=port;
  parm[1]:=2;
  parm[2]:=3;
  fun:=0;
  pcl812 (fun,parm[0],ary1[0],ary2[0],er);
  if er <> 0
  then
    begin
      writeln (' DRIVER INITIALIZATION FAILED !');
      exit
    end;
end;
{-----}
procedure SetScanChannel(channel0,channel1 : byte);

{ ***** STEP 2: SET SCAN CHANNEL RANGE USING FUNC 1 ***** }

begin
  parm[0]:=channel0;
  parm[1]:=channel1;
  fun:=1;
  pcl812 (fun,parm[0],ary1[0],ary2[0],er);

  if er<>0
  then
    begin
      writeln('SET SCAN CHANNEL FAILED! RE-ENTER');
      exit
    end;
  writeln;
end;
{-----}
function Datapoint: integer;

{ ***** STEP 3: PERFORM SINGLE A/D CONVERSION USING FUNC 3 ***** }

begin
  fun:=3;
  pcl812 (fun,parm[0],ary1[0],ary2[0],er);
  if er <> 0
  then
    begin
      writeln('A/D CONVERSION FAILED! ');
      exit
    end;
  Datapoint := parm[0];
  delay(1);
end;
{-----}
function sweepend: integer;

{ ***** STEP 3: PERFORM SINGLE A/D CONVERSION USING FUNC 3 ***** }

begin
  fun:=3;
  pcl812 (fun,parm[0],ary1[0],ary2[0],er);
  if er <> 0
  then
    begin
      writeln('A/D CONVERSION FAILED! ');
      exit
    end;
  sweepend := parm[0];
end;
{-----}
procedure trigger;
begin
  fun:=21;
  parm[0]:=0;
  parm[1]:=0;
  pcl812 (fun,parm[0],parm[1],ary1[0],er);

```

```

fun:=21;
parm[1]:=4;
parm[0]:=4;
pcl812 (fun,parm[0],parm[1],ary1[0],er);
if (er <> 0)
  then
  begin
  writeln ('WRITE DIGITAL OUTPUT FAILED ');
  exit
  end;
end;
{-----}
end.

```

---

Unit "world" von Reinhard Wolf programmiert und zur Nutzung erhalten.

```

unit world;

interface

procedure DefineWorld(Xmin,Ymin,Xmax,Ymax : real);
procedure DrawFrame;
function Xp(x : real) : integer;
function Yp(y : real) : integer;
function Rp(radius : real) : integer;
procedure SetViewportW(x1,y1,x2,y2 : integer; clip : boolean);
procedure lineW(x1,y1,x2,y2 : real);
procedure LineToW(x,y : real);
procedure MoveToW(X,Y : real);
procedure RectangleW(X1,Y1,X2,Y2 : real);
procedure BarW(x1,y1,x2,y2 : real);
procedure FloodFillW(x1,y1 : real; border : word);
procedure arcW(x,y : real; StAngle,EndAngle : word; radius : real);
procedure PieSliceW(x,y : real; StAngle,EndAngle : word; radius : real);
procedure CircleW(x,y,radius : real);
procedure PutPixelW(X,Y : real; Pixel : word);
function GetPixelW(X,Y : real) : word;
procedure OutTextXYW(x,y : real; TextString : string);
procedure SetPosW(x,y : real);
procedure StoreWorld(Nr : integer; X1,Y1,X2,Y2 : real);
procedure RestoreWorld(Nr : integer; X1,Y1 : real; PutType : word);
procedure FreeWorldMem(Nr : integer);

var WorldError : boolean;

implementation
uses graph,crt,mouse;

var
  Xo_UserAxis,Yo_UserAxis,
  XaxisScale,YaxisScale      : real;
  XmaxGlb,YmaxGlb           : integer;
  ImgPntr                   : array[1.. 10] of pointer;
  WorldSize                  : array[1.. 10] of word;
{-----}
procedure DefineWorld(Xmin,Ymin,Xmax,Ymax : real);
begin
  XmaxGlb := GetMaxX;
  YmaxGlb := GetMaxY;
  XaxisScale := XmaxGlb/(Xmax-Xmin);
  YaxisScale := YmaxGlb/(Ymax-Ymin);
  Xo_UserAxis:= -Xmin * XaxisScale;
  Yo_UserAxis:=  Ymax * YaxisScale;
end;
{-----}
procedure DrawFrame;
begin
  Rectangle(0,0,GetMaxX,GetMaxY);
end;
{-----}
function Xp(x : real) : integer;
var z : integer;
begin
  z := round(Xo_UserAxis + XaxisScale * x);
  if z>XmaxGlb then z:= XmaxGlb;

```

