Ernst-Abbe-Hochschule Jena
University of Applied Sciences

Fachgebiet Augenoptik
Optometrie · Vision Science

Ernst – Abbe – Hochschule Jena

Fachbereich: SciTec

Studiengang: Optometrie / Vision Science (M. Sc.)

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT
Max-Planck-Institut für chemische Ökologie

Thema der Masterarbeit:	„Einfluss der Mitochondrien auf die Duftantwort olfaktorischer sensorischer Neurone von *Drosophila melanogaster*"
Name, Vorname:	Lucke, Jan
Geburtsdatum, Geburtsort:	28.08.1989, Saalfeld
Matrikelnummer:	637169
Name des Instituts:	Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
Abteilung:	Evolutionäre Neuroethologie
Anschrift:	Hans-Knöll-Straße 8 07745 Jena Deutschland
Betreuer / Mentor:	PD Dr. Dieter Wicher
Name Hochschulbetreuer:	Dr. rer. nat. Carola Wicher
Ausgabetermin:	12.11.2018
Abgabetermin:	18.03.2019

Abstract Deutsch

Fachgebiet: Neuroethologie
Name: Lucke, Jan
Thema: „Einfluss der Mitochondrien auf die Duftantwort olfaktorischer sensorischer Neurone von *Drosophila melanogaster*“
Jahr: 2019
Betreuer: Dr. rer. nat. Carola Wicher[1], PD Dr. Dieter Wicher[2]

[1]Ernst-Abbe-Hochschule Jena, Studiengang Optometrie/ Augenoptik/ Vision Science
[2]Max-Planck-Institut für chemische Ökologie Jena, Abteilung Evolutionäre Neuroethologie

Ziel. Das Ziel dieser Masterarbeit bestand in der Untersuchung des mitochondrialen Einflusses auf die Duftantwort olfaktorischer sensorischer Neurone (OSNs) von *Drosophila melanogaster* (DM). Diesbezüglich sollte die Modifizierung von Proteinkomplexen erfolgen, die in den Ca^{2+}-Import (mitochondrialer Ca^{2+}-Uniporter (mCU)) und Ca^{2+}-Export (mitochondriale Permeabilitätstransitionspore (mPTP)) in OSNs eingebunden sind (Zoratti et al., 1995).

Material und Methode. Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um ein prospektives, experimentelles, bivariates, kontrolliertes und offenes Studiendesign. Es erfolgten Antennenpräparationen bei DM, gemäß Mukunda et al. (2014), die den genetisch kodierten Ca^{2+}-Indikator „GCaMP6f“ (Nakai et al., 2001) in Orco-exprimierenden OSNs aufwiesen. Im Anschluss wurden ex-vivo fluoreszenzoptische Messungen mittels *Ca^{2+}-Imaging* durchgeführt. Währenddessen erfolgte, je nach Messreihe, die Applikation diverser Pharmaka nach 100 s und des Agonisten *VUAA1* (100 µM) nach 200 s. Als Kontrollgruppe dienten Antennenpräparationen, die mit *DMSO* (100 µM) und *VUUA1* in Kontakt gebracht wurden.

Ergebnisse. Die Unterschiede, die die Maxima der prozentualen Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) in OSNs zwischen der Kontrollgruppe und der jeweiligen Messreihe für den mCU-Aktivator *Spermin* (10 µM), den mCU-Inhibitor *RU360* (5 µM) sowie den mPTP-Aktivator *Auranofin* (25 µM) zeigen, sind signifikant. Im Fall des mPTP-Inhibitors *ABT-737* (100 nM) ist kein signifikanter Unterschied der max. $\Delta F/F_0$ zur Kontrollgruppe ermittelbar.

Schlussfolgerungen. Hiermit liegen erste Nachweise dafür vor, dass die pharmakologische Modulation des mCU oder der mPTP zu einer veränderten Duftantwort der OSNs von DM führt. Jedoch bedarf es weiterer Tests mit anderen Modulatoren und ggf. größerer Fallzahl.

Schlüsselwörter. *Drosophila*, GCaMP, *Ca^{2+}-Imaging*, olfaktorische sensorische Neurone, mitochondrialer Ca^{2+}-Uniporter, mitochondriale Permeabilitätstransitionspore, *VUAA1, Spermin*, *Auranofin*, *RU360*, *ABT-737*

Abstract English

Specific Field: Neuroethology
Name: Lucke, Jan
Topic: "Effect of mitochondria on the odor response of olfactory sensory neurons of *Drosophila melanogaster*"
Year: 2019
Supervising Tutor: Dr. rer. nat. Carola Wicher[1], PD Dr. Dieter Wicher[2]

[1]Ernst-Abbe-University Jena, Optometry / Ophthalmic Optics / Vision Science
[2]Max Planck Institute for Chemical Ecology Jena, Department of Evolutionary Neuroethology

Purpose. The aim of this master thesis was to investigate the effect of mitochondria on the odor response of olfactory sensory neurons (OSNs) of *Drosophila melanogaster* (DM). In this regard, modification of protein complexes involved in Ca^{2+}-import (mitochondrial Ca^{2+}-uniporter (mCU)) and Ca^{2+}-export (mitochondrial permeability transition pore (mPTP)) should be performed (Zoratti et al., 1995).

Methods. The present study has a prospective, experimental, bivariate, controlled and open study design. Antenna preparations in DM have been used, according to the method of Mukunda et al. (2014), who had the genetically encoded Ca^{2+}-indicator "GCaMP6f" (Nakai et al., 2001) in Orco-expressing OSNs. Subsequently, ex vivo fluorescence-optical measurements were performed by *Ca^{2+}-imaging*. In the meantime started, depending on the measurement series, the application of various pharmaceuticals after 100 s and of the agonist *VUAA1* (100 µM) after 200 s. As a control group antenna preparations were used, which were brought into contact with *DMSO* (100 uM) and *VUUA1*.

Results. There are significant differences between the maxima of the percentage change of fluorescence intensity ($\Delta F/F_0$) in OSNs between the control group and the respective measurement series for the mCU activator *Spermine* (10 µM), the mCU inhibitor *RU360* (5 µM) and the mPTP activator *Auranofin* (25 µM). In the case of the mPTP inhibitor *ABT-737* (100 nM) is no significant difference of the max. $\Delta F/F_0$ to the control group detectable.

Conclusion. These are the first evidences that the pharmacological modulation of the mCU or the mPTP leads to an altered odor response of the OSNs of DM. However, further tests with other modulators and possibly larger numbers of cases are required.

Keywords. *Drosophila*, GCaMP, *Ca^{2+}-imaging*, olfactory sensory neurons, mitochondrial Ca^{2+}-uniporter, mitochondrial permeability transition pore, *VUAA1*, *Spermine*, *Auranofin*, *RU360*, *ABT-737*

Inhaltsverzeichnis

Abstract Deutsch II

Abstract English III

Inhaltsverzeichnis IV

Abkürzungsverzeichnis VI

1 Einleitung 1

2 Zielstellung 3

3 Wissenschaftlicher Hintergrund 4

3.1 Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus 4

3.1.1 Anatomie der äußeren primären olfaktorischen Sinnesorgane der Fruchtfliege 5

3.2 Aufnahme und Weiterleitung einer Geruchsinformation bei Insekten 6

3.3 Olfaktorische Rezeptoren bei Insekten 9

3.3.1 Struktur 9

3.3.2 Funktion 11

3.3.3 Regulation 15

3.4 CaM beeinflusst die Sensitisierung der ORs bei *Drosophila melanogaster* 17

3.4.1 Interaktion von Ca^{2+} und CaM 17

3.4.2 Sensitisierung von ORs 18

3.5 Mitochondrien 22

3.5.1 Am mitochondrialen Ca^{2+}-Transport beteiligte Moleküle 23

3.5.2 Zelluläre Ca^{2+}-Signale und Mitochondrien 25

3.6 Hypothesen 26

4 Material und Methode 27

4.1 Studiendesign 27

4.2 Experimentelle Bedingungen 28

4.3 Mess- und Untersuchungsmethoden 30

4.3.1 Antennenpräparation bei *Drosophila melanogaster* 30

4.3.2 Ca^{2+}-Imaging 34

4.3.3 Verwendete Chemikalien 37

4.4 Durchführung ... 40
4.4.1 Durchführung der Antennenpräparation ... 40
4.4.2 Durchführung Ca^{2+}-Imaging ... 40
4.5 Statistische Methoden ... 44
5 Messdaten und Ergebnisse ... 46
6 Diskussion ... 52
6.1 Hypothese 1. a) „Wenn die Aktivierung des mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporters (mCU) erfolgt, dann ist nicht mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen.“ ... 54
6.2 Hypothese 1. b) „Wenn die Hemmung des mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporters (mCU) erfolgt, dann ist mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen.“ ... 55
6.3 Hypothese 1. c) „Wenn die Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) erfolgt, dann ist mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen." ... 57
6.4 Hypothese 1. d) „Wenn die Hemmung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) erfolgt, dann ist nicht mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen.“ ... 58
7 Zusammenfassung ... 60
8 Schlussfolgerung und Ausblick ... 61
Literaturverzeichnis ... 63
Abbildungsverzeichnis ... 74
Tabellenverzeichnis ... 76
Anlagen
Ehrenwörtliche Erklärung und Einverständniserklärung
Danksagung
Thesen

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
c	Stoffmengenkonzentration
Ca_c	freie [Ca^{2+}] im Zytoplasma
CALX	Na^+/Ca^{2+}-Austauscher bei *Drosophila melanogaster*
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cat	Kationenkanäle
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGP-37157	7-Chloro-3,5-Dihydro-5-Phenyl-1-H-4,1 -Benzothiazepin-2-on
CICR	Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung (engl. calcium-induced calcium release)
CNG	zyklisch Nukleotid-gesteuert
cpGFP	zirkulär versetztes grün-fluoreszierendes Protein
CPZ	Chlorpromazin
cVA	Cisvaccenylacetat
DAG	Diacylglycerol
DM	Drosophila melanogaster
DMSO	Dimethylsulfoxid
e.t.c	Elektronentransportkette
ER	endoplasmatisches Retikulum
F	Basislinienfluoreszenz in Kapitel 4.3.2
F	gemessene Fluoreszenzintensität in Experimenten
F_0	Fluoreszenzintensität der Basislinie, als arithmetischer Mittelwert von $F_{korr.}$ der Messzyklen 30 – 39
$F_{0_{ROI_n}}$	F_0 einer n-ten ROI
F_B	gemessene Fluoreszenzintensität des Hintergrundes (engl. background) ≙ F_{ROI_0}
FCCP	Carbonylcyanin-p-Trifluormethoxyphenylhydrazon
$F_{korr.}$	Fluoreszenzintensität einer ROI, die um die F_B korrigiert wurde
F_{ROI_n}	gemessene Fluoreszenzintensität einer n-ten ROI
GCaMP	ein spezieller genetisch kodierter Kalziumindikator
GECI	genetisch kodierte Ca^{2+}-Indikatoren

GFP	Green-Fluorescent-Protein
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
Gr	gustatorische Rezeptoren zur Kohlenstoffdioxidwahrnehmung
GRs	gustatorische Rezeptoren
I	ionotroper Strom
IDS	inneres dendritisches Segment
iGluRs	ionotrope Glutamatrezeptoren
IP_3	Inositoltrisphosphat
IP_3R	IP_3-Rezeptoren
IRcoY	Korezeptorprotein coY
IRs	ionotrope Rezeptoren
IRX	geruchsspezifisches IRX-Protein
LBD	ligandenbindende Domäne
mCU	mitochondrialer Ca^{2+}-Uniporter
MMP	mitochondriale Membranpermeabilisierung
mNCE	mitochondrialer Na^+/Ca^{2+}-Austauscher
MPI	Max-Planck-Institut
mPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitionspore
MZ	Messzyklus
n	Anzahl
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)hydrid
NCX	Na^+/Ca^{2+}-Austauscher bei Säugetieren
ns	nicht signifikant
OBP	Odorant-Bindungsprotein (engl. odorant binding protein)
ODS	äußeres dendritisches Segment
Orco	Korezeptorprotein Orco
ORs	Geruchsrezeptoren (engl. odorant receptors)
OrX-Protein	Odorant-spezifisches Protein
OrY-Protein	Pheromon-spezifisches Protein
OSN(s)	Olfaktorische(s) sensorische(s) Neuron(en) (engl. olfactory sensory neuron(s))
PBPs	Pheromon-Bindungsproteine
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PolyP	Anorganisches Polyphosphat
PPT	4,4′,4″-(4-Propyl-[1H]-Pyrazole-1,3,5-Triyl)-Trisphenol

R	Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert nach Applikation der zweiten Substanz
ROI(s)	Region(en) des Interesses (engl. region(s) of interest)
$ROI_{_n}$	ROI für das n-te markierte OSN (Bsp. n = 1 ≙ erstem markierten Zellkörper v. OSN ≙ $ROI_{_1,}$!)
SNMP	sensorisches Neuronenmembranprotein
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
t	Zeit
TM	Transmembran
TRP	Rezeptorpotentiale
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
UAS	Stromaufwärts-Aktivierungs-Sequenz (engl. upstream-activation sequence)
VUAA1	2-(4-Ethyl-5-(Pyridin-3-yl)-4H-1,2,4-Ttriazol-3-Yylthio)-N-(4-Ethylphenyl)-Acetamid
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
$[Ca^{2+}]_m$	freie Kalziumkonzentration in den Mitochondrien
ΔF	Differenz zwischen F_0 und $F_{korr.}$
$\Delta F/F_0$	prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensität im Experiment
ΔF	erhöhte Fluoreszenz in Kapitel 4.3.2
$\Delta F/F$	Fluoreszenzänderung (in %) in Kapitel 4.3.2
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
τ	Tau
$\overline{x}$	arithmetischer Mittelwert von $\Delta F/F_0$ der $ROI_{_1}$ bis $ROI_{_n}$

1 Einleitung

Die meisten Organismen weisen die Fähigkeit auf, chemische Substanzen in ihrer Umwelt zu erkennen. Der Überbegriff für diese Fähigkeit lautet **Chemorezeption** (Menco et al., 2004). Hierbei steht die einfachste Form Einzellern sowie niederen Organismen zum Auffinden von Nahrungsquellen und der Meidung schädlicher Umweltbedingungen zur Verfügung (Menco et al., 2004). Laut Farbman (1992) findet in Bezug auf ihre funktionalen Unterschiede eine Unterteilung in Gustation und Olfaktion statt. Hiermit ist die Wahrnehmung von Geschmack und Geruch gemeint (Menco et al., 2004).

Für die Aufnahme eines Geschmacks- oder Duftreizes bedarf es Rezeptoren, die von Neuronen exprimiert und in die Dendritenmembran eingebaut sind (Azevedo et al., 2009). Der Aufgabe und Funktion von Nervenzellen liegen prinzipiellen Mechanismen und Bausteine zugrunde (Schmidt et al., 2000). Dabei ist es irrelevant, ob diese aus dem Gehirn des *Homo sapiens* oder aus dem Ganglienbündel eines „primitiven“ Tieres stammen (Schmidt et al., 2000). Denn auf Ebene der Proteine, die für den ordnungsgemäßen Ablauf der Erregungsweiterleitung verantwortlich sind, ist ein hohes Maß an Konservierung und Homologie vorhanden (Schmidt et al., 2000). Die Regulierung der neuronalen Reaktion, gemäß dem Fluss der sensorischen Eingabe, bildet die Grundlage für Lernen und Gedächtnis (Schmidt et al., 2000). Ein Neuron erzeugt als Antwort auf einen Stimulus elektrische Signale, die auf das Axon weitergeleitet und abschließend auf ein weiteres Neuron oder auf ein Erfolgsorgan übertragen werden (Azevedo et al., 2009). Diese Art der Reizweiterleitung ist notwendig, um eine angemessene Verhaltensreaktion eines Organismus zu organisieren (Schmidt et al., 2000). Die Erforschung und Entschlüsselung der einzelnen Abläufe und Mechanismen ist eine Aufgabe der Neurobiologie (Triebel, 2018).

Als Modellorganismen kommen hierbei verschiedenste **Insekten** zum Einsatz. Neben der Neurobiologie stehen sie auch in zahlreichen anderen Forschungsgebieten im Mittelpunkt. Unter anderem wird bei ihnen die Wahrnehmung der Helligkeitsverteilung (Schlieper, 1928) oder auch die akustische Kommunikation (Szabo und Huber, 1970) erforscht. Des Weiteren stehen ihre Ernährung (Zoebelein, 1956) und die damit verbundenen Überlebensstrategien (Shukla et al., 2018) als Grundlage für biologische Verhaltensweisen zur Verfügung. Ebenso weckten unkonventionelle Experimente, wie Kopftransplantationen (Finkler, 1923), bereits den Forschergeist. Insekten dienen aber auch als Vorbild für technische Lösungsansätze, wobei beispielsweise deren Flugverhalten (Remund et al., 1975) untersucht wurde. Des Weiteren können sie in Form tierischer Eiweißlieferanten als eine kostengünstige alternative Nahrungsquelle dienen (Dettner und Peters, 2010). Diese Überlegung ist besonders wichtig, da gewöhnliche Nutztiere eine weitaus schlechtere CO_2-Umwelt-Bilanz liefern (Piater, 2012).

Nicht zu unterschätzen sind die positiven als auch negativen Aspekte, die Insekten in ökonomischer und ökologischer Hinsicht zuzuschreiben sind. Ohne die Bestäubung von Kulturpflanzen (Kugler, 1972) könnten Hungersnöte auftreten, der Artenreichtum an Flora und Fauna abnehmen und hohe Personalkosten für die manuelle Bestäubung von z.B. Obstbäumen entstünden (Weber, 2018). Somit ist die Erforschung des Insektensterbens (Wägele, 2018) von immenser Notwendigkeit. Des Weiteren verursachen Schadinsekten höhe volkswirtschaftliche Kosten, weshalb Insekten als Schädlinge (Wohlgemuth, 1989) und deren Resistenzen gegenüber Insektiziden (Langenbuch, 1954) und deren Geruchsverhalten (Wicher, 2015) genauer untersucht werden.

Das wohl bekannteste Insekt, dass seinen Siegeszug als wissenschaftliches Untersuchungstier Anfang des 20. Jahrhunderts antrat, ist die Fruchtfliege ***Drosophila melanogaster*** und deren verschiedene Arten (Castle et al., 1906). Die Vorteile der Fruchtfliege, gegenüber anderen Versuchstieren, liegen in ihrer kurzen Generationsdauer. Hinzu kommen die leichten und kostengünstigen Aufzuchts- und Lebensbedingungen, sowie eine großen Nachkommenschaft (Janning und Knust, 2004). Neurobiologisch betrachtet, besteht außerdem ein Vorteil darin, dass sie trotz der Komplexität des Nervensystems eine überschaubare Anzahl von Nervenzellen aufweist (Janning und Knust, 2004). Durch moderne molekulargenetische Methoden ist es mittlerweile gelungen, gezielte Mutagenese (Ballinger und Benzer, 1989; Kaiser und Goodwin, 1990), Keimbahntransformationen (Spradling und Rubin, 1982) oder die gezielte Expression von Transgenen (O'Kane und Gehring, 1987) zu erwirken. Dadurch war die Erforschung von Gehirnprozessen (Quinn et al., 1974; Schwaerzel et al, 2002) möglich und wertvolle Beitrage bei der Grundlagenforschung im Bereich menschlicher Krankheiten (Auluck et al., 2002; Marsh und Thompson, 2004) erfolgten.

Bezüglich des Duftverhaltens konnte bei *Drosophila* nachgewiesen werden, dass auch noch geringste Mengen relevanter Duftstoffe (Mukunda et al., 2016) ausreichen, um z.B. Nahrung, Artgenossen oder Feinde wahrzunehmen und eine Duftorientierung (Steiner, 1953) zu gewährleisten. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass die Erkennung von Duftstoffen durch „Riechhaare“ auf den Antennen von *Drosophila* chemosensorische Funktionseinheiten mit einer speziellen molekularen Ausstattung sind (Sachse und Krieger, 2011). Sie enthalten verschiedene Bindungsproteine, die Duftstoffe zu spezifischen Rezeptoren in der dendritischen Membran der Riechsinneszellen transferieren (Sachse und Krieger, 2011). Die Bindung eines Duftstoffs an das Rezeptorprotein initiiert ionotrope und / oder metabotrope Mechanismen (Sachse und Krieger, 2011). Derartige ionotrope Geruchsrezeptoren (ORs) lassen unteranderem Ca^{2+} passieren (Wicher, 2015).

Mithilfe genetisch veränderter Fliegen (Shigekazu et al., 2011) und des ***Ca^{2+}-Imaging*s** ist eine direkte Messung derartiger dynamischer Kalziumflüsse in lebenden Neuronen und neuronalem Gewebe möglich (Stosiek et al., 2003). Während der Aktivierung von ORs kommt es zu einem intrazellulärem Ca^{2+}-Anstieg in olfaktorisch sensorischen Neuronen (Wicher, 2015). In diese Homöostase-Regulierung sind auch Mitochondrien eingebunden (Xie et al., 2017). Sie dienen, wie das endoplasmatische Retikulum, als Ca^{2+}-Speicher und stehen in gegenseitigen Wechselwirkungen zueinander (Hoppe, 2010). Bei Insekten kann eine kurze Exposition gegenüber Sexualpheromonen zu einer kurzzeitigen, als auch langfristigen Steigerung der Empfindlichkeit von ORs in Bezug auf derartige Pheromone führen (Anderson et al., 2007). Für Säugetieren wurde berichtet, dass die durch **Mitochondrien** gesteuerte Ca^{2+}-Mobilisierung eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung des breiten dynamischen Antwortbereichs und der Empfindlichkeit von OSNs spielt (Fluegge et al., 2012). Hinsichtlich der Sensitisierung von ORs bei Insekten ist die Beteiligung der Mitochondrien bisher ungeklärt (Mukunda et al., 2016) und wirft offene Fragen auf.

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Masterarbeit bestand darin, den Einfluss der Mitochondrien auf die Duftantwort olfaktorischer sensorischer Neurone (OSNs) von *Drosophila melanogaste*r zu untersuchen.

Hierfür bestand eine erste Notwendigkeit darin, Stoffgemische fachgerecht herzustellen und anwenden zu können.

Des Weiteren sollte das Erlernen der Antennenpräparationen bei *Drosophila melanogaste*r (s. Kapitel 4.3.1) einen Großteil der Tätigkeiten einnehmen.

Anschließend daran, mussten *Ca^{2+}-Imaging*-Experimente (s. Kapitel 4.3.2) unter der Verwendung eines hochauflösenden Mikroskops und einer Videoeinheit durchgeführt werden. Hierbei sollte die pharmakologische Modifizierung von Proteinkomplexen erfolgen, die in den Ca^{2+}-Import und den Ca^{2+}-Export in OSNs eingebunden sind. Mit Modifizierung ist die Hemmung bzw. Aktivierung des mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporters (mCU), zuständig für Ca^{2+}-Import (Kapitel 3.5), oder der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP), zuständig für Ca^{2+}-Export (s. Kapitel 3.5), in OSNs von *Drosophila melanogaste*r gemeint.

Die ggf. hierbei auftauchenden Änderungen der Reaktionen; die im Vergleich zu einer Kontrollgruppe auftraten; sollten beobachtet, dokumentiert und statistisch ausgewertet werden.

3 Wissenschaftlicher Hintergrund

3.1 Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Der Siegeszug der Fruchtfliege als wissenschaftliches Untersuchungstier geschah nach ersten Publikationen von Castle et al. (1906), der verschiedene *Drosophila*-Arten als Versuchstiere in diversen Forschungsvorhaben nutzte. Ein endgültigen Durchbruch als genetischer Modellorganismus stellte sich mit Hilfe von Untersuchungen zur Chromosomenvererbung durch Morgan (1910) an der Columbia University ein.

Andere Bezeichnungen für die *Drosophila melanogaster* sind „Kleine Taufliege“, „Kleine Obstfliege“ (oft auch „Kleine Fruchtfliege“) oder „Kleine Essigfliege“. Sie ist ca. 2 – 3 mm groß und weißt eine braune bis gelbliche Färbung auf. Ihre Eier legt sie an gärendem Obst ab. Den Namen „Taufliege“ verdankt sie dem Umstand, dass die Larven mit Vorliebe in den frühen Morgenstunden schlüpfen. Dieses Verhalten wirkt sich arterhaltend aus, da die noch nicht gehärtete Cuticula in den heißen Mittagsstunden zum Tod durch Austrocknen führen könnte. Werden *Drosophila*-Populationen unter konstanten äußeren Bedingungen (25 °C Umgebungstemperatur) gehalten, dann schlüpfen die Individuen aus ihren Puppenhüllen in synchronen Schüben etwa alle 24 Stunden (s. Abb. 1), (Janning und Knust, 2004).

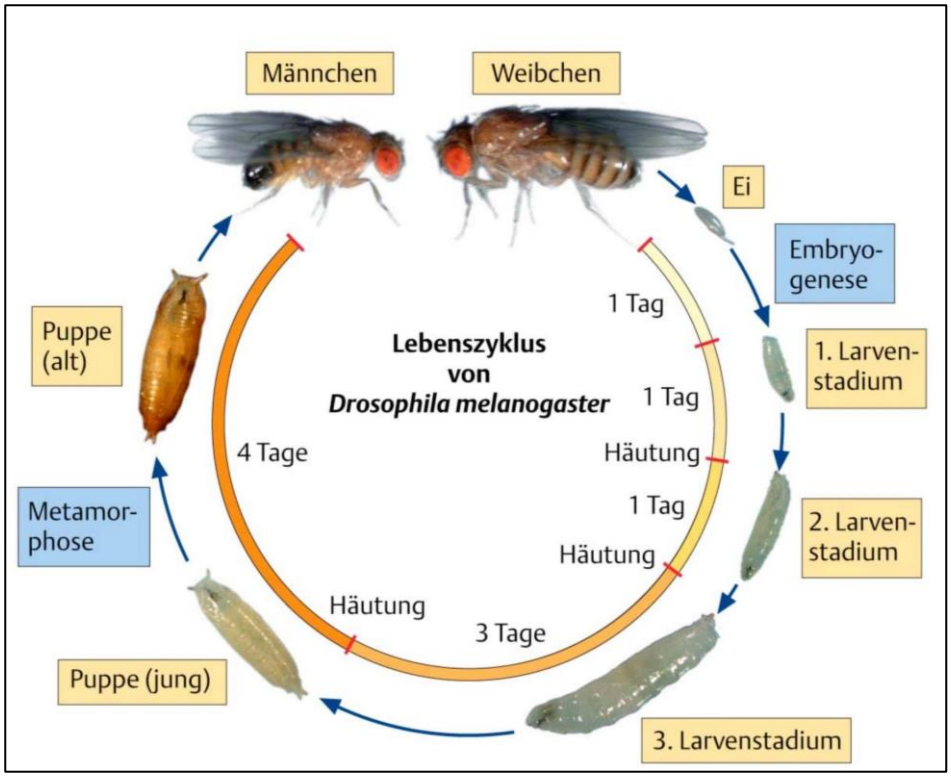

Abb. 1: Lebenszyklus von *Drosophila* (Janning und Knust, 2004)

In Abb. 1 ist der Lebenszyklus einer Taufliege, sowie die Unterscheidung zwischen einem männlichen und weiblichen Tier dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Dauer von der Eiablage bis zum Schlupf aus der Puppe ca. zehn Tage beträgt. Eine Fortpflanzungsfähigkeit besteht bereits 24 Stunden nach dem Schlupf. Insgesamt kann ein Alter von zwei bis acht Wochen, je nach Umgebungsvoraussetzungen, erreicht werden (Janning und Knust, 2004). Neben diesem Vorteil der kurzen Generationsdauer (s. Abb. 1), kommen die leichten und kostengünstigen Aufzuchts- und Lebensbedingungen, sowie eine große Nachkommenschaft (ca. 400 Nachkommen pro Paar und Eiablage) hinzu.

3.1.1 Anatomie der äußeren primären olfaktorischen Sinnesorgane der Fruchtfliege

Wie in A gezeigt, verfügt die Taufliege über zwei paarweise angeordnete Geruchsorgane, die sich in Antennen und Maxillarpalpen unterscheiden lassen. Die Antennen bestehen aus drei Teilabschnitten (s. B). Hierbei dient das 2. Segment als Halterung der Antenne am Fliegenkopf. Die Arista weist akustische und mechanosensorische Funktionen auf (Kettler, 2003). Ebenso, wie die Maxillarpalpen (s. B), dient das dritte Segment der Antennen der Mechanosensorik und Olfaktorik (Kettler, 2003). Das heißt, dass in diesem Bereich die eigentliche Geruchsverarbeitung beginnt.

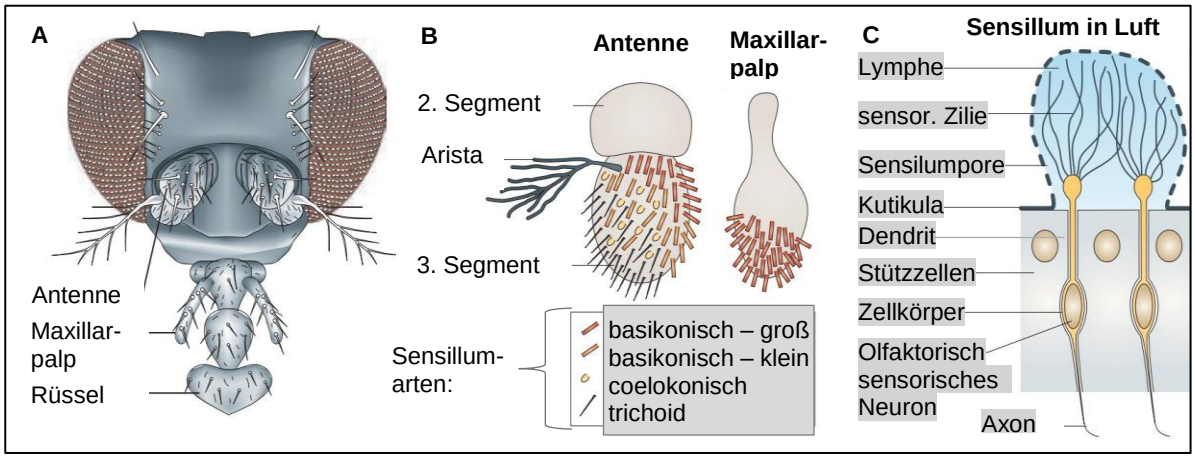

Abb. 2: Anatomie der äußeren primären olfaktorischen Sinnesorgane der Fruchtfliege
A) Geruchsorgane sind die Antennen und die Maxillarpalpen.
B) Die Olfaktorik geschieht über das 3. Segment der Antennen und Maxillarpalpen. Diese Organe sind mit Sinneshaaren (Sensillen) ausgestattet.
C) Jedes Sensillum enthält bis zu vier olfaktorische sensorische Neuronen (OSNs). Die Reizweiterleitung erfolgt von der sensorischen Zilie über den Dendrit und das Soma der OSN, weiter über das Axon, das zu einem olfaktorischen Glomerulus im Antennenlappen projiziert.
Es gibt drei Arten von Sensillen, wobei auf den Maxillarpalpen nur basikonische Sensillen vorkommen.

(Anlehnung an Kaupp, 2010)

Beide Organe sind mit Sinneshaaren bedeckt, die Sensillen (s. B) genannt werden. In jedem Sensillum (s. C) befinden sich bis zu vier olfaktorische sensorische Neuronen (OSNs), (Kaupp, 2010). Insekten-OSNs sind den Wirbeltier-OSNs morphologisch ähnlich. Aus solch einem bipolaren Neuron entspringt ein einzelnes Basalaxon, das anschließend zu einem olfaktorischen Glomerulus im Antennenlappen projiziert (Kaupp, 2010). An seiner apikalen Seite führt das OSN zu einem einzigen dendritischen Prozess, von dem sich sensorische Zilien in den Schaft des Sensillums erstrecken (Kaupp, 2010).

Bezüglich ihrer Morphologie und chemischer Zusammensetzung, können die auf der Antenne vorkommenden Sensillen in große und kleine basikonische Sensillen, in coelokonische und trichoide Sensillen (s. B, unten) eingeteilt werden. Des Weiteren sind nach Ausführungen von Itoh et al. (1991) auch basikonisch-artige Sensillen, gefurchte Sensillen und Sensillen mit stumpfen Spitzen bekannt (Kettler, 2003).

Insgesamt gibt es ungefähr 1.200 OSNs pro Antenne. Die Maxillarpalpen zeichnen sich, im Vergleich zu den Antennen, durch einen einfacheren Aufbau aus. Deren Oberfläche wird nur von basikonischen Sensillen abgedeckt, die jeweils zwei OSNs beherbergen (Kaupp, 2010).

3.2 Aufnahme und Weiterleitung einer Geruchsinformation bei Insekten

Im Allgemeinen erzeugt die Chemorezeption eine innere Repräsentation der Außenwelt, in der eine nahezu unendliche Vielfalt verschiedener Moleküle vorkommen. Flüchtige Moleküle werden durch olfaktorische Rezeptoren detektiert, während in Lösung befindliche Moleküle durch gustatorische Rezeptoren (GRs) wahrgenommen werden (Wicher, 2015).

Olfaktorische Rezeptoren werden durch olfaktorische sensorische Neuronen (OSNs) exprimiert (s. C). Wie schon aus ersichtlich wurde, befinden sich diese Sinneszellen in den Antennen (s. auch Abb. 3A) und den Maxillarpalpen (Wicher, 2015). Ausgehend von den mit Sensillen besetzen Antennen (s. und Abb. 3A/B) zeigt die folgende Abb. 3 den Weg und die Verarbeitung eines einzelnen Geruchsmoleküls Schritt für Schritt auf (Wicher, 2015). Hat ein Geruchsmolekül ein Sensillum erreicht, muss es durch dessen mit Poren (s. C und Abb. 3D) versehene Oberfläche hindurch wandern (Wicher, 2015). Im Inneren eines Sensillums angekommen, gelangt das Geruchsmolekül an die Dendriten der OSNs (s. Abb. 3E). Diese Dendriten weisen heterodimere Geruchsrezeptoren (ORs) in deren dendritischen Membran (s. Abb. 3F) auf, an die das Geruchsmolekül gebunden werden kann (Wicher, 2015).

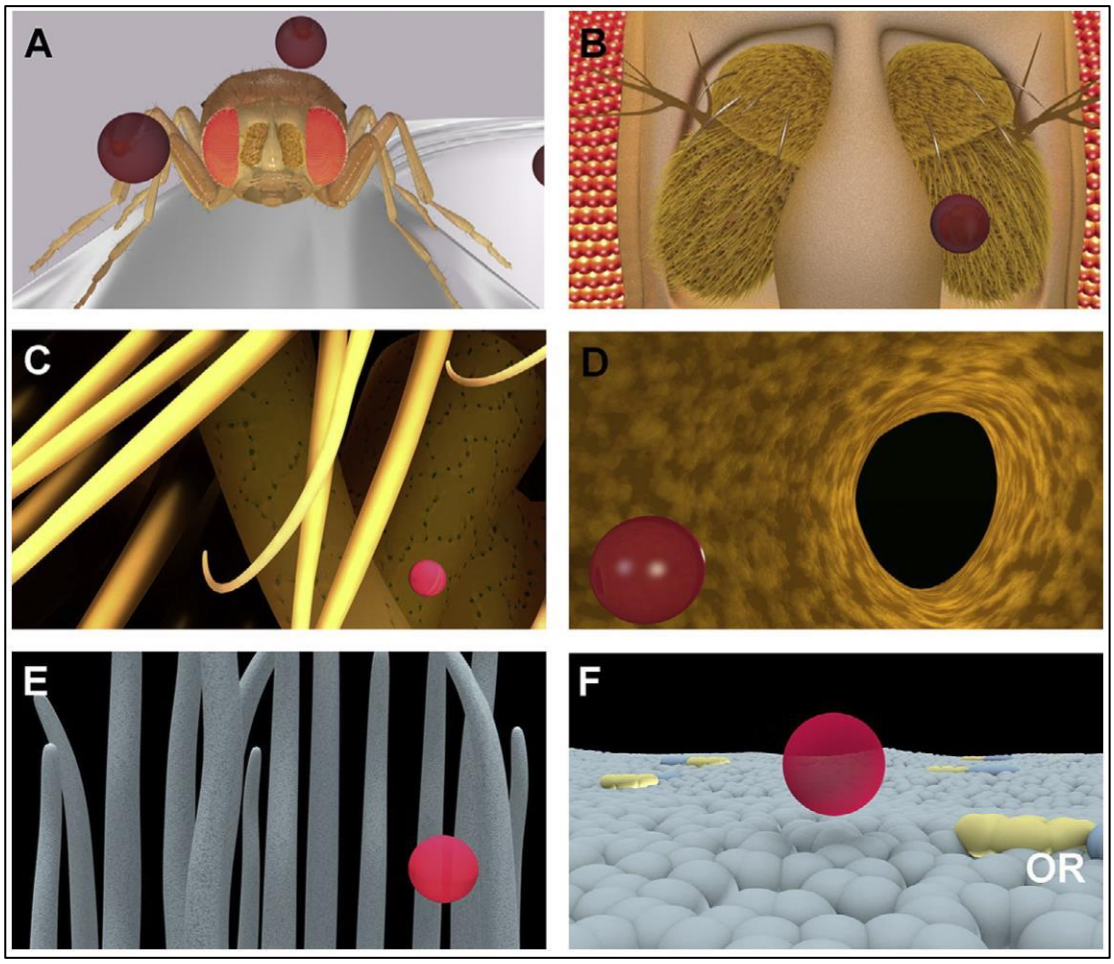

Abb. 3: Weg eines Geruchsmoleküls aus der äußeren Umgebung zum Riechrezeptor
1. Geruchsmoleküle (symbolisiert durch rote Kugeln) nähern sich dem Insekt (A).
2. Geruchsmolekül erreicht Antenne (B) und setzt sich 3. auf Sensillum (C) nieder.
4. Geruchsmolekül gelangt durch Pore (D) in Sensillum.
5. Geruchsmolekül kommt im Inneren des Sensillums an, wo die Dendriten (E) von olfaktorischen sensorischen Neuronen (OSN) lokalisiert sind.
6. Bindung des Geruchsmoleküls an heterodimere Geruchsrezeptoren (ORs), die in der dendritischen Membran (F) enthalten sind.

(Wicher, 2015)

Der Duftmolekültransfer, insbesondere für hydrophobe Verbindungen, wird durch geruchsspezifische Bindungsproteine (engl. odorant-binding proteins (OBPs), s. Abb. 7) oder Pheromon-Bindungsproteine (engl. pheromone-binding proteins (PBPs), s. Abb. 8) erleichtert (Wicher, 2015). Die Axone der OSNs ziehen zum Antennenlappen, der die erste zentrale Nervenverarbeitungseinheit für Geruchsinformationen darstellt. Bei Säugetieren geschieht die Geruchsreizweiterleitung über den Riechkolben bis hin zum primären olfaktorischen Cortex. Eine ähnliche glomeruläre Unterstruktur weist auch der Antennallobus auf (Wicher, 2015).

Die Axone aller OSNs, die einen spezifischen Rezeptor exprimieren, konvergieren in einem Glomerulus. Dort werden Synapsen mit Projektionsneuronen gebildet, die die Informationen anschließend in höhere Gehirnzentren übertragen (Wicher, 2015). Hierzu zählen die Pilzkörper und das laterale Horn. Innerhalb des Antennenlappens sind lokale Interneurone an der

Verarbeitung von Geruchsinformationen beteiligt, die beispielsweise durch Verknüpfung verschiedener Glomeruli für die kombinatorische Geruchscodierung verantwortlich sind (Wicher, 2015). Laut Studien (z.B. Hallem et al., 2006) existiert für *Drosophila* ein umfassendes Wissen über die Geruchsspezifität von Rezeptoren (Wicher, 2015). In besonderen Fällen initiiert die Rezeptorstimulation angeborene Verhaltensreaktionen, wie Anziehung und Abneigung. So löst beispielsweise das von bestimmten toxinproduzierenden Bakterien und Pilzen gebildete Geosmin bei Fliegen eine Vermeidungsreaktion aus, da es als ein Gefahrensignal erkannt wird (Wicher, 2015). Des Weiteren reichen Insekten, wie z.B. Motten, nur ein paar wenige Pheromonmoleküle in deren Umgebung aus, um sie dennoch zu detektieren (Wicher, 2015). Diese Sensibilität der Geruchwahrnehmung im Reich der Insekten wirft die Frage auf, wie diese sensorischen Mechanismen organisiert sind (Wicher, 2015). Ein naheliegender Weg, die olfaktorische Auflösung zu verbessern, besteht darin die Oberfläche des aufnahmefähigen Bereichs zu vergrößern (Wicher, 2015). Dies ist unteranderem an der Vielzahl von Formen und Größen von Insektenantennen zu erkennen (Hansson et al., 2011). Die physikalische Grenze der Genauigkeit bei der Bestimmung der Konzentration von Geruchsmolekülen, auch als Berg-Purcell-Grenze bezeichnet, wird durch das Rauschen aufgrund zufälliger Diffusion bestimmt. Sie ist umgekehrt proportional zur Rezeptorgröße und der Abtastzeit (Wicher, 2015). Ein weiterer Weg, um die Geruchsempfindlichkeit zu verbessern, ist die Verstärkung des primären Geruchssignals. Während der Evolution konnten verschiedene Änderungen in der Wahl des Rezeptortyps (ionotrop oder metabotrop) und im nachgeschalteten Amplifikationsmechanismus beobachtet werden (Wicher, 2015). Viele Sensorsysteme verwenden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die verschiedene Niveaus der Reizverstärkung liefern (Wicher, 2015).

Die Signalmoleküle der ersten Ebene, heterotrimere G-Proteine, können bei Aktivierung Enzymmoleküle aktivieren. Diese Enzyme können auf der zweiten Ebene Botenmoleküle bilden, die weitere nachgelagerte Signalverstärkungen induzieren können (Wicher, 2015). ORs bei Säugetieren und der Nematode *Caenorhabditis elegans* fungieren als GPCRs (Bargmann, 2006). Aktivierte Säugetier-ORs aktivieren gebundene stimulatorische G-Proteine ($G\alpha_s$), die die Funktion der Adenylylcyclase (AC) verstärken und dadurch den zellulären Spiegel an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöhen (Kaupp, 2010). Diese Second-Messenger-Moleküle aktivieren zyklische Nukleotid-gesteuerte (CNG) Kanäle. CNG-Kanäle sind nicht selektive Kationenkanäle, die Na^+, K^+ und Ca^{2+} leiten (Wicher, 2015). Der Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} stimuliert Ca^{2+}-aktivierte Cl^--Kanäle, was zu einer starken Depolarisation führt (Wicher, 2015). Eine derartig hohe Verstärkung des Geruchssignals in der gesamten Signaltransduktionskaskade wird durch diese Cl^--Kanäle bereitgestellt (Reisert et al., 2003; Wicher, 2015).

3.3 Olfaktorische Rezeptoren bei Insekten

3.3.1 Struktur

Bei Insekten werden flüchtige Chemosignale von drei Arten olfaktorischer Rezeptoren (s. Abb. 4) erfasst. Diese unterscheiden sich in Geruchsrezeptoren (ORs), spezifische gustatorische Rezeptoren (GRs) zur Detektion von Kohlendioxid und so genannte ionotrope Rezeptoren (IRs), die mit ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs) verwandt sind (Wicher, 2015).

ORs sind Heteromere, die aus einem variablen, geruchsspezifischen OrX-Protein oder Pheromon-spezifischem OrY-Protein und einem konstanten Korezeptorprotein Orco bestehen (s. Abb. 4A), (Wicher, 2015).

Es gibt drei **GR**-Gene für die Kohlendioxidwahrnehmung, die bei basalen Insekten fehlen (Wicher, 2015). Dies trifft auch auf die europäische Honigbiene *Apis mellifera* zu (Robertson et al., 2009). Diese Rezeptoren sind auch Heteromere von Gr1 / 2 und Gr3 (s. Abb. 4B), die in *Drosophila* als Gr21a und Gr63a bezeichnet werden (Jones et al., 2007; Wicher, 2015).

Alle OR- und GR-Proteine gehören zur Familie derjenigen Proteine, die sich durch 7-Transmembran-Domänen (7-TM) auszeichnen. Im Gegensatz zu GPCR-Proteinen zeigen sie eine entgegengesetzte Membraninsertion, d.h. der N-Terminus ist zytoplasmatisch und der C-Terminus extrazellulär (Robertson et al., 2009).

IRs bestehen aus einem variablen, geruchsspezifischen IRX-Protein und einem Korezeptor-protein IRcoY (s. Abb. 4C). Die Korezeptorproteine in *Drosophila* sind IR8a und IR25a (Wicher, 2015). Sie zeigen sowohl eine erweiterte aminoterminale Domäne, als auch eine liganden-bindende Domäne (LBD) auf und haben somit eine starke Ähnlichkeit zu iGluRs. Wie bei iGluRs bilden IRs heterotetramere Komplexe aus und können bis zu drei verschiedene Unter-einheiten enthalten (Wicher, 2015). Das erste IR-Tetramer, das durch Dimerisierung von IR-Dimeren gebildet wurde, konnte für *Drosophila* bei IR84a und IR8a.2 gezeigt werden (Abuin et al., 2011).