```

    if z<0 then z := 0;
    Xp := z;
end;
{-----}
function Yp(y : real) : integer;
var z : integer;
begin
    z := round(Yo_UserAxis - YaxisScale * y);
    if z>YmaxGlb then z:= YmaxGlb;
    if z<0 then z := 0;
    Yp := z;
end;
{-----}
function Rp(radius : real) : integer;
begin
    rp := round(XaxisScale * radius);
end;
{-----}
procedure SetViewportW(x1,y1,x2,y2 : integer; clip : boolean);
begin
    SetViewport(xp(x1),yp(y1),xp(x2),yp(y2),clip);
end;
{-----}
procedure lineW(x1,y1,x2,y2 : real);
begin
    line(xp(x1),yp(y1),xp(x2),yp(y2));
end;
{-----}
procedure LineToW(x,y : real);
begin
    LineTo(Xp(x),Yp(y));
end;
{-----}
procedure MoveToW(X,Y : real);
begin
    MoveTo(Xp(x),Yp(y));
end;
{-----}
procedure RectangleW(X1,Y1,X2,Y2 : real);
begin
    rectangle(Xp(x1),Yp(y1),Xp(x2),Yp(y2));
end;
{-----}
procedure BarW(x1,y1,x2,y2 : real);
begin
    bar(Xp(x1),Yp(y1),Xp(x2),Yp(y2));
end;
{-----}
procedure FloodFillW(x1,y1 : real; border : word);
begin
    FloodFill(Xp(x1),Yp(y1),border);
end;
{-----}
procedure arcW(x,y : real; StAngle,EndAngle : word;radius : real);
begin
    arc(Xp(x),Yp(y),StAngle,EndAngle,rp(radius));
end;
{-----}
procedure PieSliceW(x,y : real; StAngle,EndAngle : word;radius : real);
begin
    PieSlice(Xp(x),Yp(y),StAngle,EndAngle,rp(radius));
end;
{-----}
procedure CircleW(x,y,radius : real);
begin
    circle(Xp(x),Yp(y),Rp(radius));
end;
{-----}
procedure PutPixelW(X,Y : real; Pixel : word);
begin
    PutPixel(Xp(x),Yp(y),Pixel);
end;
{-----}
function GetPixelW(X,Y : real) : word;
begin
    GetPixelW := GetPixel(Xp(x),Yp(y));
end;

```