Während IRs und GRs früh in der Evolution bei einer Vielfalt von Organismen (Croset et al., 2010) auftraten, ist das Vorkommen von ORs nur auf Insekten (Missbach et al., 2014) beschränkt. Eine Ausnahme bilden Insekten, die keine Flügel besitzen (Wicher, 2015). Dies lässt darauf schließen, dass sich die heteromeren ORs parallel zum Beginn des Insektenfluges entwickelten (Missbach et al., 2014). Es sei als eine evolutionäre Anpassungsreaktion zu

verstehen, die die Herausforderung der Detektion olfaktorischer Informationen während des Fluges zur Aufgabe hatte (Wicher, 2015). Neben der Wahrnehmung der Gerüche während der Bewegung, gibt es noch ein weiteres Problem. Durch die Luftbewegung findet eine Verteilung und Verdünnung der Gerüche statt, wodurch sich eine bewegende und filamentöse Wolke bildet (Wicher, 2015). Um solche Informationen in Bewegung wahrzunehmen, sind schnelle und empfindliche Rezeptionselemente erforderlich (Wicher, 2015).

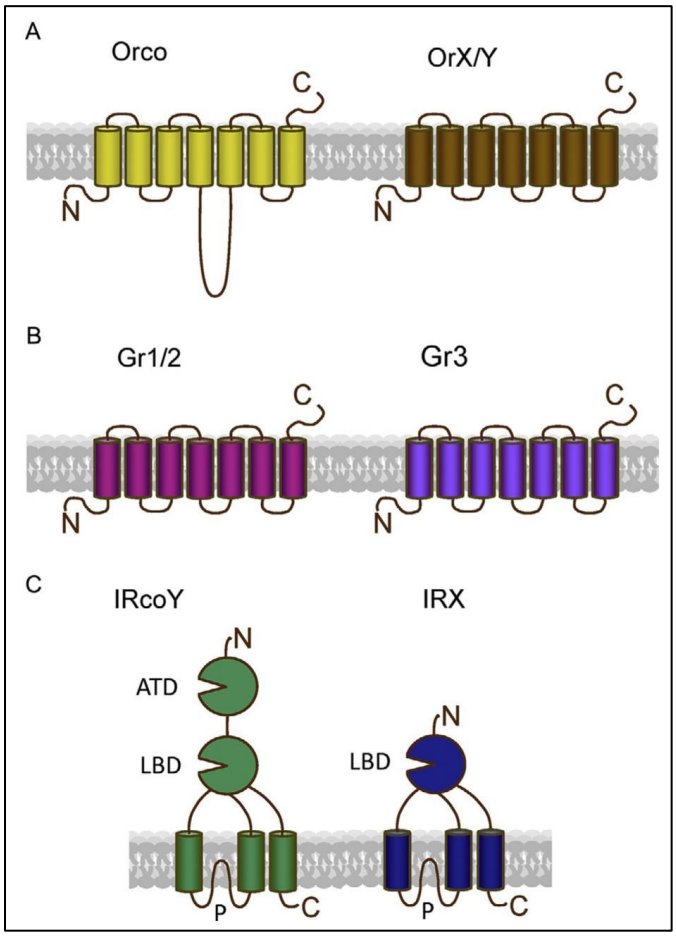

Abb. 4: Struktur der olfaktorischen Rezeptorproteine von Insekten

A) Geruchsrezeptoren **(ORs)** sind Heteromere, die aus einem allgegenwärtigen Korezeptor Orco und einem geruchsspezifischen Or-Protein OrX und OrY für Pheromone bestehen. Diese Proteine weisen eine 7-Transmembrantopologie mit intrazellulärem N-Terminus und extrazellulärem C-Terminus auf.
B) Geschmacksrezeptoren **(GRs)** für die Kohlendioxidwahrnehmung formen Heterodimere von Gr1/Gr2 und Gr3. Die Gr-Protein haben eine ähnliche Struktur und Orientierung wie Or-Proteine.
C) Ionotrope Rezeptoren **(IRs)** sind Heterotetramere, die ein Korezeptorprotein IRcoY und ein Rezeptorprotein IRX beinhalten. IRs können Tetramere bilden, die aus zwei IRcoY: IRX-Dimeren bestehen, aber können auch drei differente IRX-Proteine enthalten. Beide Proteine besitzen drei membranüberspannende Helizes, die durch eine extrazelluläre Region getrennt sind, die zur Liganden-bindenden Domäne (LBD) beiträgt. P gibt die Porenregion an. Die Korezeptorproteine haben eine erweiterte Amino-terminale Domäne (ATD).

(Wicher, 2015)

3.3.2 Funktion

Wie die verwandten iGluRs sind IRs ligandengesteuerte Ionenkanäle. Diese nichtselektiven Kationenkanäle leiten Na^+ und K^+ und einige auch Ca^{2+}. Um eine Geruchsantwort auszulösen, sind Konstrukte aus IRX und IRcoY erforderlich (Wicher, 2015). Wie bei ORs wird die Geruchsspezifität vom IRX-Partner bestimmt. Dies kann überraschen, da IRcoY-Proteine auch eine LBD besitzen (s. Abb. 4). Da jedoch eine Punktmutation in der LBD von IR8a die dendritische Lokalisierung aufhebt, könnte die LBD von Korezeptoren eine andere Funktion als das Binden von Geruchs-Liganden haben (Abuin et al., 2011; Wicher, 2015).

Gerüche können die OSN-Aktivität verstärken, oder auch reduzieren. IRs und ORs detektieren Gerüche mit komplementärer Spezifität (Wicher, 2015). Das heißt, dass es zwischen den jeweiligen Rezeptortypen wenige Überlappungen gibt. IRs-exprimierende OSNs sind weniger empfindlich und adaptieren langsamer als ORs-exprimierende Neuronen (Abb. 5), (Getahun et al., 2016). In *Drosophila* koppeln die kohlendioxidempfindlichen Gr21a und Gr63a an $G\alpha_q$-Proteine, die die Phospholipase C (PLC) und wiederum Ionenkanäle aktivieren (Wicher, 2015). Diese gehören zur TRP-Familie (“transientes Rezeptorpotential“) (s. Abb. 6) und werden über einen bislang unbekannten Mechanismus aktiviert (Badsha et al., 2012). Saure Duftstoffe und hohe Konzentrationen an Kohlendioxid (> 5%) werden laut Ai et al. (2010) von IR64a, einem Mitglied der IR-Familie, nachgewiesen. Die Kohlendioxiderkennung ist somit ein Beispiel für einen konzentrationsabhängigen Wechsel des primären Nachweismechanismus. Niedrige Konzentrationen werden über einen metabotropen Prozess detektiert, der eine Signalverstärkung bewirkt, während hohe Konzentrationen den ionotropen Prozess direkt aktivieren (Wicher, 2015). Obwohl ORs bei Insekten ionotrope Rezeptoren darstellen werden verschiedene G-Proteine im Antennengewebe exprimiert, und heterolog exprimierte ORs zeigen eine funktionelle Kopplung an G-Proteine (Wetzel et al., 2001). Andererseits wird laut Benton et al. (2006) die Annahme, dass ORs als GPCRs fungieren können, durch den Nachweis ihrer invertierten Membraninsertion in Frage gestellt (Wicher, 2015). Darüber hinaus gibt es keine Sequenzähnlichkeit zwischen ORs und GPCRs, einschließlich der Wirbeltier-ORs (Wicher, 2015). Die Geruchsstimulation von in kultivierten Zellen exprimierten Insekten-ORs zeigte, dass sie als ionotrope Rezeptoren wirken (Sato et al., 2008). Auch ohne Stimulation ist dies der Fall (Wicher, 2015).

Die Geruchsspezifität ist vom OrX-Partner bestimmt. Ein Austausch von nur wenigen Aminosäuren kann zu einer Verschiebung der Agonistenspezifität führen (Wicher, 2015). Dies wurde von Dekker et al. (2006) bei Or22a in *Drosophila melanogaster* versus *Drosophila sechellia* beobachtet (Wicher, 2015). Die kürzlich berichtete Kristallstruktur eines Orco-Kanals, der ein Tetramer bildet, legt eine ähnliche Topologie für ORs nahe (Butterwick et al., 2018).

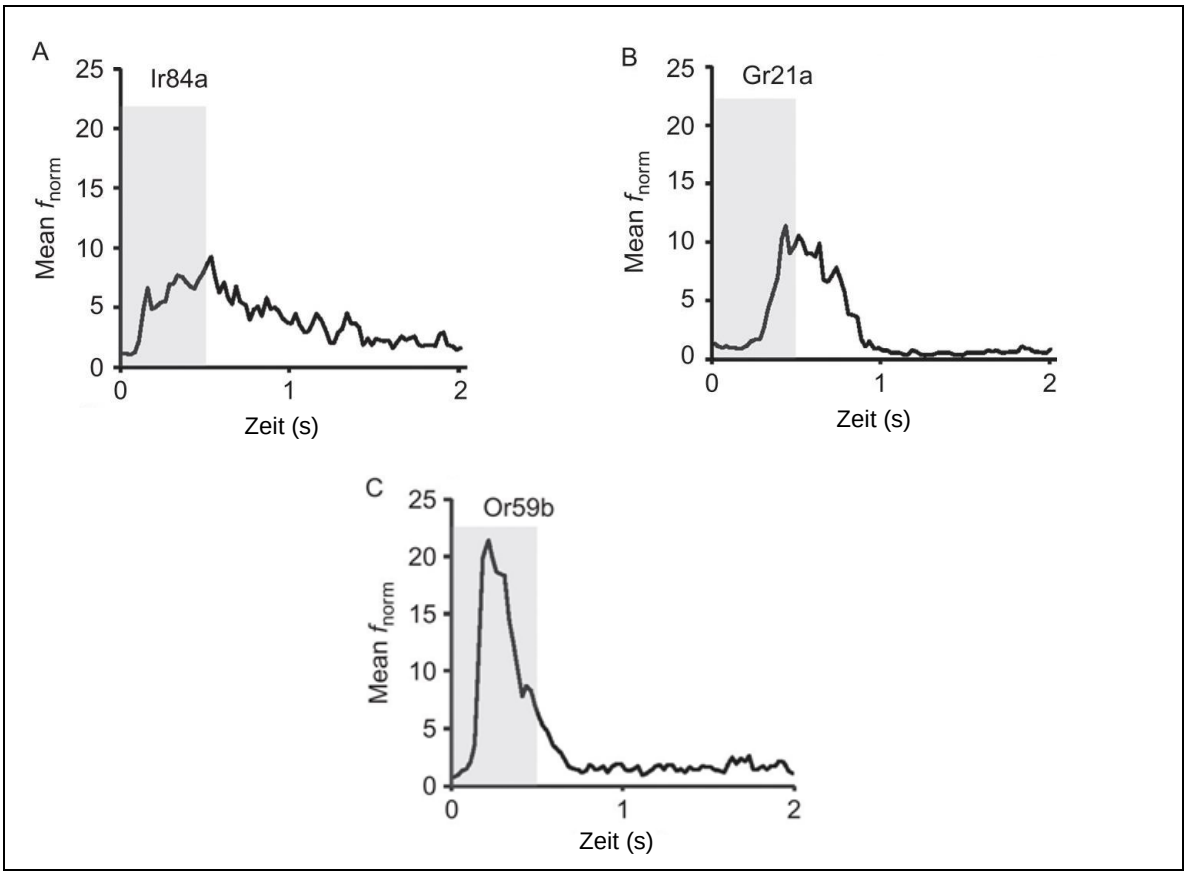

Abb. 5: Reaktion von OSNs, die verschiedene olfaktorische Rezeptortypen exprimieren, auf die Geruchsstimulation (Angabe als Peristimulus-Histogramm von Mean f_{norm})
A) IR84a-exprimierende Neuronen, Stimulation mit Buttersäure (log [-3] v/v)
B) Gr21a-exprimierende Neuronen, umgeben von reinem CO_2
C) Or59b-exprimierende OSNs, Stimulation mit Methylacetat (log [-5] v/v)
Die 500-ms-Stimuli begannen bei 0 (graues Feld). Das OR-exprimierende Neuron zeigt die schnellste und stärkste Reaktion auf die Stimulation. Es zeigt sich jedoch auch ein schneller Zerfall der Antwort während der Geruchspräsentation. Im Gegensatz dazu dauert die Reaktion des IR-exprimierenden und des GR-exprimierenden Neurons länger und übersteigt die Stimuluszeit.

(Wicher, 2015)

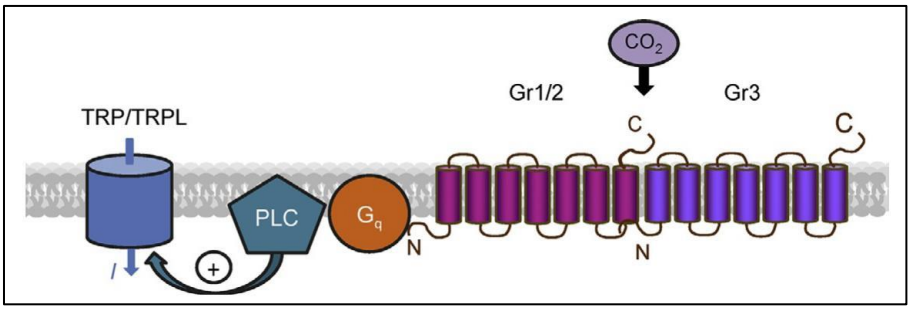

Abb. 6: Signaltransduktion im Zusammenhang mit d. Erfassung v. Kohlendioxid durch GRs
Die Bindung von CO_2 an den heterodimeren Rezeptor aktiviert ein $G\alpha_q$-Protein (G_q), das die Phospholipase C (PLC) stimuliert. Als Folge öffnen sich TRP-Kanäle, die den Einstrom von Kationen (I) ermöglichen und somit das GR-exprimierende OSN depolarisieren.

(Wicher, 2015)

Die Zusammensetzung der ORs bestimmt die relative Kationenpermeabilität. Beispielsweise sind für verschiedene OrX-Proteine variable Ionenpermeabilitäten für die resultierenden OR-Komplexe gefunden worden (Pask et al., 2011). Eine Mutationsanalyse bei Motten (*Bombyx mori*) ergab, dass die Ionenkanalpore sowohl von OrX- als auch von Orco-Proteinen ausgekleidet sein kann (s. Abb. 7), (Wicher, 2015). Die Expression von Orco-Proteinen ohne OrX-Proteine führt auch zur Bildung von funktionellen Kanälen, die nicht auf Gerüche ansprechen, sondern durch zyklische Nucleotide oder synthetische OR-Agonisten aktiviert werden können (Wicher, 2015). Ein Beitrag der intrazellulären Signalgebung zur OR-Funktion, der die Aktivierung des G-Proteins einschließt, wird kontrovers diskutiert. In einer Studie, bei der heterolog exprimierte ORs und Pheromonrezeptoren eingesetzt wurden, konnten ausschließlich ionotrope Funktionen beobachtet werden (Yao et al., 2010). Die Manipulation der G-Proteinfunktion in *Drosophila* hatte keinen Einfluss auf die OSN-Aktivität (Wicher, 2015).

Auf der anderen Seite ergaben Untersuchungen zur Pheromondetektion der Motte *Manduca sexta* eine metabotrope Signalübertragung durch den Diacylglycerol (DAG) / Inositoltrisphosphat (IP3) - Signalweg (s. Abb. 8), (Wicher, 2015). Eine Rolle dieses Signalweges bei der Vermittlung olfaktorischer Signale bei anderen Insekten wurde durch Krieger et al. (1999) beobachtet (Wicher, 2015).

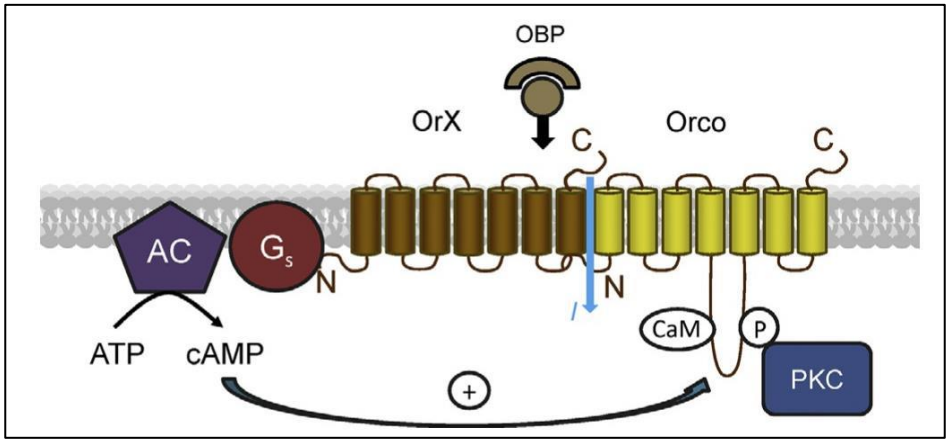

Abb. 7: Aktivierung und Regulierung von ORs für die Duftwahrnehmung
Duftmoleküle, die an Odorant-bindende Proteine (OBP) gebunden sind, nähern sich dem OR (OrX) und aktivieren dadurch einen ionotropen Strom (I), der zur Wechselwirkung von Ligand und Rezeptor führt. Parallel dazu wird ein stimulierendes G-Protein ($G\alpha_s$) aktiviert, das zu einer verstärkten AC-Aktivität und damit zu einer erhöhten cAMP-Produktion in der Zelle führt. Orco-Kanäle werden durch cAMP aktiviert; Orco-Proteine können homomere Kanäle bilden oder einen Ionenstrom durchlassen, wenn sie mit einem bestimmten OrX-Protein gepaart werden. Die Orco-Aktivität sensitisiert ORs in einem bestimmten Zeitfenster, nachdem sie einem Liganden ausgesetzt wurden. Diese Orco-Aktivität wird auch durch Phosphorylierung (P) über die Proteinkinase C (PKC) und Calmodulin (CaM) reguliert.
(Wicher, 2015)

Des Weiteren wird die Pheromondetektion von *Manduca* durch den zirkadianen Rhythmus gesteuert und verwendet verschiedene Signalkaskaden, die auf unterschiedliche Ionenkanäle einwirken (Wicher, 2015). In einer Studie von Wicher et al. (2008), die heterolog exprimierte *Drosophila*-OR-Proteine untersuchte, wurden sowohl ionotrope als auch metabotrope Signalübertragungsarten nachgewiesen (s. Abb. 7 und Abb. 8).

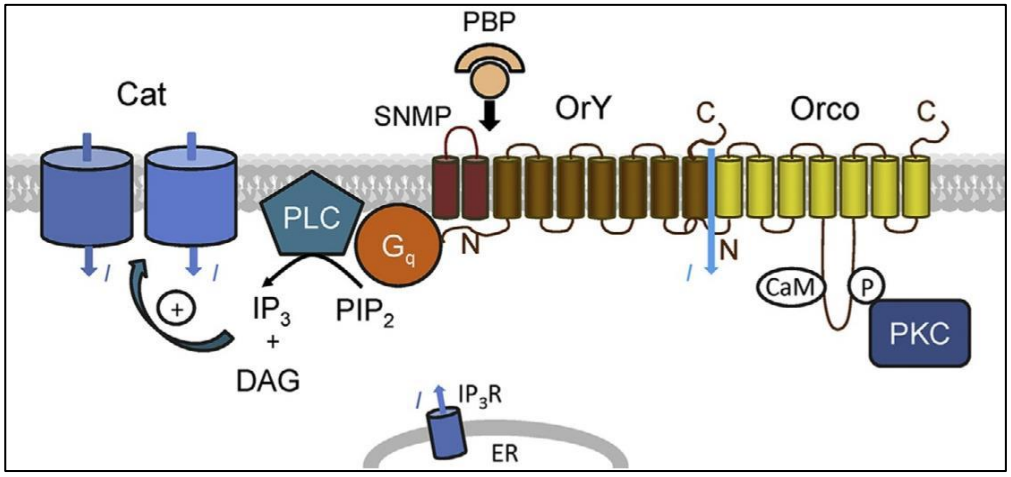

Abb. 8: Aktivierung und Regulierung von Pheromon-ORs
Das sensorische Neuronenmembranprotein (SNMP) fungiert als Korezeptor. An Pheromon-Bindungsproteine (PBPs) gebundene Pheromonmoleküle nähern sich dem OR (OrY), wodurch durch die Wechselwirkung von Ligand und Rezeptor ein ionotroper Strom (I) aktiviert wird. Alternativ oder parallel wird ein $G\alpha_q$-Protein (G_q) aktiviert, das die Aktivität der Phospholipase C (PLC) und damit die Produktion von Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) aus dem Membranphospholipid PIP2 stimuliert. Diese Verbindungen aktivieren Kationenkanäle (Cat) in der Plasmamembran. Zusätzlich kann IP3 auch IP3-Rezeptoren (IP3R) im endoplasmatischen Retikulum (ER) aktivieren, wodurch die Ca^{2+}-Freisetzung in das Zytoplasma bewirkt wird. Diese Ereignisse können zu einer Modulation der Orco-Kanalaktivität über Ca^{2+} / CaM und / oder Phosphorylierung durch Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG führen.

(Wicher, 2015)

Parallel zur direkten Aktivierung des OR-Kanals, kann durch die Geruchsstimulation ein $G\alpha_s$-Protein aktiviert werden, das die Adenylylcyclase-Aktivität und damit die cAMP-Produktion erhöht (Wicher, 2015). Dies geschieht sogar bei Duftmolekülkonzentrationen, die zu niedrig sind, um eine ionotrope Antwort hervorzurufen. In Bezug auf die Orco-Aktivität induziert cAMP wiederum einen Ionenstrom (Wicher, 2015). Da heterolog exprimierte Orco-Proteine ohne OrX-Expression Ionenkanäle bilden, stellen diese Orco-Kanäle wahrscheinlich Orco-Homodimere dar. Dementsprechend bilden *Drosophila* Orco-Dimer-Konstrukte bei heterologer Expression funktionelle leitende Ca^{2+}-Kanäle aus (Mukunda et al., 2014). Diese Konstrukte werden auch von CaM moduliert und interagieren mit OrX-Proteinen. Eine alternative Hypothese von Nakagawa et al. (2012) zur Lokalisation des Orco-Kanals ging davon aus, dass Orco innerhalb des OR-Komplexes zusätzlich zur bestehenden eine weitere Pore ausbilden könnte. Bei einer anfänglichen Präsentation einer Duftmolekülkonzentration unterhalb des

Schwellenwertes, die den OR nicht aktiviert, führt eine zweite Präsentation dieses Stimulus innerhalb eines geeigneten Zeitfensters zwischen einigen Sekunden und einigen Minuten, zu einer ionotropen Antwort (Getahun et al., 2013). Ein erster Kontakt mit einem schwachen Geruchssignal sensitisiert somit die ORs und befähigt sie, auf einen zweiten oder jeden weiteren Kontakt zu antworten. Diese zeitabhängige Sensitisierung bedeutet auch auf Empfängerebene ein Kurzzeitgedächtnis (Wicher, 2015). Weitere Ausführungen zum Thema der Sensitisierung sind in Kapitel 3.4 zu finden.