```
{-----}
procedure OutTextXYW(x,y : real; TextString : string);
begin
  OutTextXY(Xp(x),Yp(y),TextString);
end;
{-----}
procedure SetPosW(x,y : real);
begin
  SetPos(Xp(x),Yp(y));
end;
{-----}
procedure StoreWorld(Nr : integer; X1,Y1,X2,Y2 : real);
begin
  WorldError := false;
  WorldSize[Nr] := ImageSize(xp(X1),yp(Y1),xp(X2),yp(Y2));
  if (WorldSize[Nr]>0) and (WorldSize[Nr]<MaxAvail) then begin
    GetMem(ImgPntr[Nr],WorldSize[Nr]);
    GetImage(xp(X1),yp(Y1),xp(X2),yp(Y2),ImgPntr[Nr]^);
  end else begin
    CloseGraph;
    ClrScr;
    writeln('world size too large : ',WorldSize[Nr]);
    writeln('available : ',MaxAvail,' bytes');
    writeln('press any key');
    WorldError := true;
    repeat until KeyPressed;
  end;
end;
{-----}
procedure RestoreWorld(Nr : integer; X1,Y1 : real; PutType : word);
begin
  PutImage(xp(X1),yp(Y1),ImgPntr[Nr]^,PutType);
end;
{-----}
procedure FreeWorldMem(Nr : integer);
begin
  FreeMem(ImgPntr[Nr],WorldSize[Nr]);
end;
{-----}
end.
```

## 10. Abkürzungen

$\mu$	mikro	DNA	Desoxyribonukleinsäure
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	ECFP	Enhanced Cyan Fluorescent Protein
Abb.	Abbildung	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AL	Antennallobus	EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ATP	Adenosintriphosphat	EJP	excitatory junctional potential
BEA	Benzaldehyd	ETA	Ethylacetat
BUT	1-Butanol	et al.	et alii
bp	Basenpaare	EtOH	Ethanol
BP	Bandpassfilter	EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
bzw.	beziehungsweise	F	Fluoreszenz
ca.	circa	FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium-Ion	g	Gramm
CaAM	Calcium-Aktivitätsmuster	gem.	gemittelt
Cam	Cameleon	GFP	Green Fluorescent Protein
CaM	Calmodulin	Glo	Glomerulus
cAMP	cyclisches Adenosin-monophosphat	h	Stunde
CCD	Charge Coupled Device	Hg	Quecksilber
cDNA	complementary DNA	$\text{H}_2\text{O}$	Wasser
cm	Zentimeter	Hz	Hertz
CX	Calyx	IAA	Isoamylacetat
<i>CyO</i>	<i>Curly O</i>	iACT	innerer Antennocerebraltrakt
d. h.	das heißt	k	kilo
Da	Dalton	$\text{K}^+$	Kalium-Ion
dest.	destilliert	kb	Kilobasen
$\text{dH}_2\text{O}$	vollentsalztes Wasser	KCl	Kaliumchlorid
DLCP	dichroitischer Langpassfilter		
dNTPs	Polynukleotide		

kDa	Kilodalton	PCR	Polymerase Chain Reaction
l	Liter	PI	Performance Index
Locl	lokale Interneurone	PKA	Protein Kinase A
LPL / LPR	laterales Protocerebrum	PM	Photomultiplier
Lsg.	Lösung	PRO	Propionsäure
LUT	look up table	Px	Pixel
m	milli	R	Ratio
M	molar	RI	relay interneurons = OPN
mACT	medianer Antennocerebraltrakt	RNA	Ribonukleinsäure
max.	maximal	RNAase	Ribonuklease
MCH	Methylcyclohexanol	ROI	region of interest
min.	minimal	RT	Raumtemperatur
Min	Minute / Mineralöl	s.a.	siehe auch
ml	Milliliter	<i>Sco</i>	<i>Scutoid</i>
mm	Millimeter	SDS	Sodiumdodecylsulfat
mM	Millimolar	SDS-Page	Sodium-dodecyl-sulfat- Polyacryl-Gel-Elektrophorese
MOL	Mineralöl	sec	Sekunde
ms	Millisekunde	SV	Synaptischer Vesikel
n	nano	t	time / Zeitpunkt
NA	numerische Appertur	Tab.	Tabelle
ng	Nanogramm	TBE	Tris- HCl, Borat, EDTA
nm	Nanometer	TE	Tris- HCl, EDTA
OCT	1-Octanol	Tris	Trishydroxymethylamino methan
OD	optische Dichte	UAS	upstream activating sequence
OPN	olfaktorisches Projektions- neuron	V	Volt
OR	olfaktorischer Rezeptor	<i>w</i>	<i>white</i>
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron	WT	Wildtyp
P	P-Element	z.B.	zum Beispiel
PBS	Phosphate Buffered Saline		

## 11. Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Erich Buchner danke ich für die Überlassung des Themas, den stets freundlichen und kollegialen Umgang, die interessanten Diskussionen und die Möglichkeit meine Ideen und Vorstellungen ohne jede Einschränkung umsetzen zu können.

André Fiala danke ich für seine fachliche Unterstützung. Seine stets aufmunternden Worte, Anregungen und Hilfestellungen hatten wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Sören Diegelmann, mit dem ich über die vier Jahre meiner Promotion eine nahezu eheähnliche Verbindung eingegangen bin, danke ich für viele witzige Momente im Labor, eine Zweitwohnung in Gerbrunn und die immer noch phasenweise wiederkehrenden Albträume, ich hätte isolierte DNA weggeworfen. Dank geht natürlich auch an alle weiteren Mitglieder der Imaging – Gruppe. Tom, Deine Grundversorgung mit ausgewählten Musikstücken hat mir so manchen Labortag versüßt. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik und Neurobiologie für das angenehme Arbeitsklima und so manches nette Gespräch. Mein besonderer Dank gilt hier natürlich vor allem den Angehörigen der Arbeitsgruppe Buchner: Natalja Funk, Christian Leibold, Susanne Jatzke, Henrike Scholz, Isabell Schwenkert, Dhananjay Wagh, Natascha Pohar, Saskia Huber und Dieter Dudaczek. Dieter, danke für Deine Hilfe bei den Kursen und vor allem für das Schleifen meiner Pinzetten. Ohne Deine Präzisionswerkzeuge hätte ich wohl nie ein Fliegenhirn zu Gesicht bekommen. Für Deine Gesundheit wünsche ich Dir alles erdenklich Gute. Für die technische Unterstützung möchte ich mich bei Konrad Oechsner, Hans Kaderschabek und Reinhard Wolf bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön geht an alle meine Freunde. Eure Freundschaft hat mir über so manche schwere Phase geholfen und übersteigt bei weitem den Wert dieser Arbeit. Verena, Dir danke ich für Deine bedingungslose Geduld beim Zusammenschreiben dieser Arbeit und vor allem für Deine Wärme und Herzlichkeit.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung über all die Jahre meines Studiums und der anschließenden Promotion hinweg bedanken. Ohne Euren familiären Halt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke.