Die Pheromonwahrnehmung ist eine hochempfindliche Form der Duftsignalverarbeitung und für eine erfolgreiche Kodierung der Geruchsinformation in vielen Insekten von entscheidender Bedeutung (Wicher, 2015). Die hydrophobe Beschaffenheit von Pheromonen führt zu besonderen Anforderungen an den Detektionsapparat. Neben Pheromonrezeptoren, wie Or67d / Orco in *Drosophila,* exprimieren Rezeptorneuronen auch ein CD36-verwandtes Protein. Dieses wird als sensorisches Neuronenmembranprotein (SNMP) bezeichnet (Wicher, 2015). CD36-Proteine von Säugetieren sind am Fettsäuretransport und an der Wahrnehmung von Insektenpheromonen beteiligt. Das SNMP ist hierbei ein notwendiger Korezeptor. Vor der Bindung an den Rezeptorkomplex müssen Pheromonmoleküle von den Sensillenporen durch die Lymphe auf den Rezeptorkomplex übertragen werden. Dieser Prozess wird von PBPs unterstützt (Wicher, 2015). Die Pheromon-Signalverarbeitung hängt von der Signalstärke und -dauer, dem zirkadianen Rhythmus und dem Aktivitätsniveau des Insekts ab. Schwache Stimuli aktivieren die PLC-Kaskade und führen zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration (s. Abb. 8), (Wicher, 2015). Eine starke Stimulation aktiviert die Rezeptor-Guanylylcyclasen, was eine langanhaltende Anpassung der OSN-Aktivität bewirkt (Wicher, 2015). In der Ruhephase weisen diese Zellen einen erhöhten zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Spiegel auf, während in der Aktivitätsphase der cAMP-Spiegel hoch ist. Dies führt zu einer unterschiedlichen Aktivierung von Ionenkanälen. Der Pheromon-Signaltransduktionsprozess wird als rein metabotrop betrachtet (Wicher, 2015). Hierbei fungiert der Pheromonrezeptor / Orco-Komplex als Schrittmacher-Kanal, der das OSN-Membranpotential in Richtung des Aktionspotentialschwellenwerts treibt (Wicher, 2015). Hierdurch wird laut Nolte et al. (2013) die OSN-Aktivität beschleunigt.

3.3.3 Regulation

Die regulatorische Kontrolle von Membranproteinen ist für Ionenkanäle und Transmitterrezeptoren bekannt. Eine strenge Regulierung der Rezeptorempfindlichkeit ist für Insekten von besonderer Bedeutung, da sie wichtige Informationen aus der Detektion flüchtiger Signalmoleküle gewinnen müssen (Wicher, 2015). Dazu gehören zum Beispiel Signale mit Verweis

auf Nahrung, Partner, Feinde oder Eiablagen. Eine solche Regulierung der OR-Empfindlichkeit fehlt laut Getahun et al. (2013) für IRs. In diesem Zusammenhang ist die Korrelation zwischen der OR-Entwicklung und dem Beginn des Insektenfluges zu nennen. Für eine korrekte Auflösung von filamentösen Duftmolekülwolken während des Fluges, musste die Ausstattung von OSNs möglicherweise mit den ORs ergänzt werden (Wicher, 2015). Die OR-Sensitisierung erfordert eine vorherige Orco-Aktivität, die durch mehrere Faktoren gesteuert wird. Die Orco-Aktivierung durch cAMP beruht beispielsweise auf einem ausreichenden Grad an Orco-Phosphorylierung über PKC. Ein physiologischer intrazellulärer Kalziumspiegel ist hierbei Voraussetzung (Wicher, 2015).

Andererseits leitet der stark phosphorylierte Orco auch in Abwesenheit von cAMP einen Strom. Phosphorylierung und cAMP sind somit Teile konvergenter Signalübertragungs- / Regulierungswege (Wicher, 2015). Mutationen in Teilen von mutmaßlichen Duftsignaltransduktionskaskaden und die Beobachtung der daraus resultierenden Wirkung auf Duftantworten, liefern signifikante Informationen zu Mechanismen der Duftwahrnehmung (Wicher, 2015). *Drosophila*-Mutanten mit gestörter cAMP-Produktion zeigten Martín et al. (2001) zu Folge eine abnorme Verhaltensantwort auf Duftstimulation. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine verlässliche Duftsignalverarbeitung eine intakte cAMP-Signalkaskade erfordert (Wicher, 2015).

Außerdem wird die Verarbeitung von olfaktorischen Informationen auch von anderen G-Proteinen wie $G\alpha_o$ (Chatterjee et al., 2009) und $G\alpha_i$ (Ignatious Raja et al., 2014) beeinflusst. *Drosophila norpA*-Mutanten weisen Defizite im Riechverhalten auf, was darauf hinweist, dass PLC eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Geruchsinformationen spielt (Riesgo-Escovar et al., 1995; Wicher, 2015).

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass jede Störung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2)-Spaltungs- und Regenerationszyklus eine geeignete Verarbeitung des olfaktorischen Signals in den Rezeptorneuronen beeinträchtigen kann. Diese OR-Kanäle leiten auch Ca^{2+} und bilden die Grundlage für eine Verstärkung von Geruchsignalen durch intrazelluläre Ca^{2+}-Freisetzung über Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren (Wicher, 2015).

Durch die Hemmung von Ryanodin-Rezeptoren kann die beobachtete Signalverstärkung gemäß Ignatious Raja et al. (2014) aufgehoben werden. Die Signalverstärkung ist nur bis zu einer bestimmten Signalstärke oder -dauer möglich (Wicher, 2015). Eine langanhaltende Geruchsstimulation oder eine hohe Geruchskonzentration führt zum Gegenteil, wie z.B. zu einer OSN-Anpassung (Getahun et al., 2012). Bei Ca^{2+}-leitenden Proteinen reguliert der Ca^{2+}

-Einstrom oft die Kanaldynamik über Calmodulin (CaM) (Wicher, 2015). In spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und in CNG-Kanälen führt die CaM-Aktivierung aufgrund des Ca^{2+}-Zustroms zu einer Kanalschließung (Wicher, 2015). Dies geschieht, um die Zelle vor einer Ca^{2+}-Überladung zu schützen (Trudeau et al., 2003). So wird auch die Ca^{2+}-Transportrate der Plasmamembran-Ca^{2+}-Pumpe über die Aktivierung von CaM stark erhöht (Budde et al., 2002). Bei *Drosophila* Orco-Kanälen verbessert die Aktivität von CaM den Ionenfluss über Orco (Mukunda et al.,2014). Diese positive Rückkopplung könnte bei der aktivitätsabhängigen OR-Sensitisierung von Orco eine Rolle spielen (Wicher, 2015). Die spezifische Wirkung von CaM kann abhängig von den OrX-Proteinen variieren und bestimmt die Funktion der ORs. So verstärkt CaM die OR-Antwort für Or22a und Or56a. Für Or33a und Or47a hingegen hat CaM keine Wirkung (Wicher, 2015).

Eine detailliertere Erklärung zum Thema Ca^{2+}, CaM und die Beeinflussung der Sensitivität von ORs durch CaM bei *Drosophila melanogaster* ist Kapitel 3.4 zu entnehmen.

Im Jahre 2014 wurde von Liu et al. eine neue Art der OR-Regulation entdeckt. Eine normale *Drosophila*-OR-Funktion erfordert eine funktionelle Phospholipid-Flippase, dATP8B, die die Asymmetrie der Phospholipidverteilung über die Plasmamembran aufrechterhält (Wicher, 2015). Fliegen mit Mutationen im dATP8B-Transporter zeigen eine stark verminderte Empfindlichkeit in ORs. Auf IRs und GRs ist kein Einfluss zu verzeichnen (Wicher, 2015). Da der Transport von OR-Proteinen zur dendritischen Membran der OSNs nicht durch Mutationen in dATP8B beeinflusst wird, wird angenommen, dass die Transporterfunktion für die normale OR-Funktionalität erforderlich ist. Im Gegensatz dazu war für den Pheromonrezeptor Or67d eine Fehllokalisierung im dATP8B-Mutanten beobachtet worden (Wicher, 2015).

3.4 CaM beeinflusst die Sensitisierung der ORs bei *Drosophila melanogaster*

3.4.1 Interaktion von Ca^{2+} und CaM

Die Rolle von Ca^{2+} bzgl. ORs wurde bereits im vergangenen Kapitel 3.3.3 kurz erläutert und soll zum genaueren Verständnis in diesem Kapitel wiederholt betrachtet werden.

Kalziumionen spielen eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel und in der Physiologie von Eukaryoten. Für Ca^{2+} existiert ein Konzentrationsgradient über der Plasmamembran, wobei die extrazellulären Konzentrationen um das 10.000-fache höher sind als die intrazellulären (McDowall, 2015).

Externe Signale, wie Hormone, Licht, Stress etc., können oft zu vorübergehenden Erhöhungen der Kalziumkonzentration in der Zelle führen (McDowall, 2015). Zellen haben eine Vielzahl von Möglichkeiten entwickelt, um diesen Ionengradienten zu steuern und zu nutzen. Somit sind viele zelluläre Prozesse regulierbar, sodass eine Transkriptionskontrolle und ein Überleben der Zelle gewährleistet ist (McDowall, 2015). Erhöhte Kalziumkonzentrationen führen zu einer Ca^{2+}-Bindung durch regulatorische Proteine, die das Ca^{2+}-Signal in eine biologische Reaktion umwandeln. Der Ort, die Menge und die Wirkung des Kalziumzuflusses sind durch diese Proteine steuerbar (McDowall, 2015).

Calmodulin (CaM) ist ein solches Ca^{2+}-bindendes Protein und wird als Hauptwandler für Ca^{2+}-Signale angesehen. Es kann an eine Vielzahl von Bindungsstellen gelangen und hierdurch verschiedenste zelluläre Funktionen beeinflussen (McDowall, 2015). CaM vermittelt Prozesse, wie Entzündungen, Stoffwechsel, Apoptose, Muskelkontraktion, intrazelluläre Bewegung, Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis, Nervenwachstum und die Immunantwort. Des Weiteren exprimiert es in vielen Zelltypen und kann verschiedene subzelluläre Positionen annehmen. Dazu zählen auch Zytoplasma innerhalb von Organellen oder die Assoziation mit der Plasma- oder Organellenmembranen (McDowall, 2015). Dieses Protein wird als Kalziumsensor und Signalwandler verwendet und kann auch die Ca^{2+}-Speicher im endo- und sarkoplasmatischen Retikulum nutzen. Bei der Bindung an Ca^{2+} erfährt CaM eine Konformationsänderung. Bis zu vier Ca^{2+} können gebunden werden, wobei posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung u. proteolytische Spaltung möglich sind (McDowall, 2015).

3.4.2 Sensitisierung von ORs

Sensitisierung heißt, dass die Stimulation von OSNs mit unterschwelligen Geruchsstoffkonzentrationen zu einer Reaktion oberhalb der Schwelle führen kann, wenn der Stimulus in einem geeigneten Zeitfenster wiederholt wird. Die Sensitisierung von ORs erfordert die Aktivierung von Orco (Getahun et al., 2013; Mukunda et al., 2016).

Im Jahre 2016 entdeckten Mukunda et al. am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie (s. Anlage 1), dass CaM die Sensitisierung von ORs bei *Drosophila melanogaster* beeinflusst. Sie konnten nachweisen, dass im Allgemeinen zwei kritische Parameter die Sensitisierung in OSNs beeinflussen. Der erste ist die Zeitspanne zwischen zwei Reizen und der zweite Parameter ist die Intensität der ersten Antwort (Mukunda et al., 2016).

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Orco-Funktion (Sargsyan et al., 2011). Es wurde beobachtet, dass ein hoher Grad an

intrazellulärer Kalziumpufferung die Aktivierung von Orco verhindert (Sargsyan et al., 2011). Da die erste Orco-Aktivierung einen Ca^{2+}-Einstrom erzeugt und ein zu starker erster Stimulus die Sensitisierung verhindern könnte, entstand die Frage, ob die Geschwindigkeit der Kalziumpufferung die Sensitisierung beeinflussen kann (Mukunda et al., 2016). Mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik und des nichtinvasiven *Ca^{2+}-Imagings* (s. Kapitel 4.3.2) konnten keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden. Es zeigte sich hingegen beim *Ca^{2+}-Imaging* ein verstärktes Ca^{2+}-Signal in Orco-exprimierenden Zellen (Mukunda et al., 2016).

Zum Nachweis, dass CaM an der Sensitisierung von Orco beteiligt sein könnte, nutzen sie Doppelstimulationsprotokolle und verwendeten die CaM-Inhibitoren *W7* und *Chlorpromazin (CPZ)* in der Gegenwart von Orco. In allen getesteten Fällen gab es keine signifikante Potenzierung der Antwort auf den zweiten Reiz (Mukunda et al., 2016).

Zur Unterstützung der beim *Ca^{2+}-Imaging* gefundenen Befunde über die Rolle von CaM, wurden *Ganzzell-Patch-Clamp*-Versuche durchgeführt. Wenn Zellen, die durch wiederholte *VUAA1*-Stimulation eine Sensitisierung zeigten, mit *W7* behandelt wurden; dann verstärkte eine Doppelstimulation mit demselben Protokoll die zweite Stromantwort nicht und beide Stimuli lösten eine allgemein schwächere Antwort aus (Mukunda et al., 2016). Daher unterstützen sowohl *Ca^{2+}-Imaging*, als auch elektrophysiologische Experimente die Ansicht, dass CaM-Aktivität erforderlich ist, um eine Sensitisierung in heterolog exprimierten Orco-Proteinen herbeizuführen (Mukunda et al., 2016).

Als Nächstes testeten die Wissenschaftler zwei vollständige OR-Konstrukte, die in ihren Reaktionen auf CaM-Hemmung differierten, nämlich Or22a / Orco und Or56a / Orco (Mukunda et al., 2014). Des Weiteren ist versucht worden, ein Sensitisierung des Or22a / Orco-Konstrukt durch Stimulation mit dem Or22a-Liganden *Ethylhexanoat* (100 µM) herbeizuführen. Es gab zwei verschiedene Antwortmuster. Im Falle, das der erste Reiz zu einem Anstieg der Ca^{2+}-Antwort führte, die vergleichbar mit der von *VUAA1* war, konnte der zweite Impuls das Ca^{2+}-Signal nicht verbessern. Aber wenn der erste Stimulus kein Ca^{2+}-Signal erzeugte, dann trat eine Reaktion auf den zweiten Stimulus auf, die als Ergebnis einer OR-Sensitisierung gemäß Getahun et al. (2013) interpretiert werden kann (Mukunda et al., 2016).

Abschließend wurde gefragt, ob die Ergebnisse des heterologen Expressionssystems für Prozesse repräsentativ sind, die in nativen *Drosophila melanogaster*-OSNs stattfinden. Zu diesem Zweck führten sie *Ca^{2+}-Imaging* in ex vivo OSN durch, die den Or22a-OR exprimieren, und stimulierten das Präparat wiederholt mit submikromolaren Konzentrationen von *VUAA1* und *Ethylhexanoat*. Die $[Ca^{2+}]_i$-Dynamik konnte in den Zellkompartimenten; Soma (s. Abb. 9A),

dem äußeren dendritischen Segment (ODS) (s. Abb. 9A) und dem inneren dendritischen Segment (IDS) (s. Abb. 9A); beobachtet werden. Die Stimulation mit *VUAA1* unter Kontrollbedingungen führte zur Sensitisierung aller drei Kompartimente (Mukunda et al., 2016). In Gegenwart von *W7* wurde nur in den IDSs eine leicht Sensitisierung festgestellt, jedoch nicht in den ODSs und den Somata. Nach der Stimulation mit *Ethylhexanoat* zeigten Somata und IDS unter beiden experimentellen Bedingungen eine Sensitisierung (s. Abb. 9B). Die ODS zeigten unter Kontrollbedingungen eine Sensitisierung, aber in Gegenwart von *W7* nicht und stattdessen eine Adaptation (s. Abb. 9B), (Mukunda et al., 2016).

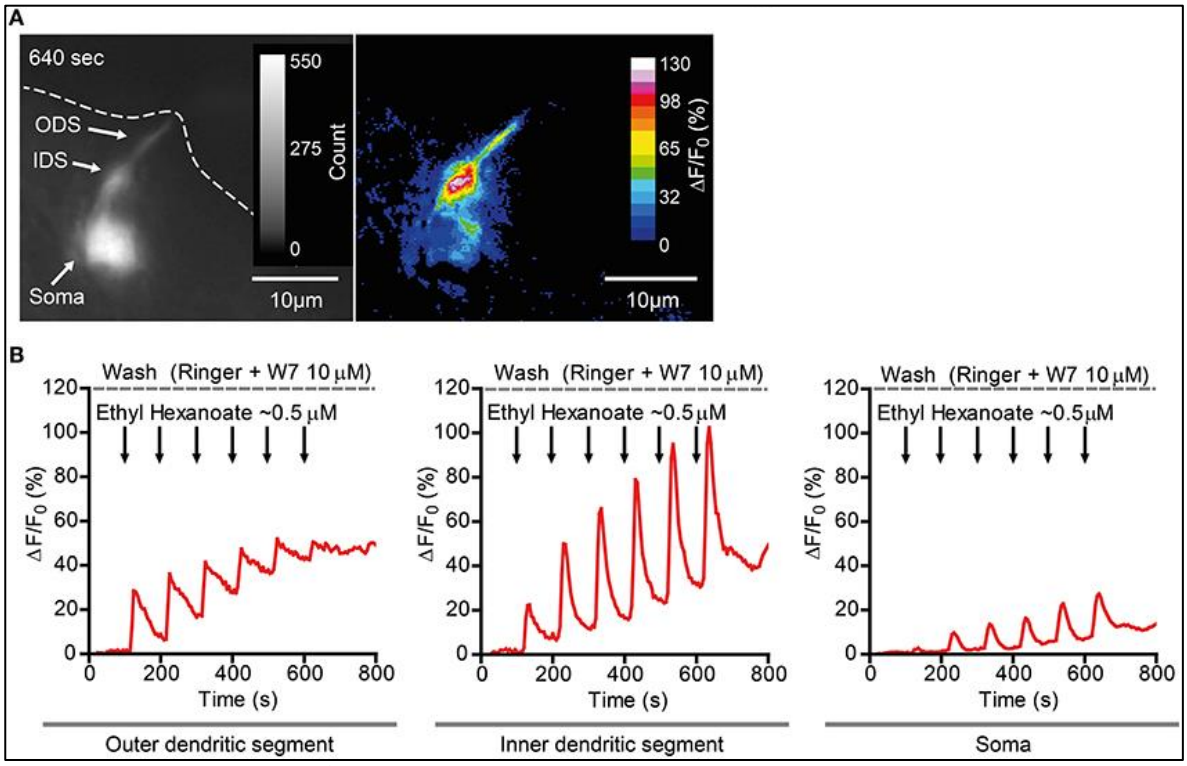

Abb. 9: Beispiel für *Ca^{2+}-Imaging* bei einem Or22a (und GCaMP3.0) - exprimierenden OSN von *Drosophila melanogaster* in Gegenwart von 10 µM W7

A) Links: GCaMP-Fluoreszenzintensität (s. Kapitel 4.3.2) eines OSN in der Fliegenantenne. Das Soma, das innere dendritische Segment (IDS) und das äußere dendritische Segment (ODS) zeigen eine Fluoreszenzintensität auf, die den Rand des Antennenschnitts erreicht (gestrichelte Linie). Die Abbildung zeigt einen Zeitabschnitt, der bei 640 s (Höhepunkt der letzten Stimulation) aufgenommen wurde.
Rechts: prozent. Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) des OSN des linken Feldes.

B) Zeitliche Darstellung der prozentualen Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) verschiedener Kompartimente desselben OSN wie in (A), nämlich ODS (links), IDS (Mitte) u. Soma (rechts).

(Anlehnung an Mukunda et al., 2016)

Die Forscher vermuteten, dass eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen in der Morphologie der Zelle und in einem anderen Design der Signaltransduktionskaskaden begründet sei. OSNs von Insekten sind stark polarisierte Zellen. Sie präsentieren an den zwei entgegengesetzten Polen der Zelle einen axonalen Prozess und einen einzelnen dendritischen

Prozess, der in mehreren sensorischen Zilien (s. Abb. 10, s. auch C) endet. Orco und die neuronenspezifischen OrX-Proteine kommen nur in der Ziliarregion von OSNs vor, während Orco-Proteine in der gesamten Zelle verteilt sind (Larsson et al., 2004). Zwischen dem äußeren dendritischen Bereich, der aus den olfaktorischen Zilien besteht, und dem Soma gibt es eine spezielle Struktur, die als IDS (s. Abb. 10, Abb. 9A) bezeichnet wird (Shanbhag et al., 2000). Diese Region ist mit verlängerten Mitochondrien ausgestattet, die sich in trichoiden und basikonischen Sensillen (s. B) befinden (Shanbhag et al., 2000). Eine Ausnahme bilden coelokonische Sensillen, die keine Mitochondrien (Shanbhag et al., 2000) beinhalten (Mukunda et al., 2016). Darüber hinaus weisen *Drosophila melanogaster*-OSNs, die in basikonischen und trichoiden Sensillen lokalisiert sind, ein gut entwickeltes glattes endoplasmatisches Retikulum auf (Shanbhag et al., 2000). Daher könnte die erhöhte Ca^{2+}-Antwort in den IDSs und Somata mit der Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+}-Speichern der Or22a-Neuronen zusammenhängen (s. Abb. 10), (Mukunda et al., 2016).

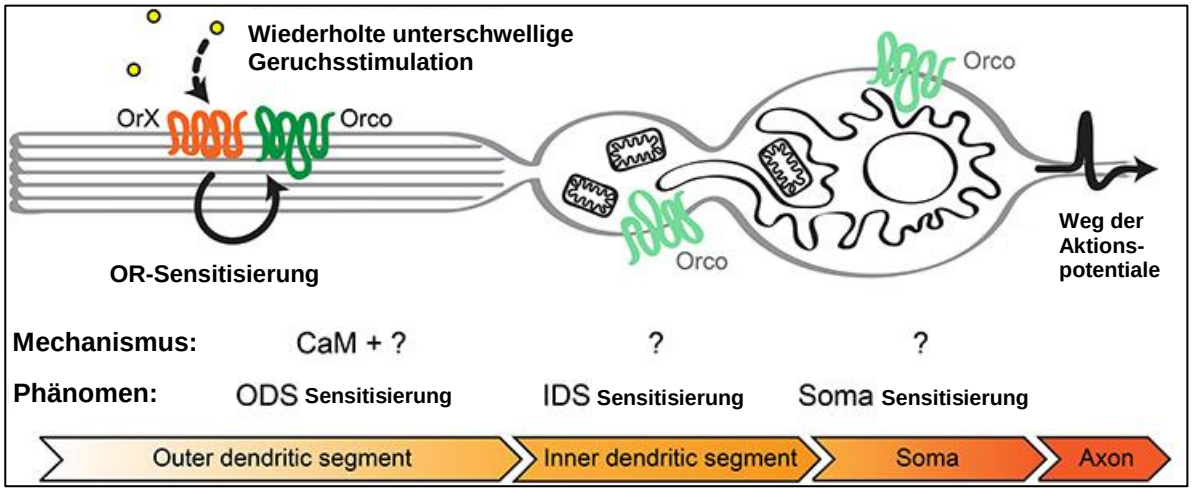

Abb. 10: Modell zur Erklärung der Sensitisierung von OSN in basikonischen Sensillen. Nach wiederholter Stimulation mit Geruchskonzentrationen unterhalb des Schwellenwerts des OrX / Orco-Rezeptorkomplexes in den olfaktorischen Zilien des äußeren dendritischen Segments (ODS), kann CaM zusammen mit anderen unbekannten intrazellulären oder Membranfaktoren zur OR-Sensitisierung führen. Die Folge kann die beobachtete ODS-Sensitisierung sein. Kleine Ströme, die aus dem ODS stammen, können die Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+}-Speichern auslösen. Hierzu zählen die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum. Zuerst beginnt die Ca^{2+}-Freisetzung im IDS und anschließend im Soma. Auf diese Weise werden diese zellulären Kompartimente sensitisiert und das Signal wird immer stärker. Schließlich erreicht das Membranpotential am Axon-Hügel die Aktionspotentialschwelle schneller, was die Aktionspotentialrate erhöht.
(Anlehnung an Mukunda et al., 2016)

3.5 Mitochondrien

Ausgehend von dem im Kapitel 3.4.2 vermuteten Zusammenhang zwischen der Sensitisierung von ORs und der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Mitochondrien, soll diese Zellorganelle im Folgenden genauer beschrieben werden.

Mitochondrien sind die metabolischen Kraftwerke der Zelle und dienen der Speicherung und Freisetzung von großen Mengen an Ca^{2+}. Dieser Import und Export von Ca^{2+} trägt u.a. dazu bei, die Energieproduktion zellulären Bedürfnissen anzupassen. Darüber hinaus spielen Mitochondrien als Ca^{2+}-Speicher eine wichtige Rolle bei der Ca^{2+}-Regulation von Zellen (Babcock und Hille, 1998).

In Studien von Zoratti et al. (1995) konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien außerordentlich viel Ca^{2+} aus einer mit Ca^{2+} angereicherten Lösung aufnehmen können. Die Aufnahme ist auf den Eintritt durch einen Ca^{2+}-selektiven Ionenkanal zurückzuführen. Dieser trägt den Namen **„mitochondrialer Ca^{2+}-Uniporter (mCU)“**. Er wird durch das große nach innen gerichtete Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) der erregten Mitochondrien angetrieben (s. Abb. 11). Die Aufnahme von Ca^{2+} kann durch Rutheniumrot blockiert werden und endet, wenn das Membranpotential durch Anwendung von Protonophoren, wie Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon (CCCP) oder Carbonylcyanin-p-Trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) zusammenbricht (Babcock und Hille, 1998). Auf der anderen Seite ist der Export von Ca^{2+} aus isolierten Mitochondrien typischerweise Na^+-abhängig und wird durch einen Na^+/Ca^{2+}-Austauscher vermittelt (Babcock und Hille, 1998). Laut neuerer Erkenntnisse soll der mCU auch bei oxidativem Stress, Apoptose und vielen neurologischen Erkrankungen eine Rolle spielen (Wang et al., 2015).

Darüber hinaus kann Ca^{2+} durch Öffnen der **Permeabilitätstransitionspore (mPTP), ein Ionenkanal mit großer Leitfähigkeit** (s. Abb. 11), freigesetzt werden (Zoratti et al., 1995). Thayer et al. (1990) fanden heraus, dass der mitochondriale Ca^{2+}-Transport einen signifikanten Einfluss auf den Zeitverlauf des zytoplasmatischen [Ca^{2+}]-Transienten in lebenden Neuronen hat (Babcock und Hille, 1998). Sie stellten fest, dass *Rutheniumrot* oder die Entkoppler *CCCP* und *FCCP* einen Prozess inhibierten, der einen Anstieg von zytoplastischen Kalzium ($Ca_{c)}$ verzögerte und die endgültige Rückkehr von Ca_c auf seinen Ruhepegel verlängerte (s. Abb. 12), (Babcock und Hille, 1998).

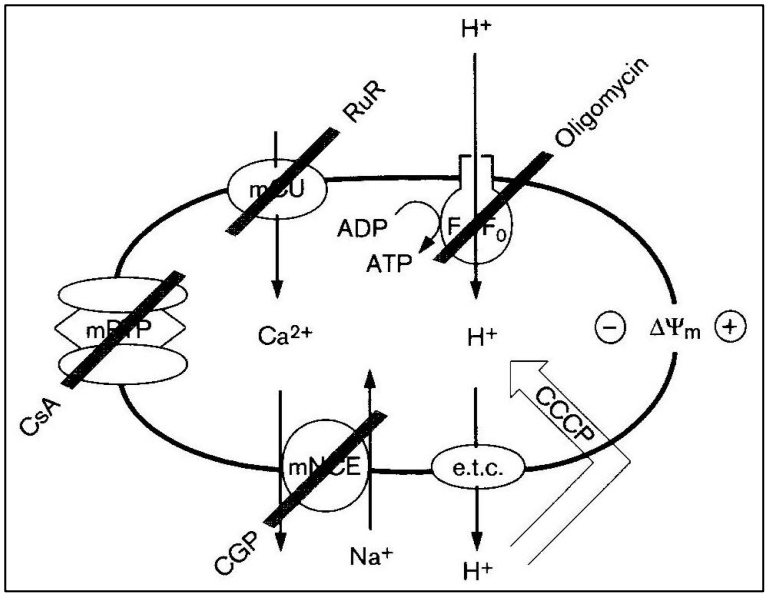

Abb. 11: Transportwege von Ca^{2+} und H^+ entlang der inneren Mitochondrienmembran und Darstellung einiger selektiver Inhibitoren, wie:
das *Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon (CCCP)* für die Elektronentransportkette (e.t.c), *Oligomyzin* für die F_1F_o-ATP-Synthase, *Rutheniumrot (RuR)* für den mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporter (mCU), *7-Chloro-3,5-Dihydro-5-Phenyl-1-H-4,1-Benzothiazepin-2-on (CGP)* für den mitochondrialen Na^+/Ca^{2+}-Austauscher (mNCE) und *Zyklosporin A (CsA)* für die mitochondriale Permeabilitätsübergangspore (mPTP). $\Delta\Psi_m$ symbolisiert das mitochondriale Membranpotential.

(Anlehnung an Babcock und Hille, 1998)

3.5.1 Am mitochondrialen Ca^{2+}-Transport beteiligte Moleküle

Die äußere Mitochondrienmembran scheint für kleine Moleküle leicht durchlässig zu sein, sodass die Strukturen für den Ca^{2+}-Transport (s. Abb. 11) hauptsächlich in der inneren Membran liegen müssen. Im Gegensatz zu Ca^{2+}-Transportern in der Plasmamembran, wurde die Struktur dieser inneren Membran noch nicht vollständig geklärt (Babcock und Hille, 1998).

Die Aufnahme von Ca^{2+} durch isolierte Mitochondrien hat die Transportkapazität eines Ionenkanals. Der geschätzte Durchfluss durch den **mCU** übersteigt 10.000 Ionen pro Sekunde und ist damit etwas größer als der, den die schnellsten bekannten Ionenpumpen und Ionenaustauscher zeigten (Babcock und Hille, 1998).

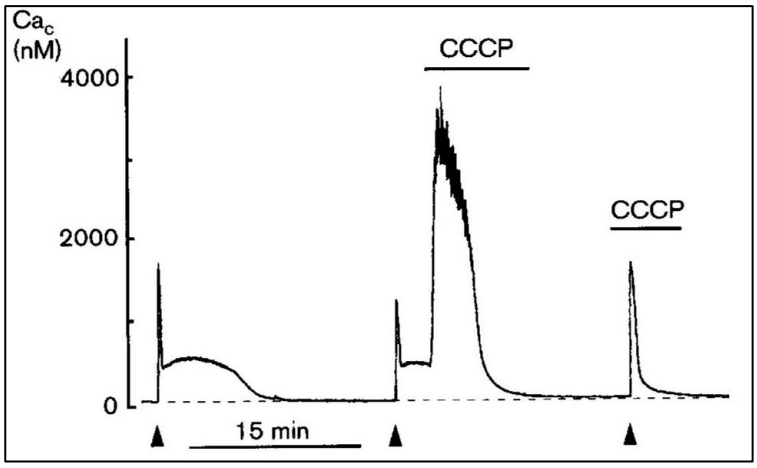

Abb. 12: Beweise für eine schnelle Freigabe von zytoplasmatischen Ca^{2+} (Ca_c) in die Mitochondrien eines Neurons.
Der Zeitverlauf von Ca_c wird mit Indo-I-Farbstoff gemessen, der in das Zytoplasma einer Ratten-Dorsalwurzelganglienzelle geladen ist. Die Zelle wird dreimal für 30 Sekunden (Pfeilspitzen) depolarisiert, um große Ca_c-Ladungen aufzubringen. Die erste Ladung wird schnell wieder auf ein Plateau-Niveau in der Nähe von 500 nM gebracht, das für 8 Minuten anhält. Die zweite Ladung wird auf ähnliche Weise gelöscht. Dann wird aber 1 µM *CCCP* nach 3 Minuten angewendet und eine enorme Ca^{2+}-Menge wird aus Mitochondrien in das Zytoplasma entlassen. Bei der kontinuierlichen Anwesenheit von *CCCP* wird die anfängliche Freigabe der dritten Ladung stark verlangsamt. Es zeigt sich jedoch kein Plateau.
(Babcock und Hille, 1998)

Der Ca^{2+}-Import hängt direkt von $\Delta\Psi_m$ ab und es gibt eine starke Abhängigkeit von der zytoplasmatischen [Ca^{2+}]. Zytosolische Komponenten wie ATP, P_i und Mg^{2+} können die mCU-Öffnung laut Litsky et al. (1997) verhindern oder modulieren (Babcock und Hille, 1998).

Andererseits ist der Export von Ca^{2+} in der Regel bergauf und wird durch den Eintritt von mehr als zwei Na-Ionen pro Ca^{2+} angetrieben. In einem „zytosolischen“ Medium, das ATP enthält, entfernen Gehirn-Mitochondrien externes Ca^{2+} zu einem Na^+-abhängigen „Sollwert“ von -300 nM (Babcock und Hille, 1998). Dieser Wert stellt scheinbar ein kinetisches Gleichgewicht zwischen verbleibender Ca^{2+}-Aufnahme durch den mCU und Ca^{2+}-Export durch den Na^+/Ca^{2+}-Austauscher dar (Nicholls und Scott, 1980). Es könnte gesagt werden, dass die mitochondriale Energieproduktion Perioden des Energiebedarfs antizipiert, indem sie auf das $[Ca^{2+}]_m$ -Signal wartet (Babcock und Hille, 1998).

Nicht nur in Mitochondrien existieren Na^+/Ca^{2+}-Austauscher. Laut einer neuen Studie von Halty-deLeon et al. (2018) ist **CALX** der Na^+/Ca^{2+}-Austauscher bei *Drosophila melanogaster*. Er kommt in den äußeren Dendriten von OSNs stark zum Ausdruck. CALX zeigt eine anomale Regulation im Vergleich zu einem homologen Na^+/Ca^{2+}-Austauscher (NCX) bei Säugetieren und kontrolliert den Kalziumgehalt von OSNs im Ruhezustand (Halty-deLeon et al., 2018). Er wird durch die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ inhibiert. Daher vermittelt CALX nur den Ca^{2+}-Ausfluss und

keinen Einstrom von Ca^{2+}. Es konnte herausgefunden werden, dass die CALX-Hemmung die Geruchsreaktion nicht beeinflusst. Jedoch sei eine Veränderung der Erholung des Kalziumspiegels nach dieser Reaktion zu verzeichnen gewesen (Halty-deLeon et al., 2018).

Die **mPTP** öffnet, wenn die mitochondriale Ca^{2+}-Ladung eine bestimmte Grenze überschreitet. Der Zyklophilin-Ligand *Zyklosporin A (CsA)* oder sein selektiveres 4MeVal-Analogon verhindert oder verzögert die mPTP-Öffnung (Babcock und Hille, 1998). Im geöffneten Zustand erlaubt die Pore den Durchgang von Ionen und kleinen Molekülen (≤1,5 kDa), was auf eine Porengröße von ca. 3 nm schließen lässt (Babcock und Hille, 1998). Unter bestimmten Umständen kann sich die mPTP vorübergehend in einem Modus mit niedriger Ionenleitfähigkeit öffnen, um selektivere Ionenflüsse zu ermöglichen (Ichas et al., 1997). Mögliche molekulare Korrelate der mPTP sind in Partikeln der mitochondrialen Innenmembran von Zoratti et al. (1995) nachgewiesen worden (Biasutto et al., 2016).

3.5.2 Zelluläre Ca^{2+}-Signale und Mitochondrien

In der Regel konzentrieren sich Lehrbuchbeschreibungen über den zellulären Ca^{2+}-Metabolismus auf Transporter und Ionenkanäle in der Plasmamembran und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) als Ca^{2+}-Speicher. Wechselwirkungen von ER und Mitochondrien sind bekannt (Hoppe, 2010). Wie aber durch White et al. (1996), Thayer et al. (1997) und Svichar et al. (1997) nachgewiesen wurde, spielen Mitochondrien in Neuronen eine wichtige Rolle beim Ca^{2+}-Management (s. auch Kapitel 3.4.2).

Aus Abb. 12 geht hervor, dass in einer Studie Ca_c (hier $[Ca^{2+}]_i$) optisch überwacht wurde, als Zellen durch KCl depolarisierten und durch elektrische Ströme oder durch Neurotransmitter einen Eintritt von Ca^{2+} induzierten (s. Abb. 12), (Babcock und Hille, 1998). Typischerweise stieg Ca_c während des Ca^{2+}-Eintritts auf viel höhere Werte an, wenn die mitochondriale Ca^{2+}-Aufnahme auf differente Weise gehemmt wurde (s. Abb. 12), (Babcock und Hille, 1998). Die Endstufen der Ca^{2+}-Rückbildung wurden jedoch beschleunigt erreicht (s. Abb. 12). Die Anwendung von CCCP oder FCCP, einige Sekunden nach der Ca^{2+}-Aufladung, führte zur Freisetzung einer großen Menge an Ca^{2+} in das Zytoplasma. Es wird vermutet, das diese Ca^{2+} aus den Mitochondrien stammen (Werth et al., 1994; Babcock und Hille, 1998).

Mitochondrien sind nur dann für die zelluläre Ca^{2+}-Speicherung von Bedeutung, wenn sie Ca^{2+} mit solchen Raten transportieren können, die mit denen anderer Ca^{2+}-Transportvorrichtungen in derselben Zelle vergleichbar sind oder diese übertreffen (Babcock und Hille, 1998).

3.6 Hypothesen

Im Folgenden werden die Hypothesen, die sich aus dem wissenschaftlichen Hintergrund ergeben haben, aufgelistet:

1. „Wenn die mitochondriale Funktion verändert wird, dann hat dies eine veränderte Antwort der olfaktorischen sensorischen Neuronen (OSNs) auf einen Duftreiz bei *Drosophila melanogaster* zur Folge."

    a) „Wenn die Aktivierung des mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporters (mCU) erfolgt, dann ist nicht mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen."

    b) „Wenn die Hemmung des mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporters (mCU) erfolgt, dann ist mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen."

    c) „Wenn die Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) erfolgt, dann ist mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen."

    d) „Wenn die Hemmung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) erfolgt, dann ist nicht mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen."

4 Material und Methode

Für die Präparation und die Durchführung der fluoreszenzoptischen Messungen sind verschiedene Materialen, experimentelle Bedingungen und Mess- und Untersuchungsmethoden notwendig. Diese werden im Folgenden genauer beschrieben.

4.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um ein prospektives, experimentelles, bivariates, kontrolliertes und offenes Studiendesign. Unmittelbar nach jeder Antennenpräparation folgte eine ex-vivo fluoreszenzoptische Messung mittels *Ca^{2+}-Imaging* unter Zugabe verschiedener pharmakologischer Substanzen. Als Kontrollgruppe dienten Präparationen, die mit *DMSO* und *VUUA1* (s. Kapitel 4.3.3 und 4.4.2) in Kontakt gebracht wurden. Die Ergebnisse für diese Substanzen sollten den Werten bereits bestehender Studien (s. z.B. Mukunda et al., 2014) entsprechen.

a) Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie eingeschlossen wurden Taufliegen, die folgende Voraussetzungen erfüllten:

- *Drosophila melanogaster* der Nr.1242 am Max-Planck-Institut (MPI) für chemische Ökologie (ID: GC6f, Orco Gal4; Typ: tg, x-Chromosom: +, 2nd Chromosom: GCaMP6f/Cy0, 3nd Chromosom: Orco-GAL4/ TM6B, Referenz: Chen (1013) Nature, Description: Expresses GCaMP6f in Orco expressing neurons, Quelle: 435x73 F. Miazzi, Ankunftsdatum: 28.10.2016)
- Geschlecht: weiblich
- Alter: 5 – 6 Tage
- phänotypisch gesunde Versuchstiere

Ausgeschlossen wurden Versuchstiere, die Minderwuchs oder Fehlbildungen zeigten.

b) Fallzahlplanung

Um für die Auswertung der gesammelten Daten verlässliche Ergebnisse zu erzielen, wurde eine Anzahl von sieben gelungenen Experimenten pro Messreihe (s. Tab. 3) gewählt. Als gelungen war ein Test einzuschätzen, wenn die Reaktionen der OSNs auf das Pharmakon plausibel erschienen und innerhalb einer Messreihe (s. Tab. 3) homogene Ergebnisse erzielt wurden.

Die Anzahl der Versuchstiere ist vorher nicht abschätzbar gewesen, da nicht jede Antennenpräparation erfolgreich war bzw. die Antennenpräparation während des *Ca^{2+}-Imagings* eine Antwort auf die applizierte Substanz zeigte.

c) Hauptprüfparameter/ Nebenprüfparameter

Ob eine Antennenpräparation für das *Ca^{2+}-Imaging* geeignet war, wurde mit Hilfe eines Blaufilters getestet, der in den Strahlengang am Präparationsmikroskop eingeschoben wurde. Hierbei musste ein grünes Aufleuchten der OSNs als Zeichen der Fluoreszenz (s. Kapitel 4.3.2) zu verzeichnen sein.

4.2 Experimentelle Bedingungen

a) Allgemeine Bedingungen

Bevor mit der eigentlichen Präparation und den fluoreszenzoptischen Experimenten begonnen werden kann, müssen optimale Umgebungsbedingen geschaffen werden. Hierzu ist der Raum zu verdunkeln. Lichttechnische Messungen waren für die Untersuchungen nicht notwendig. Unerlässlich für das Gelingen der Präparationen und des *Ca^{2+}-Imagings* ist die Bestimmung und das Abändern des *pH*-Wertes der *Ringer*-Lösung (s. Kapitel 4.3.3), die zum Bedecken der präparierten Antennen genutzt wird. Außerdem ist auf das exakte Herstellen verschiedener Stoffgemische nach definierten Vorgaben zu achten. Die Benutzung eines *pH*-Meters, der Umgang mit Pipetten und die Berechnung eines Stoffgemisches mit definierter Konzentration wird als bekannt vorausgesetzt.

Vor Beginn der Präparationen sind die Versuchsfliegen circa 10 Minuten mit Hilfe von Eis zu anästhesieren. Für die Antennenpräparation und den anschließenden fluoreszenz-optischen Test ist eine Zeit von circa einer halben Stunde einzuplanen. Das *Ca^{2+}-Imaging* wird in einer separaten, abgedunkelten, stoßgedämpften und geschlossenen Prüfkammer durchgeführt.

b) Geräte und Hilfsmittel

Die zur Anwendung gekommenen Materialien und Hilfsmittel für die Antennenpräparation der Fruchtfliege und für die Durchführung der fluoreszenzoptischen Versuche sind nachfolgenden Tab. 1 und Tab. 2 zu entnehmen. Beispielbilder zu den verwendeten Materialien und Geräten für die Durchführung der Antennenpräparation sind in Kapitel 4.4.1 und für das *Ca^{2+}-Imaging* in Kapitel 4.4.2 zu finden.