# Lebenslauf

Thomas Ludolf Ottmar Spall

**Persönliche Daten:** 17.08.1973 geboren in Miltenberg am Main, Deutschland

**Schulbildung:** 1979-1983 Volksschule Röllfeld, Klingenberg am Main  
1984-1992 Hermann-Staudinger-Gymnasium, Erlenbach am Main  
08.07.1992 Allgemeine Hochschulreife

**Wehrdienst:** 1992-1993 beim 2.SanBtl.12 in Würzburg

**Studium:** 1993-1999 Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
1995+1996 Akademische Zwischenprüfungen im Fach Biologie (Zoologie, Botanik) und Chemie (Anorganische, Organische und Physikalische Chemie)  
10.12.1997 Fertigstellung der Zulassungsarbeit für das 1.Staatsexamen am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie mit dem Titel: "Geschlechtsunterschiede der Körperstruktur und Mosaiktier von *Calliphora vicina* (Ins., Dipt.)"  
1999 1. Staatsexamen in Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien

**Promotion:** ab 04.2000 Promotion am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Titel: "Optische Visualisierung neuronaler Aktivität: Etablierung des *in – vivo* Calcium Imaging mit dem genetisch codierten Sensor Yellow Cameleon 2.1 und Untersuchung der olfaktorischen Codierung im Gehirn von *Drosophila melanogaster* "

Würzburg, den 08.04.2004

---

Thomas Spall

## Publikationen

Diegelmann S., Fiala A., Leibold C., Spall T., Buchner E. (2002). Transgenic flies expressing the fluorescence calcium sensor Cameleon 2.1 under UAS control. *Genesis* 34(1-2): 95-98.

Fiala A., Spall T., Diegelmann S., Eisermann B., Sachse S., Devaud J.M., Buchner E., Galizia C.G. (2002). Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Curr Biol* 12(21): 1877-1884.

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

## Konferenzteilnahmen mit eigener Datenpräsentation

Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Sachse, S., Devaud, J.M., Galizia, C.G., und Buchner, E. (2002). Watching a fly brain smelling: Visualization of olfactory neuronal activity in projection neurons of *Drosophila*. Symposium of the SFB 554, Retzbach, Germany, July 21-24, 2002. Poster

Symposium "Biomolecular Sensors in Neuroscience", Max-Delbrück-Centrum, Berlin Buch, Nov 2-7, 2002. Talk.

Fiala A., Spall T., Diegelmann S., Riemensperger T., Sachse S., Eisermann B., Devaud J.M., Galizia C.G., und Buchner E. (2003). Optical imaging of odorant representation in the *Drosophila* brain using cameleon. 29<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen, Germany, June 12-15, 2003. Poster.

## Konferenzbeiträge

Diegelmann, S., Dürrbeck, H., Fiala, A., Funk, N., Huber, S., Leibold, C., Pohar, N., Prüfert, K., Spall, T., Valas, A., und Buchner, E. (2001). Functional analysis of synaptic proteins in *Drosophila*. 8<sup>th</sup> Regional *Drosophila* Meeting 2001, Würzburg, Germany. Talk.

Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Schuster, C., Rodrigues, V., und Buchner, E., (2001). Towards neuronal calcium imaging in the *Drosophila* nervous system. Cold Spring Harbor Symposium on "Neurobiology of *Drosophila*", October 3-7, 2001. Poster.

Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Riemensperger, T., Galizia, C.G., und Buchner, E. (2001). Neuronal calcium imaging in the Drosophila brain. 5th Schloessmann Seminar on Optical Methods in Biology, Schloss Elmau, Germany, December 16-19, 2001. Poster.

Galizia, C.G., Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Sachse, S., Devaud, J.M., Eisermann, B., und Buchner, E. (2002). Olfactory information restructuring by projection neurons visualized with genetically expressed cameleon in Drosophila melanogaster. Berlin Neuroscience Forum 2002, Liebenwalde, Germany, April 18-20, 2002. Poster.

Galizia, C.G., Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Sachse, S., Devaud, J.M., Eisermann, B., und Buchner, E. (2002). Olfactory information restructuring by projection neurons visualized with genetically expressed cameleon in Drosophila melanogaster. 95. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Halle (Saale), Germany, May 20-24, 2002. Poster.

Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Sachse, S., Devaud, J.M., Galizia, C.G., und Buchner, E. (2002). Odour evoked calcium signals in olfactory projection neurons visualized using cameleon 2.1. 9<sup>th</sup> Regional Drosophila Meeting 2002, Bochum, Germany. Talk.

Galizia, C.G., Fiala, A., Spall, T., Sachse, S., Devaud, J.M., Eisermann, B., und Buchner, E. (2002). Visualization of olfactory information in projection neurons using genetically expressed cameleon in Drosophila melanogaster. Society for Neuroscience Annual Meeting, Orlando, USA, Nov 2-7, 2002. Poster.

# Erklärung

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität 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 benutzt zu haben. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Zuvor habe ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 29.02.2004

---

Thomas Spall