Tab. 1: Materialien und Hilfsmittel für die Antennenpräparation der Fruchtfliege (Anlehnung an Mukunda et al., 2014)

Geräte:
- *pH*-Meter 766 *Calimatic* der Fa. KNICK ELEKTRONISCHE MESSGERÄTE GmbH & Co. KG - elektronisches Stereomikroskop (Nr. 3918000951) der Fa. CARL ZEISS MICRO IMAGING GmbH
Biologisches Material:
- Antennen von *Drosophila melanogaster* (s. Kapitel 4.1 a))
Chemikalien:
- *Drosophila-Ringer*-Lösung (s. Kapitel 4.3.3)
Hilfsmittel:
- Gummischlauch Fa. EPPENDORF RESEARCH® PLUS - Transportplastikröhrchen der Fa. EPPENDORF RESEARCH® PLUS - Styroporbehälter mit Eiswürfeln - versch. Pinzetten Marke DUMONT Schweiz der Fa. FINE SCIENCE TOOLS GmbH - Einwegspritze *Sterican* Größe 20 der Fa. B. BRAUN MELSUNGEN AG - Federschere (Nr. 15000-00) der Fa. FINE SCIENCE TOOLS GmbH - diverse Pipetten der Fa. EPPENDORF RESEARCH® PLUS - diverse Pipettenaufsätze der Fa. STARLAB GmbH - Zwei-Komponenten-Kleber der Fa. DOW CORNING INC und Zahnstocher - mit Zwei-Komponenten-Silikon *Elastomer* der Fa. DOW CORNING INC. gefüllte Petrischale (engl. Cellculture dishes) - sterile Mulltupfer *Askina* der Fa. B. BRAUN MELSUNGEN AG, Papiertaschentücher, destilliertes Wasser

Tab. 2: Materialien und Hilfsmittel für fluoreszenzoptische Versuche (Anlehnung an Mukunda et al., 2014)

Geräte:
- *pH*-Meter 766 *Calimatic* der Fa. KNICK ELEKTRONISCHE MESSGERÄTE GmbH & Co. KG - Hochleistungsvermischer *Vortex-Genie 2* der Fa. SCIENTIFIC INDUSTRIES INC. - *Polychrome V* (Nr.: 1101-0-631) der Fa. TILL PHOTONICS GmbH - *Imaging Control Unit* (Nr.: 1012284) der Fa. TILL PHOTONICS GmbH - *Real Time Imaging Software TILLvisION* der Fa. TILL PHOTONICS GmbH - Rechner und Monitor (Nr.: 2405FPW24) der Fa. DELL TECHNOLOGIES INC. - Mikroskop *Axioskop FS 451406* der Fa. CARL ZEISS MICROSCOPY GmbH
Biologisches Material:
- Nutzung der zuvor präparierten Antennen (s. Tab. 1)
Chemikalien (Erklärungen sind Kapitel 4.3.3 zu entnehmen!)**:**
- Drosophila-*Ringer*-Lösung - *DMSO*, Konzentration: 100 µM - *VUAA1*, Konzentration: 100 µM - *Spermin*, Konzentration:10µM - *RU360*, Konzentration: 5 µM - *Auranofin*, Konzentration: 25 µM - *ABT-737*, Konzentration: 100 nM
Hilfsmittel:
- Reaktionsgefäße (*Eppendorf Tube*) der Fa. EPPENDORF RESEARCH® PLUS - diverse Pipetten der Fa. EPPENDORF RESEARCH® PLUS - diverse Pipettenaufsätze der Fa. STARLAB GMBH

4.3 Mess- und Untersuchungsmethoden

4.3.1 Antennenpräparation bei *Drosophila melanogaster*

Zur Verdeutlichung der verschiedenen Arbeitsschritte bei der Präparation der Antennen der Fruchtfliege, erfolgt die Beschreibung in Anlehnung an der am MPI für chemische Ökologie in Jena (Mukunda et al., 2014) entwickelten Methode.

Das Fliegenzuchtgefäß (s. Abb. 14C) wird aus einem Brutschrank (s. Abb. 13) genommen. In ihm herrschen kontinuierliche Umgebungsbedingungen (Temperatur: 25°C, Lichtdauer: 12 h, Futter: Maismehl; (Mukunda et al., 2014)).

Abb. 13: Brutschrank der Fa. SNIJDERS SCIENTIFIC B.V.
(Temperatur: 25°C, Lichtdauer: 12 h, 70 % gentechn. veränderte Fliegen)

Die Fliegenentnahme aus dem Zuchtgefäß erfolgt mit einem Schlauch (s. Abb. 14D). Die entnommenen Fliegen werden in ein Transportgefäß (s. Abb. 14B) gegeben und mit Hilfe von Eis anästhesiert. Die Betäubung mit Eis sollte 20 Minuten nicht überschreiten, um eine gute Fähigkeit zur Geruchswahrnehmung zu gewährleisten (Mukunda et al., 2014).

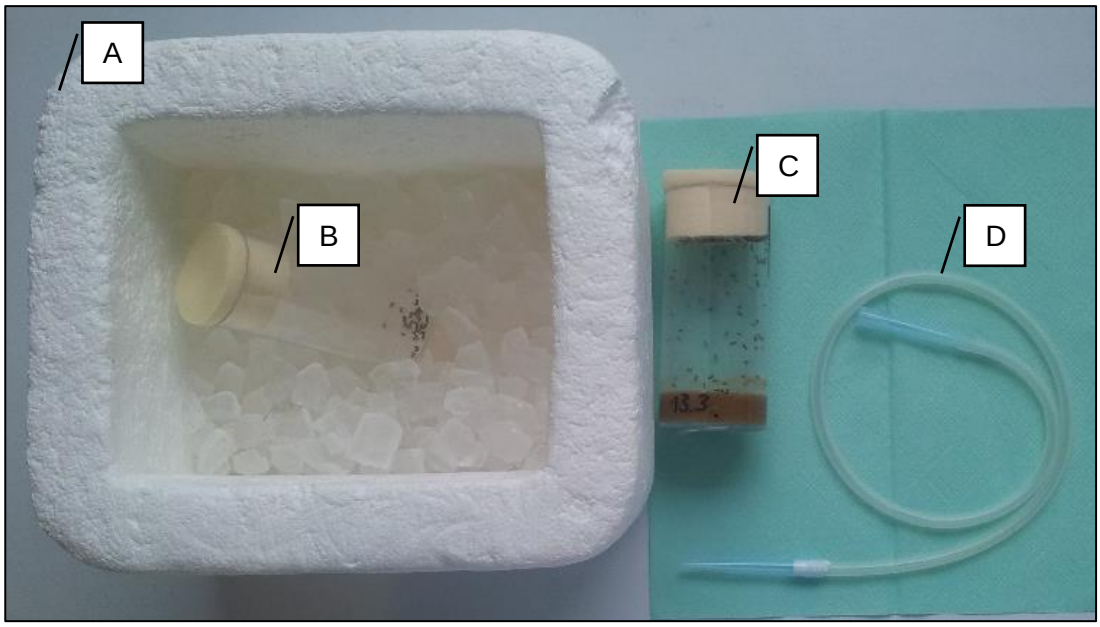

Abb. 14: Fliegenentnahme aus Zuchtgefäß und Umsetzung in Transportplastikröhrchen
A) mit Eis gefüllter Styroporbehälter
B) Transportplastikröhrchen mit entnommenen Fliegen in Eis
C) mit Futter u. Fliegen gefülltes Fliegenzuchtgefäß
D) Absaugschlauch

Der Präparationsplatz ist im Vorfeld vorzubereiten, sodass alle erforderlichen Materialen (s. Kapitel 4.2, Tab. 1) in greifbarer Nähe sind.

Abb. 15: Vorbereitung des Präparationsplatzes (Materialen s. Tab. 1)
A) Röhrchen (orange und grün) mit Zweikomponentenkleber
B) *Ringer*-Lösung
C) Einwegspritze, D) diverse Pinzetten, E) Federschere, F) Pipette

Anschließend wird die betäubte Fliege mit der Pinzette aus dem Transportröhrchen genommen; auf die runde, mit Silikon ausgekleidete Plastikschale (s. Abb. 16B) gelegt und unter dem Mikroskop (s. Abb. 16A) mit 11,5-facher Vergrößerung betrachtet.

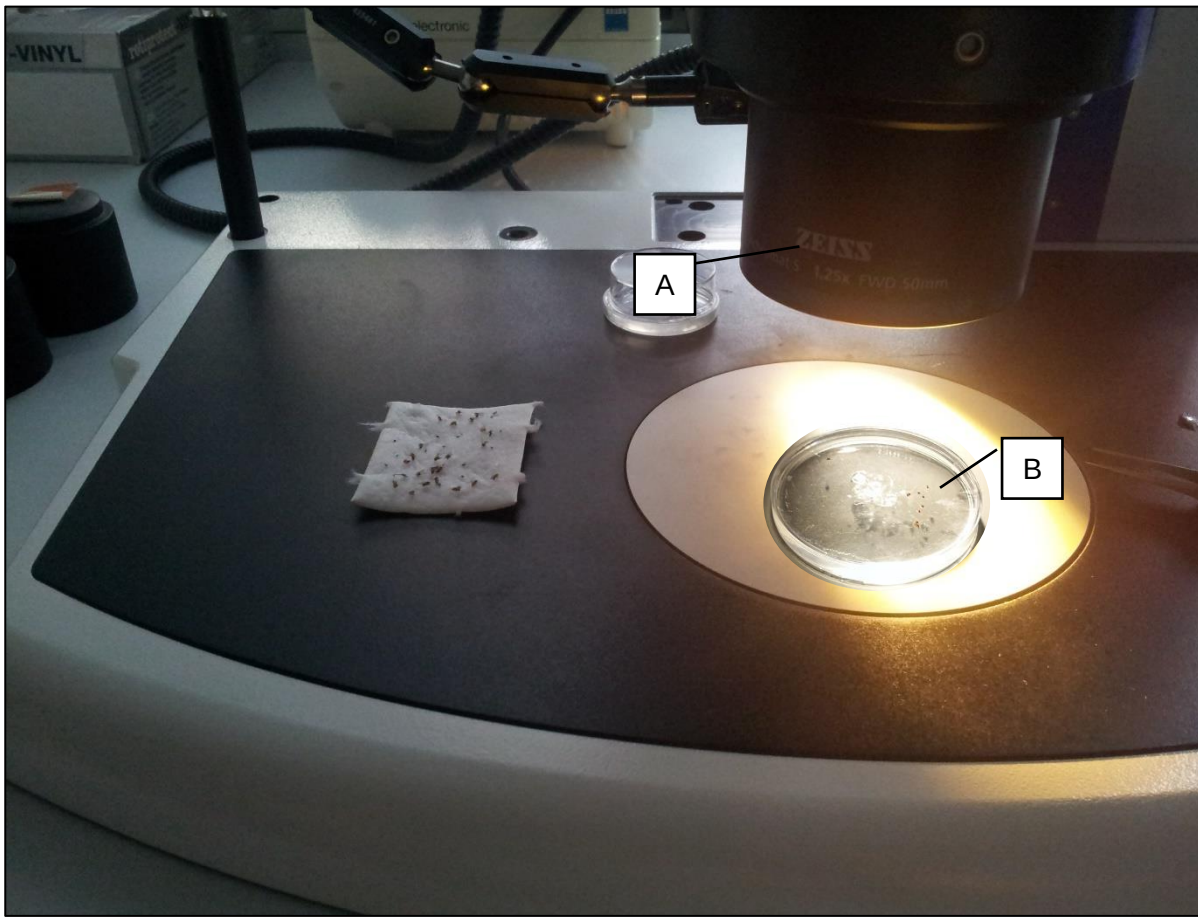

Abb. 16: Arbeitsplatz am Präpariermikroskop (A)
Betäubte Fliege wird auf einer runden, mit Silikon ausgekleideten Plastikschale (B) positioniert.

Danach wird der Fliegenkörper mit einer Pinzette festgehalten und der Kopf mit Hilfe der Kanüle einer Spritze (s. Abb. 17B) abgetrennt. Der abgetrennte Kopf wird mittig positioniert und auf die Antennen wird mit 33,5-facher Vergrößerung fokussiert. Mit einer Pinzette wird der Kopf festgehalten und mit einer zweiten Pinzette werden die Antennen vom Kopf abgenommen (s. Abb. 17C). Darauffolgend werden sie mit *Ringer*-Lösung bedeckt (s. Abb. 17C). Anschließend erfolgt das Anmischen eines Zweikomponentenklebers in der Nähe, der mit *Ringer*-Lösung bedeckten Antennen. Wenn der Kleber beginnt fest zu werden, dann werden die Antennen aus der *Ringer*-Lösung genommen (s. Abb. 17C) und aufrecht (s. Abb. 18A) mit Hilfe einer Pinzette in den Kleber gestellt. Nach ca. 20 Sekunden, in denen der Kleber aushärtet, erfolgt das Bedecken der eingeklebten Antennen mit *Ringer*-Lösung. Mit Hilfe einer speziellen Federschere werden die Antennen in einem Bereich kurz über der Arista (s. Abb. 18B/C) abgeschnitten.

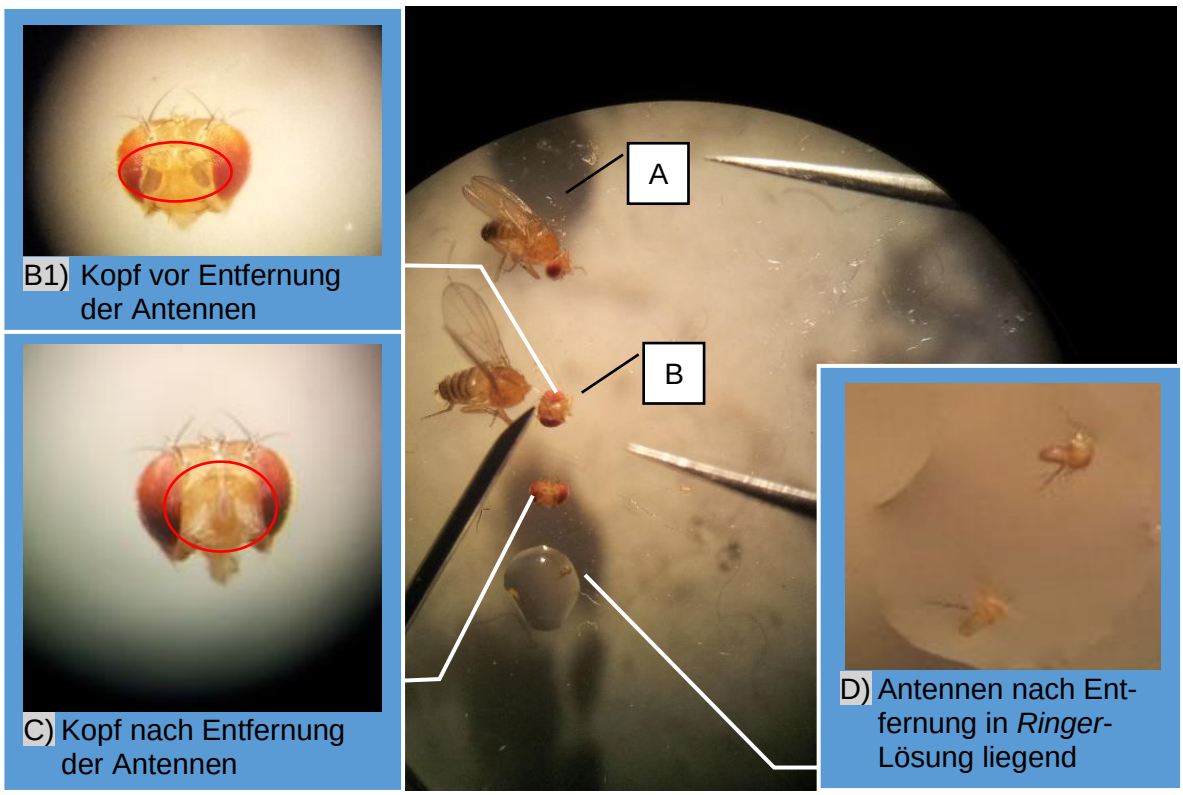

Abb. 17: Methode zur Entfernung der Antennen bei der Fruchtfliege
Bei der betäubten Fruchtfliege (A) wird der Kopf mit der Kanüle einer Spritze entfernt (B). B1 zeigt die Antennen (rote Markierung), die sich noch am abgetrennten Kopf befinden. Die Antennen werden mit einer Pinzette vom Kopf abgetrennt (C, rote Markierung) und anschließend mit *Ringer*-Lösung bedeckt (D).

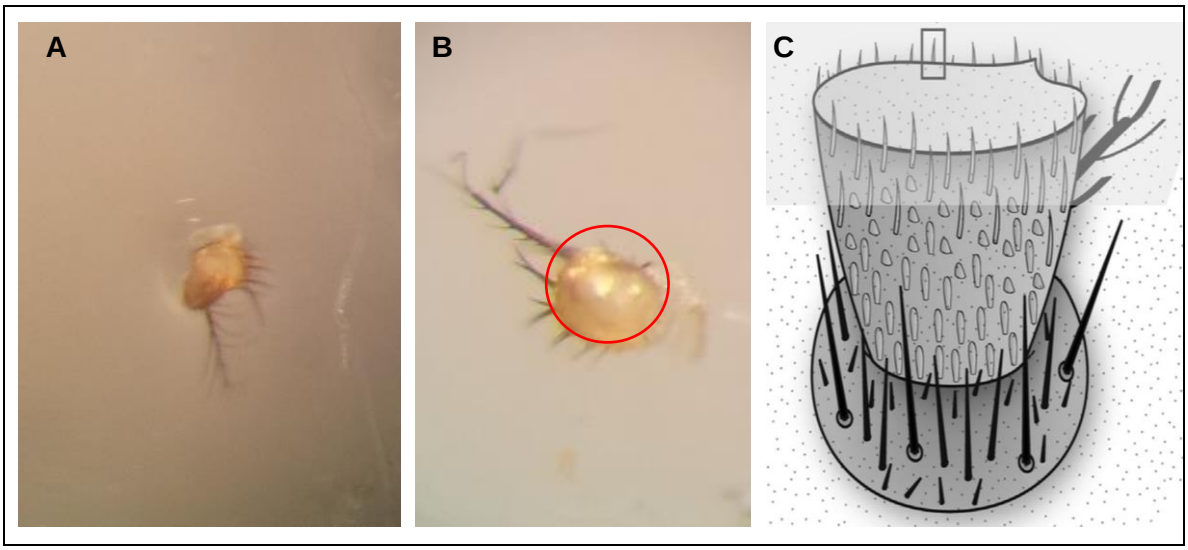

Abb. 18: Schneidevorgang bei einer einzelnen Antenne von *Drosophila melanogaster*
A) In Zweikomponentenkleber befindliche Antenne.
B) Eingeklebte Antenne, die über Arista abgeschnitten wurde (rote Markierung).
C) Grafische Darstellung der aufgeschnittenen Antenne (Mukunda et al., 2014).

Direkt nach dem Schneiden sollte so wenig Licht wie möglich verwendet werden, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe (s. Kapitel 4.3.2) in der Antenne zu vermeiden.

4.3.2 Ca^{2+}-Imaging

Wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt wurde, beruht das Wissen über *Drosophila melanogaster* auf der Arbeit von mehr als 100 Jahren Forschung. Insbesondere die Erforschung der genetischen Grundlagen der Vererbung und das leichte Hervorrufen von phänotypischen Mutationen waren von großem Vorteil (Jennings, 2011). Im Laufe der Zeit kam es zur Entwicklung neuer Instrumente, die die Untersuchung der genetischen und physiologischen Grundlagen der Olfaktorik sowie der Erforschung ihrer Bedeutung ermöglichten (Hansson und Stensmyr, 2011). Ein großer Fortschritt gelang mit der Entdeckung von *P-Element-Transposons-DNA-Teilen*. Diese können ihre Position innerhalb des Genoms verändern (Engels, 1983). Zusammen mit dem binären Expressionssystem *GAL4/UAS* der Hefe (Perrimon et al., 1999), wobei UAS für „Stromaufwärts-Aktivierungs-Sequenz“ (upstream-activation-sequence) steht, konnte eine Insertion eines exogenen DNA-Stücks in das Fliegengenom ermöglicht werden und verlieh dessen Vielseitigkeit Ausdruck (Duffy, 2002).

Die jüngste Entwicklung von genetisch kodierten Fluoreszenzindikatoren ermöglichte dann die Expression von Proteinen, die als Reporter der Zellaktivität in spezifischen Subpopulationen von Neuronen fungieren. Eines der bekanntesten und derzeit verwendeten Proteine ist **GCaMP** (Nakai et al., 2001). Es zeigt den intrazellulären Kalziumspiegel an und besteht aus einem zirkulär versetzten grün-fluoreszierenden Protein (cpGFP). Dieses ist mit CaM und der M13-Domäne einer Myosinketten-Kinase verbunden (Nakai et al., 2001). GCaMP zeigt bei einer niedrigen $[Ca^{2+}]_i$ eine geringe Fluoreszenzintensität (s. Abb. 19B) auf Basisniveau. Nach einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ während der Stimulation neuronaler Aktivität, ist jedoch eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität (s. Abb. 19B) zu verzeichnen (Shigekazu et al., 2011). Im Laufe der Zeit wurde die GCaMP-Struktur stetig verfeinert, bis die Möglichkeit bestand, einzelne Aktionspotentiale zu erkennen (Chen et al., 2013). Zusammen mit der Überwachung der Ca^{2+}-Pegel wurden Fluoreszenzindikatoren verwendet, um Änderungen des Membranpotentials und der $[Ca^{2+}]_i$ in einer Reihe von Metaboliten einschließlich cAMP, IP_3 und Stickstoffmonoxid zu messen (Newman et al., 2011). Insbesondere Epac1-cAMPs sind Sensoren zur Messung der Konzentration von cAMP (Nikolaev et al., 2004). Sie sollen nicht genauer betrachtet werden, da sie in dieser Masterarbeit nicht zum Einsatz kommen.

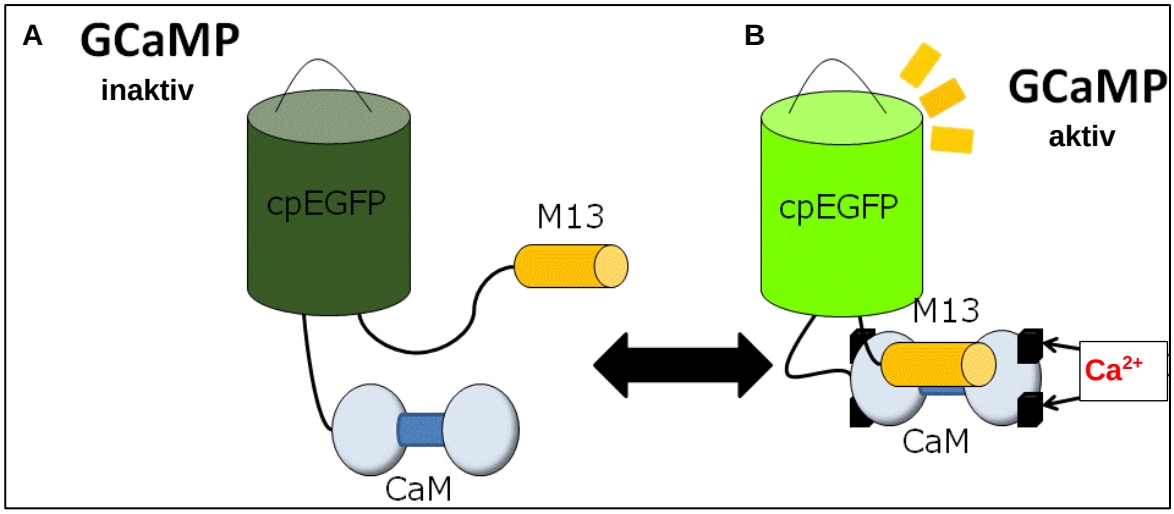

Abb. 19: Aktivierung des Kalziumindikators „GCaMP“
GCaMP besteht aus einem zirkular versetzten grün-fluoreszierenden Protein (cpGFP), einem Calmodulinmolekül (CaM) und dem M13-Fragment der Myosin-Light-Kettenkinase (M13). (A) Ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration niedrig, so weist das cpGFP bei Anregung mit blauem Licht (~475 nm) ein niedriges Fluoreszenzintensitätsniveau auf. (B) Hohe intrazelluläre Ca^{2+}-Spiegel induzieren die Bindung von Ca^{2+} an CaM und CaM bindet an M13. Dies löst eine reversible Konformationsänderung des Proteins aus, was zu einer erhöhten Fluoreszenzemission führt.

(Anlehnung an Shigekazu et al., 2011)

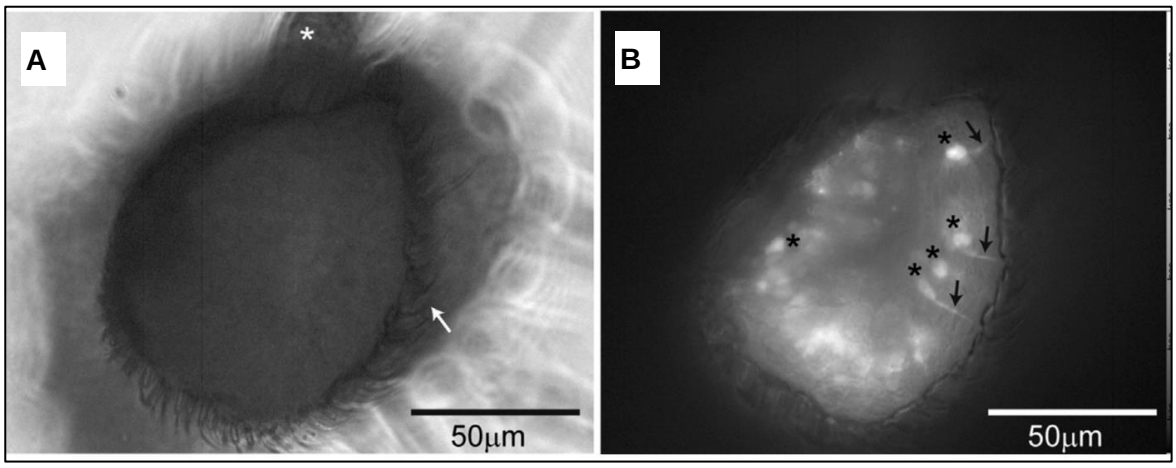

Abb. 20: *Drosophila*-Antennenpräparation
A) Es ist die Draufsicht auf ein vorbereitetes Antennenpräparat, gemäß Abb. 18, für das *Ca^{2+}-Imaging* im Durchlicht zu erkennen. Die Arista wird durch das Sternchen (weiß) und die Sensilla sind am Rand des Ausschnitts durch einen Pfeil gekennzeichnet.
B) GCaMP-Anregung während des *Ca^{2+}-Imagings* durch Licht der Wellenlänge von ca. 475 nm bei der Antennenpräparation aus (A). Einzelne neuronale Zellkörper sind durch Sterne gekennzeichnet und die Fluoreszenzprozesse in Richtung der Dendriten in den Sensilla (s. Pfeile) werden sichtbar.

(Anlehnung an Mukunda et al., 2014)

Ausgehend von dem zuvor beschriebenen GCaMP-Protein, kann man dieses durch Lichtanregung (Wellenlänge 475 nm) (Shigekazu et al., 2011) zur Fluoreszenz bringen, was einen Rückschluss auf die Ca^{2+}-Konzentration erlaubt. ***Ca^{2+}-Imaging*** ermöglicht eine direkte Messung des dynamischen Kalziumflusses in lebenden Neuronen (s. Abb. 20B) und neuro-

nalem Gewebe (Stosiek et al., 2003). Neben der Anwendung mit Hilfe von genetisch codierten Ca^{2+}-Indikatoren (GECI) ist es auch bei chemischen Indikatoren anwendbar (Nguyen et al., 2016). Auf den Umstand, dass durch *Ca^{2+}-Imaging* auch Prozesse im lebenden Gehirn von *Drosophila melanogaster* beobachtet werden können (Stosiek et al., 2003), soll nicht weiter eingegangen werden. Unabhängig von der Art des verwendeten Ca^{2+}-Indikators ist das Abbildungsverfahren im Allgemeinen sehr ähnlich. Die isolierten Zellen, die mit einem Indikator beladen werden oder diese im Fall von GECI exprimieren, können mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit einer CCD-Kamera erfasst werden. Konfokale und Zwei-Photonen-Mikroskope bieten ein verbessertes Auflösungsvermögen. Die aufgenommenen Bilder werden analysiert, indem Fluoreszenzintensitätsänderungen (s. Abb. 21) für eine einzelne Wellenlänge oder zwei Wellenlängen gemessen und als Verhältnis ausgedrückt werden (Pégard et al., 2016).

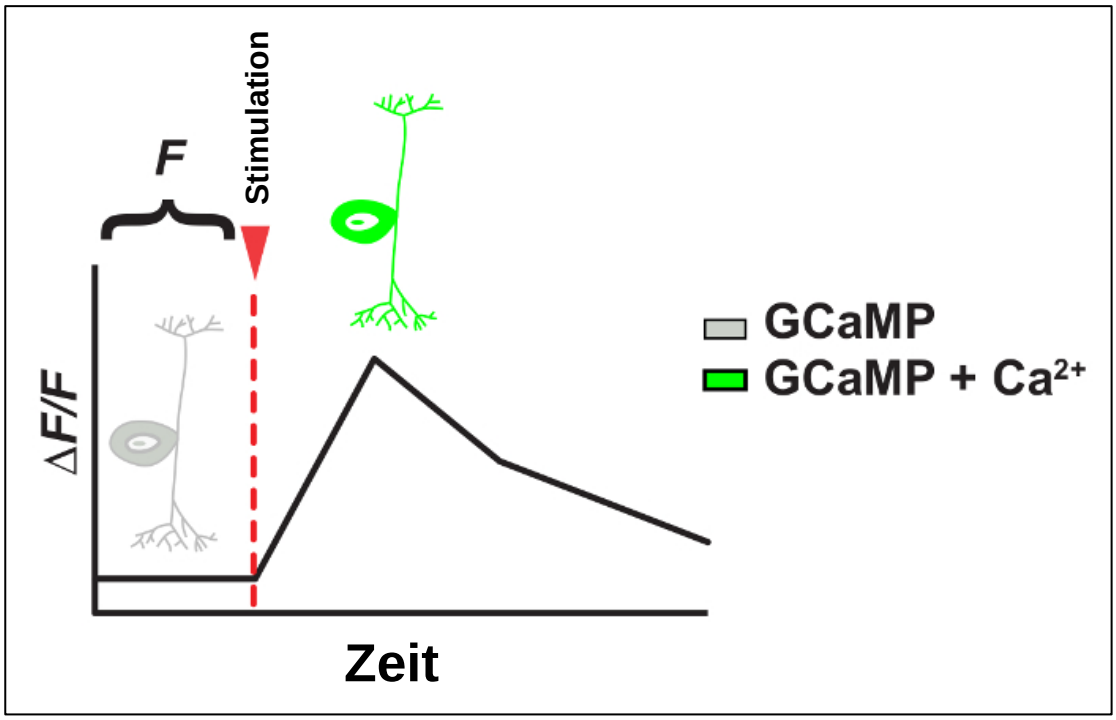

Abb. 21: Grundprinzip der *Ca^{2+}-Imaging*-Technik bei GCaMP
GCaMP wird in Gal4-markierten Zellen genetisch exprimiert und fluoresziert vor der neuronalen Stimulation mit geringer Intensität (s. Abb. 19). Die Anwendung eines Stimulus löst ein Aktionspotential im Neuron aus und verursacht den Einstrom von Ca^{2+}. Sobald GCaMP an Ca^{2+} gebunden ist, unterliegt es einer Konformationsänderung, was zu einer erhöhten Fluoreszenz (ΔF) führt, die sich mit der Zeit ändert. Die Basislinienfluoreszenz (F) bezieht sich auf die Fluoreszenzsignalintensität vor der Stimulation.
(Anlehnung an Yew, 2016)

4.3.3 Verwendete Chemikalien

a) *Ringer*-Lösung

Als *Ringer*-Lösungen werden wässrige Infusionspräparate bezeichnet; die Natrium, Kalium, Chlorid und Kalzium enthalten und somit für den Metabolismus von Zellen wichtig sind (Lockwood, 1961). Sie zeichnen sich durch eine vergleichbare Zusammensetzung wie das Blutplasma und der extrazellulären Flüssigkeit aus (Baskett, 2003). Daher werden sie für die Zufuhr von Elektrolyten und Wasser, als Flüssigkeitsersatz, als Trägerlösung für Medikamente in der Human- und Tiermedizin verwendet (Baskett, 2003). Die Zusammensetzung von etwa 100 physiologischen *Ringer*-Lösungen zur Verwendung bei Fischen, Amphibien, Säugetieren, Vögeln, Krustentieren, Krebstieren (van Harreveld, 1936), Insekten und Weichtieren ist bekannt (Lockwood, 1961).

In der vorliegenden Arbeit wird sie als *Drosophila-Ringer*-Lösung bezeichnet und enthält folgende Inhaltsstoffe: 5 mM $C_8H_{18}N_2O_4S$, 130 mM NaCl, 5 mM KCl,
2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 36 mM Saccharose;
pH-Wert = 7,3 (Mukunda et al., 2014)

b) Dimethylsulfoxid (*DMSO*)

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist eine sehr einfache Verbindung (C_2H_6OS) und ist in Form einer farb- und geruchlosen Flüssigkeit oder als farblose Kristalle verfügbar (Brayton, 1986). Es ist mit Wasser mischbar und soll in einem Glasbehältnis, dicht verschlossen und vor Lichteinfall geschützt gelagert werden. Ein Kontakt mit den Augen und mit der Haut ist zu vermeiden (David, 1972). *DMSO* ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Antiphlogistika, der unteranderem in der Medizin zur äußerlichen Anwendung bei Schmerzen, Entzündungen und Schwellungen eingesetzt wird (Brayton, 1986). *DMSO* gilt als eines der stärksten organischen Lösungsmittel für therapeutische und toxische Wirkstoffe, die nicht in Wasser löslich sind. Organische Materialien, einschließlich vieler Polymere, und viele anorganische Salze können gelöst werden (David, 1972). *DMSO* hat eine sehr starke Affinität für Wasser und seine systemische Toxizität wird als gering eingestuft (Brayton, 1986).

Für die vorliegende Masterarbeit wurde es aufgrund der zuvor beschriebenen Eigenschaften eingesetzt und da es die Aufnahme pharmazeutischer Wirkstoffe (s. Tab. 2 und. Tab. 3) in die Haut bzw. in Gewebe erhöht (Brayton, 1986). Die Stoffmengenkonzentration (c) von 100 µM wurde nach Mukunda et al. (2014) für die Kontrollgruppe ausgewählt. *DMSO* kam als Lösungsmittel für *Spermin, RU360*, *Auranofin* und *ABT-737* zum Einsatz.

c) 2-(4-Ethyl-5-(Pyridin-3-yl)-4H-1,2,4-Triazol-3-Ylthio)-N-(4-Ethylphenyl)-Acetamid (*VUAA1*)

VUAA1 ist eine chemische Verbindung, die den Geruchssinn eines Insekts überschwellig erregt (Jones et al., 2011). Es handelt sich hierbei um einen allosterischen Agonist des nichtkonventionellen Korezeptors-Orco bei Insekten (s. Kapitel 3.3), der nicht als natürliches Molekül vorkommt (Corcoran et al., 2018). *VUAA1* kann sowohl heteromere, als auch homomere Orco-Untereinheiten aktivieren (Kumar et al., 2013). Darüber hinaus gilt es als ein erstklassiger Agonist für die weitere Erforschung der Insekten-OR-Signalgebung. Entdeckt wurde es an der Vanderbilt Universität in den USA. Auch der mögliche Einsatz als neuartiges Schädlingsbekämpfungsinstrument wird angestrebt (Corcoran et al., 2018).

Für die vorliegende Masterarbeit wurde die Stoffmengenkonzentration (c) von 100 µM nach Mukunda et al. (2014) ausgewählt.

d) Spermin

Spermin ist ein biogenes Polyamin, das aus Spermidin gebildet wird. Es hat die chemische Formel $C_{10}H_{26}N_4$ und ist in einer Vielzahl von Organismen und Geweben gefunden worden (Hoppe, 2010). Es ist ein wesentlicher Wachstumsfaktor in einigen Bakterien (Hoppe, 2010). Der mitochondriale Kalziumuniporter (mCU) soll an oxidativem Stress, Apoptose und vielen neurologischen Erkrankungen beteiligt sein. *Spermin* ist in der Lage den mCU zu aktivieren (Wang et al., 2015).

Für die vorliegende Masterarbeit wurde die Stoffmengenkonzentration (c) von 10 µM nach Xie et al. (2017) ausgewählt.

e) RU360

RU360 ist ein zellpermeabler Sauerstoffbrücken enthaltender und zweikerniger Ruthenium-Amin-Komplex mit der chemischen Formel $C_2H_{26}Cl_3N_8O_5Ru_2$. Es wurde gezeigt, dass er mit hoher Affinität an Mitochondrien bindet (Wang et al., 2015). Die Kalziumaufnahme in isolierten Mitochondrien aus mit *RU360* behandelten Ventrikeln des Herzens war teilweise vermindert. Dies deutete auf eine Wechselwirkung dieser Verbindung mit dem mCU hin. Es wurde gezeigt, dass die Verabreichung von *RU360* teilweise die Kalziumaufnahme hemmt und die Depolarisation der Mitochondrien durch die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) verhindert (García-Rivas et al., 2006).

Für die vorliegende Masterarbeit wurde die Stoffmengenkonzentration (c) von 5 µM nach Xie et al. (2017) ausgewählt.

f) Auranofin

Auranofin ist eine oral einnehmbare, lipophile Organogoldverbindung ($C_{20}H_{34}AuO_9PS$), die in der Humanmedizin zur Behandlung von rheumatoider Arthritis eingesetzt wird (Varghese und Büsselberg, 2014). Es interagiert mit dem Selenocysteinrest innerhalb der redoxaktiven Domäne der mitochondrialen Thioredoxinreduktase (TrxR) (Imming, 2014). Hierdurch wird die Aktivität von TrxR blockiert (Gonzalez et al., 2016). Infolgedessen induziert dieses Mittel mitochondrialen oxidativen Stress, der zur Induktion von Apoptose führt. TrxR wird in vielen Krebszelltypen überexprimiert, hemmt die Apoptose, fördert das Zellwachstum und sichert das Zellüberleben (Kaidery et al., 2013). Aus diesen Gründen spielt *Auranofin* auch eine wichtige Rolle in der Krebstherapie (Varghese und Büsselberg, 2014). *Auranofin* induziert einen konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen (Varghese und Büsselberg, 2014). Somit ist es ist ein effizienter Aktivator der mPTP (Bachmann et al., 2018).

Für die vorliegende Masterarbeit wurde die Stoffmengenkonzentration (c) von 25 µM nach Varghese und Büsselberg (2014) ausgewählt.

g) ABT-737

ABT-737 ist ein niedermolekularer Inhibitor der mPTP mit der chemischen Formel $C_{42}H_{45}ClN_6O_5S_2$ (Kline et al., 2007). Die mitochondriale Membranpermeabilisierung (MMP) spielt eine zentrale Rolle bei der Apoptose von kernhaltigen Zellen. In zahlreichen Apoptoseszenarien erfolgt MMP durch die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP), die durch intrazelluläre Ca^{2+}-Überladung ausgelöst wird (Gyulkhandanyan et al., 2015). *ABT-737* wird derzeit auch zur Behandlung von Lymphomen, Lungenkrebs (Suh et al., 2013), und akuter myeloische Leukämie (Konopleva et al., 2006) eingesetzt. *Zyklosporin A*, *Sanglifehrin A* und *Curcumin* zeigen ähnliche Ergebnisse der Zytotoxizität gegen Melanomzellen (Yu et al., 2015).

Für die vorliegende Masterarbeit wurde die Stoffmengenkonzentration (c) von 100 nM nach Yu et al. (2015) ausgewählt.

4.4 Durchführung

Bei der Durchführung der Studie ging es um das Erwirken einer Hemmung und Aktivierung des mitochondrialen Kalziumuniporters (mCU) und der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) bei OSNs in einer Antennenpräparation von *Drosophila melanogaster* .

4.4.1 Durchführung der Antennenpräparation

Die Antennenpräparation erfolgte analog zu der in Kapitel 4.3.1 erläuterten Methode und mit den im Kapitel 4.2 erwähnten Geräten und Hilfsmitteln. Die eingeklebten Antennen wurden mit 200 µl *Ringer*-Lösung bedeckt.

4.4.2 Durchführung Ca^{2+}-Imaging

Anschließend an die Antennenpräparation erfolgte die Durchführung des *Ca^{2+}-Imagings*. Hierfür geschah der Übergang zum hochauflösenden Mikroskop, wie in Abb. 22 gezeigt (s. auch Tab. 2 in Kapitel 4.2), dass mit einem Kamerasystem und einem PC verbunden war.

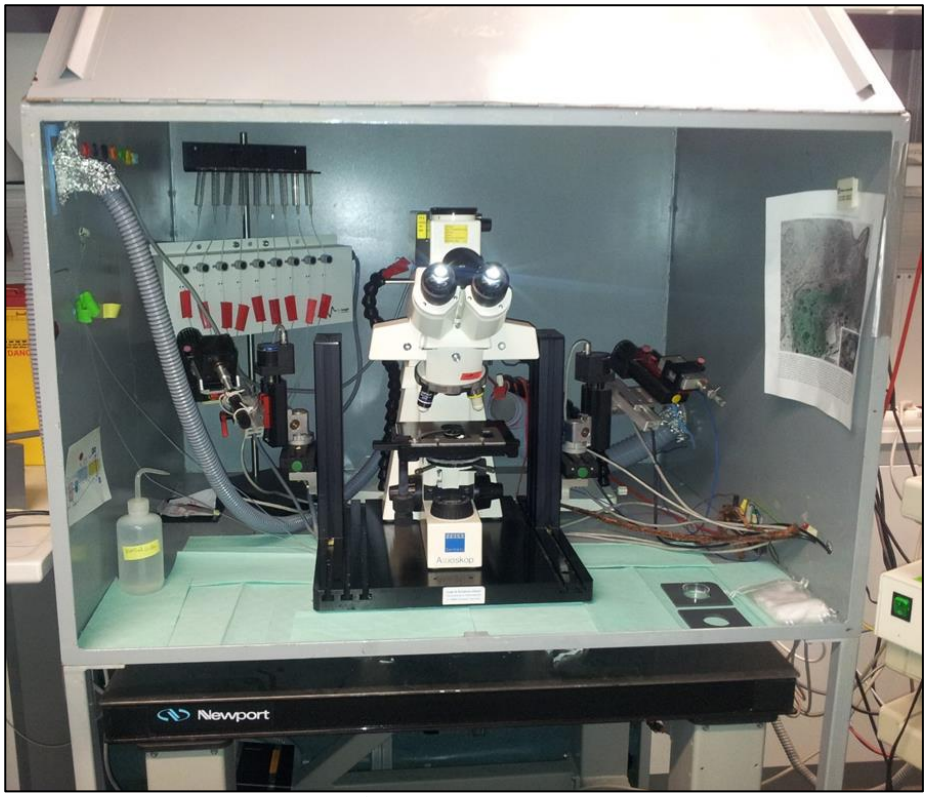

Abb. 22: Messplatz für *Ca^{2+}-Imaging*
Gezeigt wird das hochauflösende Mikroskop *Axioskop FS 451406* der Fa. CARL ZEISS MICROSCOPY GmbH, welches mit einer *Imaging Control Unit* der Fa. TILL PHOTONICS GmbH und einem PC verbunden war.

Unter dem Objektiv des Mikroskops (s. Abb. 22) wurde die Antennenpräparation mittig positioniert und unter Zuhilfenahme von indirekter rückwärtiger Beleuchtung (Nutzung von 10- und 60-facher Vergrößerung) scharfgestellt. Des Weiteren sind weitere 600 µl *Ringer*-Lösung um die Antenne herum auf dem Schälchen gleichmäßig verteilt worden. Danach erfolgte das Einschieben eines Blaufilters in den Strahlengang, der Beobachtungsstrahlengang wurde über die Kamera auskoppelt und die rückwärtige Beleuchtung ausgeschaltet. Mithilfe des PC-Programms *Till Vision* der Fa. TILL PHOTONICS GmbH ist eine Antenne derartig justiert worden, dass möglichst viele OSNs scharf zuerkennen waren (s. Abb. 23). In Abb. 23 ist eine Antennenpräparation zu sehen, die für die Kontrollgruppe (s. Tab. 3) zur Anwendung kam. Sie zeigt OSNs, die in unterschiedlicher Intensität fluoreszieren.

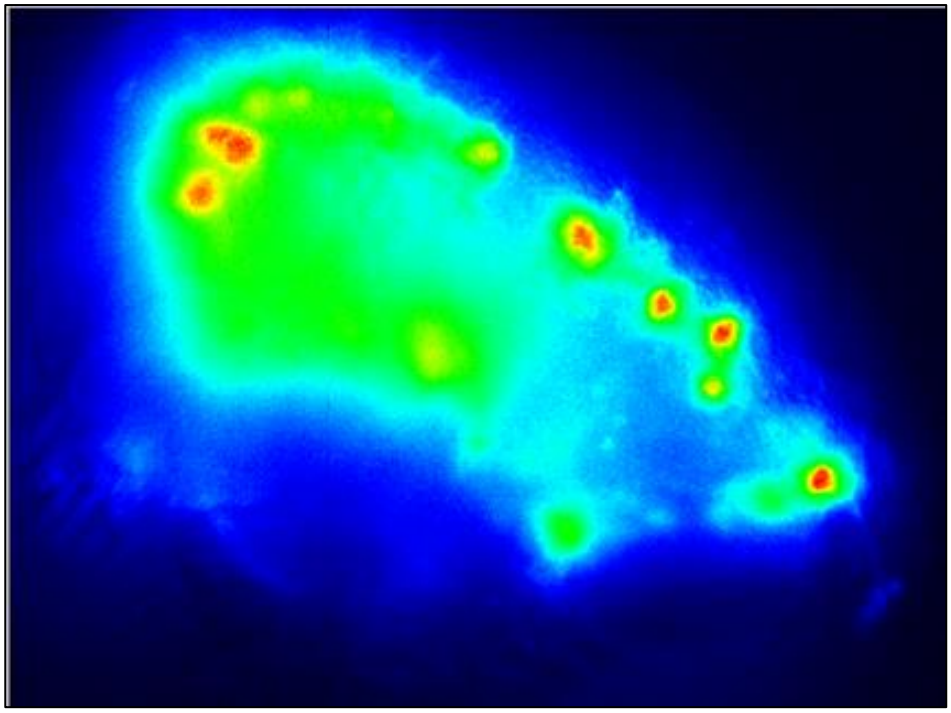

Abb. 23: Scharfgestellte OSNs in einer Antennenpräparation zu Beginn des *Ca^{2+}-Imaging*s
Die unterschiedliche Färbung zeigt die Intensität der Ca^{2+}-Fluoreszenz (von „Rot = Hoch“ bis „Blau = Gering“) an, die die OSNs zu Beginn der Messungen zeigten.

In einem abgedunkelten Prüfraum (s. Abb. 22) wurde die Untersuchung auf Grundlage eines vorgegebenen Messprotokolls des PC-Programmes (s. Tab. 2) durchgeführt. Die Anregung des GCaMP-Proteins in den OSNs erfolgte mit Licht der Wellenlänge von 475 nm und dauerte pro Messzyklus 5 s. Das emittierte Licht wurde mit einen dichroitischen Spiegel getrennt und mit einem Langpassfilter gefiltert. Nach dem 50. Messzyklus, d.h. nach 245 s Testlaufzeit (s. Abb. 26), erfolgte die Applikation von 100 µl der ersten Testsubstanz (s. Tab. 3). Die Testlösung musste mit Hilfe einer Pipette zentral über der Antenne verabreicht werden. Hierbei war auf eine vorsichtige Vorgehensweise zu achten. Nach weiteren 20 Messzyklen geschah nach dem 70. Messzyklus (s. Abb. 26), d.h. nach 345 s Testlaufzeit, die Verabreichung von 100 µl der zweiten Testsubstanz *VUAA1* (s. Tab. 3) in gleicher Art und Weise.

Tab. 3: Verabreichung differenter Testsubstanzen im Hinblick auf die jeweilige Messreihe

	1. Substanzgabe nach dem 50. Messzyklus nach 245 s	**2. Substanzgabe nach dem 70. Messzyklus nach 345 s**
1. Messreihe für die Kontrollgruppe	*DMSO* (100 µM)[1]	*VUAA1* (100 µM)[2]
2. Messreihe für den mCU-Aktivator	*Spermin* (10 µM)[3]	
3. Messreihe für den mCU-Inhibitor	*RU360* (5 µM)[4]	
4. Messreihe für den mPTP-Aktivator	*Auranofin* (25 µM)[5]	
5. Messreihe für den mPTP-Inhibitor	*ABT-737* (100 nM)[6]	
Auswahl Stoffmengenkonzentration nach: [1,2]Mukunda et al. (2014), [3,4]Xie et al. (2017), [5]Varghese u. Büsselberg (2014), [6]Yu et al.(2015)		

Nach 180 Messzyklen, dass heißt nach 895 s (s. Abb. 26), war das Messprotokoll für die Untersuchung einer Antennenpräparation beendet. Anschließend wurden die Zellkörper der OSNs als Regionen des Interesses (ROIs) zu einem Messzyklus (s. Abb. 24), an dem sie am deutlichsten zu erkennen waren, markiert (Benutzung Auswahlfunktion-Software aus Tab. 2).

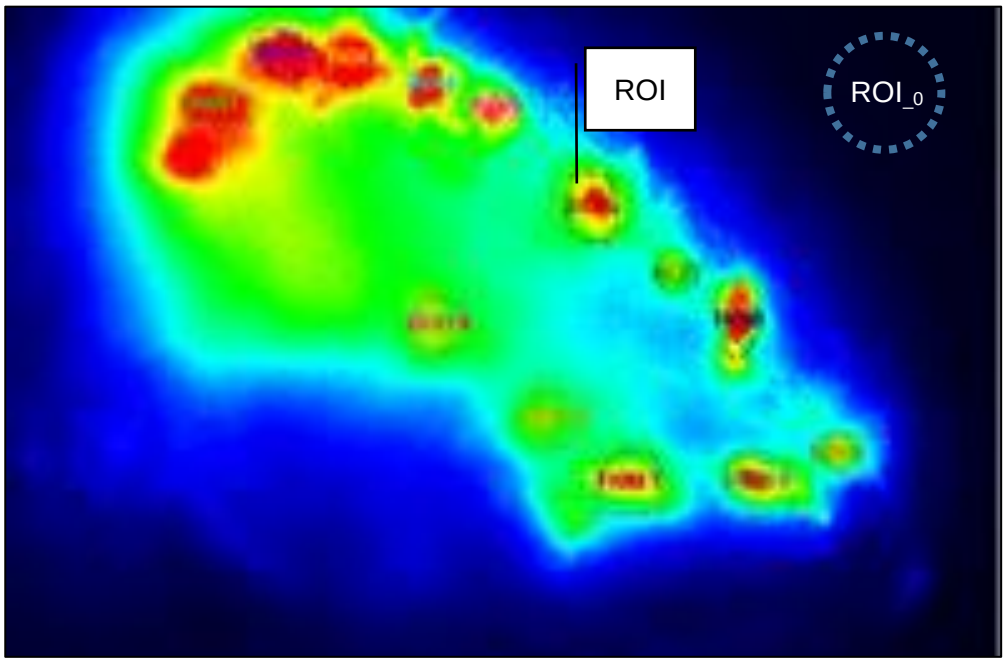

Abb. 24: Markierte Regionen des Interesses (ROIs) bei einer Antennenpräparation der Kontrollgruppe zum 70. Messzyklus im *Ca^{2+}-Imaging*.
Die ROIs stellen die Zellkörper der OSN dar und wurden mit Hilfe einer speziellen Auswertesoftware zu einem Messzyklus ausgewählt, an dem sie am besten zu erkennen waren. $ROI_{_0}$ wird zur Messdatenauswertung (s. Kapitel 4.5) benötigt.

Die Auswahl der ROIs war notwendig, um die Änderung der Fluoreszenzintensität bei Zugabe einer Substanz (s. Tab. 3) grafisch darstellen zu lassen (s. Abb. 26). Ein bildhaftes Beispiel für diese Fluoreszenzänderung ist in Abb. 25 zu sehen. Im Vergleich zu Abb. 23 ist eine deutliche Steigerung der Intensität der Fluoreszenz bei der Kontrollgruppe (s. Tab. 3) zu erkennen.

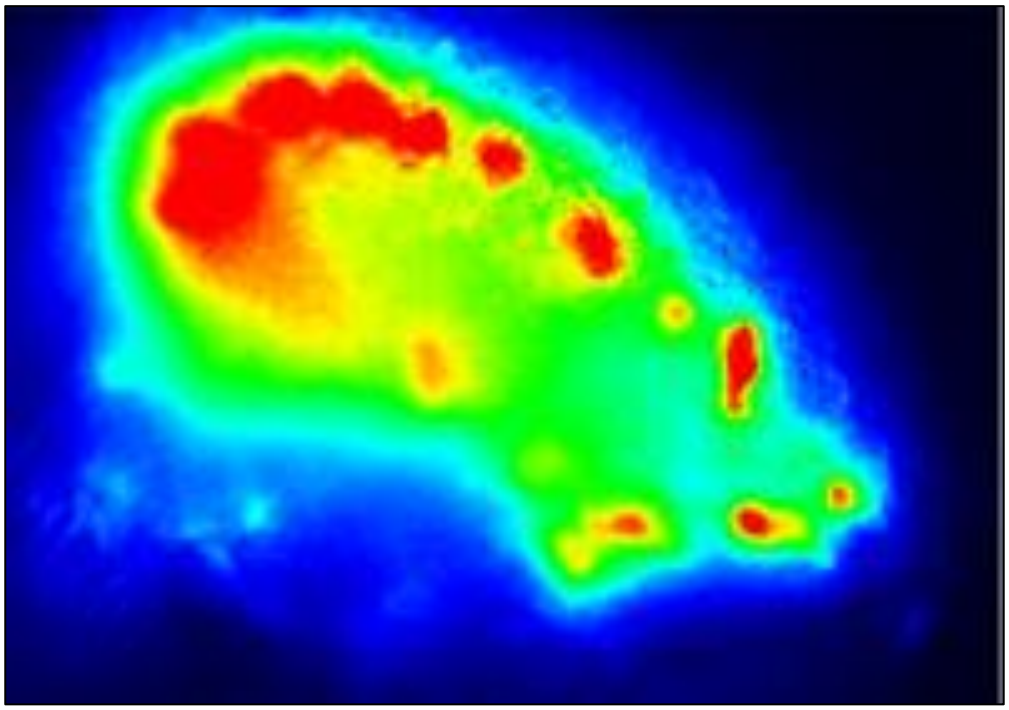

Abb. 25: Darstellung der geänderten Fluoreszenzintensität der OSNs nach Verabreichung der zweiten Substanz (s. Tab. 3) im Vergleich zu Abb. 23.
Die rot aufleuchtenden Bereiche zeigen eine deutliche Steigerung der Intensität der Ca^{2+}-Fluoreszenz von OSNs im Vergleich zu Abb. 23 auf. Die Aufnahme geschah beim 79. Messzyklus, als Antwort auf die zuvor applizierte Substanz der Kontrollgruppe (s. Tab. 3).

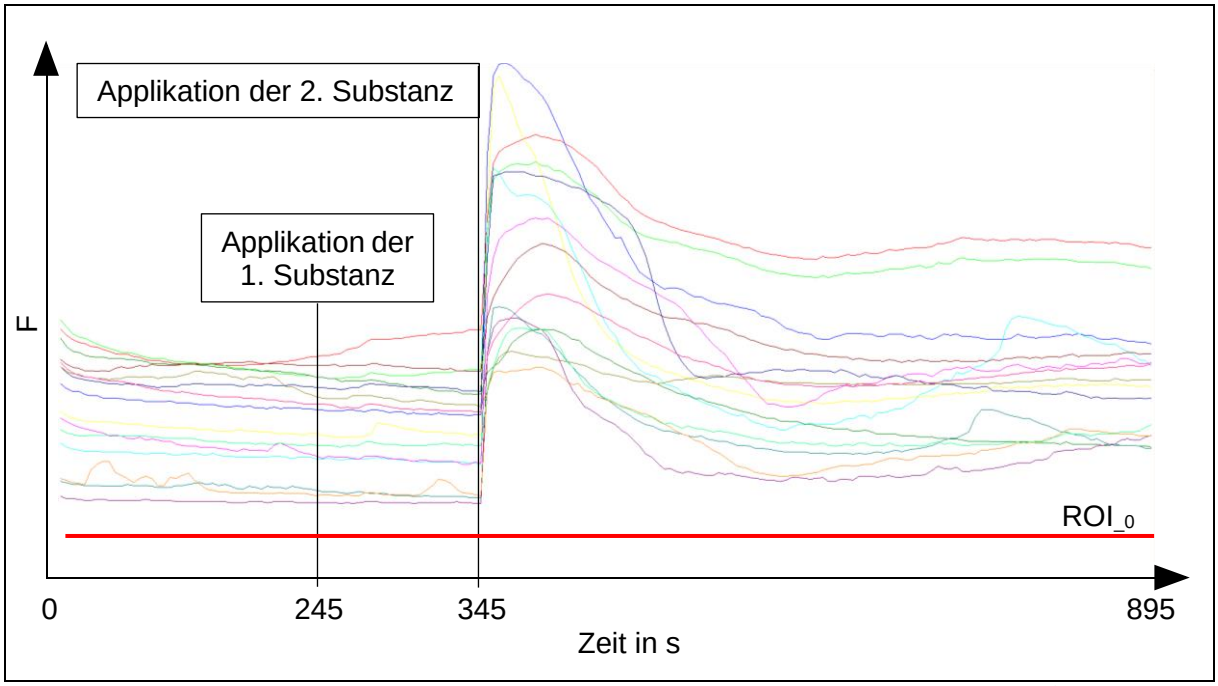

Abb. 26: Grafische Darstellung der Fluoreszenzänderung während des *Ca^{2+}-Imagings* unter Zugabe zweier Substanzen nach Tab. 3
Nach 245 s / 345 s (nach d. 50./ 70. Messzyklus) erfolgte die Zugabe der in Tab. 3 erwähnten Substanzen. Anhand der hier dargestellten Grafik ist die Änderung der gemessenen Fluoreszenzintensität (F) im Zeitverlauf exemplarisch für die Kontrollgruppe (s. Tab. 3) dargestellt. Die unterschiedlich gefärbten Linien symbolisieren die F für die markierten ROIs aus Abb. 24.

Im Anschluss an die Markierung der ROIs (s. Abb. 24) und der garfischen Darstellung, wie in Abb. 26, wurden die ermittelten Messwerte der jeweiligen ROIs statistisch (s. Kapitel 4.5) ausgewertet.

Ein Übergang zur nächsten Messreihe (s. Tab. 3) erfolgte, wenn eine Anzahl von sieben gelungenen Experimenten pro Messreihe zu verzeichnen war. Als gelungen war eine Test einzuschätzen, wenn die Reaktionen der OSNs auf die Pharmaka plausibel erschienen und innerhalb einer Messreihe homogene Ergebnisse erzielt wurden.

Das in diesem Kapitel 4.4.2 beschriebene Vorgehen wurde für jedes Experiment in allen fünf Messreihen in Bezug auf Tab. 3 durchgeführt.

4.5 Statistische Methoden

Zu Beginn wurden entsprechend Abb. 26 die Messwerte der ROIs aus der Gesamtbetrachtung entfernt, die kleiner als ein Viertel des Mittelwertes beim Peak der Messkurve betrugen. Dies geschah, um signifikante Ergebnisse zu erzielen.

Entsprechend der Tab. 5 (s. Kapitel 5) soll exemplarisch gezeigt werden, wie die von der PC-Auswertesoftware (s. Tab. 2) gemessenen Rohdaten in *Microsoft Excel* der Fa. MICROSOFT CORPORATION weiterverarbeitet wurden. Die Originaldateien sind auf der beiliegenden CD zu finden. In Tab. 5 sind die einzelnen Messzyklen (MZ) mit der entsprechenden zeitlichen Zuordnung (t) in s und die Werte für die gemessene Fluoreszenzintensität (F) in der Umgebung (F_B) und bei der jeweiligen ROI (F_{ROI_n}) dargestellt. Die F der jeweiligen ROIs waren um F_B zu reduzieren (s. (1) in Tab. 4). Somit konnten die „wirklichen Werte“ der Fluoreszenzintensität ($F_{korr.}$) der ROIs ermittelt werden. Die ersten 29 Messzyklen wurden von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen, da sie als Adaptationszeit der OSNs anzusehen waren. Als Wert für die Basislinienfluoreszenzintensität (F_0) wurde der arithmetische Mittelwert von den errechneten $F_{korr.}$-Werten zwischen dem 30. und 39. MZ gebildet (s. (2) in Tab. 4). Die Differenzbildung (ΔF) zwischen F_0 und $F_{korr.}$ (s. (3) in Tab. 4) wurde benötigt, um die prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) in Bezug auf F_0 ermitteln zu können (s. (4) in Tab. 4). Diese Vorgehensweise für die ROI_1 erfolgte bis zu einer n-ten ROI (ROI_n). Anschließend wurde der arithmetische Mittelwert $\overline{(x)}$ von allen $\Delta F/F_0$-Werten der ROIs gebildet (s. (5) in Tab. 4), womit die Auswertung für **eines** von sieben Experimenten in einer Messreihe abgeschlossen war. Die bis hierher beschriebene Abfolge an Berechnungen geschah für die Daten der weiteren sechs Experimente einer Messreihe. Die kalkulierten arithmetischen Mittel von $\Delta F/F_0$-Werten der sieben Experimente pro Messreihe wurden anschlie-

ßend in das statistische Auswerteprogramm *Prism 4* (Graph-Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA) übertragen. Dieses Vorgehen erfolgte analog für alle fünf Messreihen (s Tab. 3).

Tab. 4: Verwendete Formeln für die Auswertung der Rohmessdaten (s. auch Tab. 5) Formelzeichen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen!

Verwendete Formeln:	
$F_{korr.} = F - F_B$	(1)
$F_0 = \left(\frac{F_{korr.(30.MZ)} + F_{korr.(31.MZ)} + \cdots + F_{korr.(39.MZ)}}{10}\right)$	(2)
$\Delta F = F_{korr.} - F_0$	(3)
$\Delta F/F_0 = \left(\frac{F_{korr.} - F_0}{F_{korr.}}\right) * 100$	(4)
$\overline{x} = \frac{(\Delta F/F_{0ROI_1}) + (\Delta F/F_{0ROI_2}) + \cdots + (\Delta F/F_{0ROI_n})}{n}$	(5)

Mit Hilfe von *Prism 4* erfolgte die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes, Standardfehlers, der Perzentile und der Standardabweichung von den durchschnittlichen $\Delta F/F_0$ -Werten pro Messreihe. Ebenfalls wurden die Maxima nach Verabreichung der ersten und zweiten Substanz berechnet und das Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert von $\Delta F/F_0$ nach Applikation der 2. Substanz gebildet. Des Weiteren wurde das Tau (τ) als eine Zeitkonstante der e-Funktion ermittelt, bei der sich der vorher erreichte Höchstwert von $\Delta F/F_0$ bis auf ein Drittel seines Ursprungswertes vermindert hatte.

Aus den Ergebnissen wurden die Grafiken in Abb. 27, Abb. 28 und Abb. 29 in Kapitel 5 erstellt.

Die kalkulierten Resultate wurden mit Hilfe der folgenden statistischen Tests auf signifikante Unterschiede (Festlegung der Irrtumswahrscheinlichkeit bzw. eines Signifikanzniveau von α = 5 %) und Zusammenhänge geprüft und anschließend in den Grafiken in Kapitel 5 vermerkt.

Statistische Tests:
- Test auf Normalverteilung, Bestimmung von R^2,
- *F*-Test und *Bartlett's*-Test zum Vergleich von Varianzen,
- *ANOVA* Table, *Dunnett's Multiple Comparison*-Test,
- *Ungepaarter t*-Test mit *Welch's* Korrektion,
- *Bonferonie*- oder *Holms*-Korrektion bei signifikanten Unterschieden

5 Messdaten und Ergebnisse

In der folgenden Tab. 5 sind die Rohmessdaten aus **einem** Experiment in Kontroll-Messreihe 1 (s. Tab. 3) und deren weitere Verarbeitung anhand der Formeln aus Tab. 4 dargestellt, um ein Beispiel für das Aussehen und Verarbeiten der Rohmessdaten zu geben (Erklärung s. Kapitel 4.5). Alle Rohmessdaten sind der beigefügten CD zu entnehmen.

Tab. 5: Beispiel für Rohmessdaten aus einem Experiment in Kontroll-Messreihe 1 (s. Tab. 3) und deren weitere Verarbeitung anhand der Formeln aus Tab. 4.

MZ	t (s)	$F_B \triangleq F_{ROI_0}$	ROI_1				...	ROI_n				
			F	$F_{korr.}$	F_0	$\Delta F/F_0$ (%)		F	$F_{korr.}$	F_0	$\Delta F/F_0$ (%)	
1	0	56,8	654,4	597,6	Mittel-wert aus $F_{korr.}$ (30. – 39. MZ)		...	567,0	510,2	Mittel-wert aus $F_{korr.}$ (30. – 39. MZ)		
2	5	57,1	605,0	547,9				572,9	515,8			
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮			...	⋮	⋮			
28	135	56,5	605,0	548,5				572,9	516,4			
29	140	56,9	605,0	548,1	548,4		...	572,9	516,0	516,3		$\bar{x}$
30	145	56,7	605,0	548,3	548,4	0,00		572,9	516,2	516,3	0,00	0,00
31	150	56,8	605,0	548,3	548,4	-0,02		572,9	516,2	516,3	-0,02	-0,03
32	155	56,7	605,0	548,3	548,4	-0,01	...	572,9	516,2	516,3	-0,01	-0,01
33	160	56,6	605,0	548,5	548,4	0,02		572,9	516,4	516,3	0,02	0,03
34	165	56,7	605,0	548,4	548,4	0,00		572,9	516,3	516,3	0,00	0,00
35	170	56,7	605,0	548,3	548,4	-0,01	...	572,9	516,2	516,3	-0,01	-0,01
36	175	56,7	605,0	548,4	548,4	0,00		572,9	516,3	516,3	0,00	0,00
37	180	56,6	605,0	548,4	548,4	0,01	...	572,9	516,3	516,3	0,01	0,01
38	185	56,8	605,0	548,2	548,4	-0,02		572,9	516,1	516,3	-0,03	-0,03
39	190	56,5	605,0	548,5	548,4	0,03		572,9	516,4	516,3	0,03	0,04
40	195	56,6	605,0	548,5	548,4	0,02	...	572,9	516,4	516,3	0,03	0,03
⋮	⋮	⋮	⋮	Gabe der 1. Testsubstanz nach dem 50. MZ						⋮	⋮	⋮
49	240	56,5	605,0	548,6	548,4	0,04	...	572,9	516,5	516,3	0,04	0,05
50	245	56,7	605,0	548,4	548,4	0,00		572,9	516,3	516,3	0,00	0,00
51	250	56,6	605,0	548,5	548,4	0,02		572,9	516,4	516,3	0,02	0,02
⋮	⋮	⋮	⋮	Gabe der 2. Testsubstanz nach dem 70. MZ						⋮	⋮	⋮
69	340	56,6	605,0	548,4	548,4	0,01		572,9	516,3	516,3	0,01	0,02
70	345	56,9	605,0	548,2	548,4	-0,03	...	572,9	516,1	516,3	-0,03	0,07
71	350	56,7	607,1	550,3	548,4	0,36		572,9	516,2	516,3	-0,01	0,30
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	...	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
180	895	56,8	648,6	591,8	548,4	7,92		437,5	380,7	516,3	-26,2	-3,08

Wie in Kapitel 4.5 (s. auch Tab. 5) beschrieben worden ist, wurden die ersten 29 Messzyklen von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen. Somit sind 145 s des tatsächlichen Experiments gleichbedeutend mit dem Zeitpunkt 0, der in den Grafiken der Abb. 27 zu sehen ist. Daraus ergibt sich, dass die Applikation der ersten Substanz nach dem 50. MZ (= 245 s) 100 s und die Verabreichung der zweiten Substanz nach dem 70. MZ (= 345 s) 200 s entsprechen.

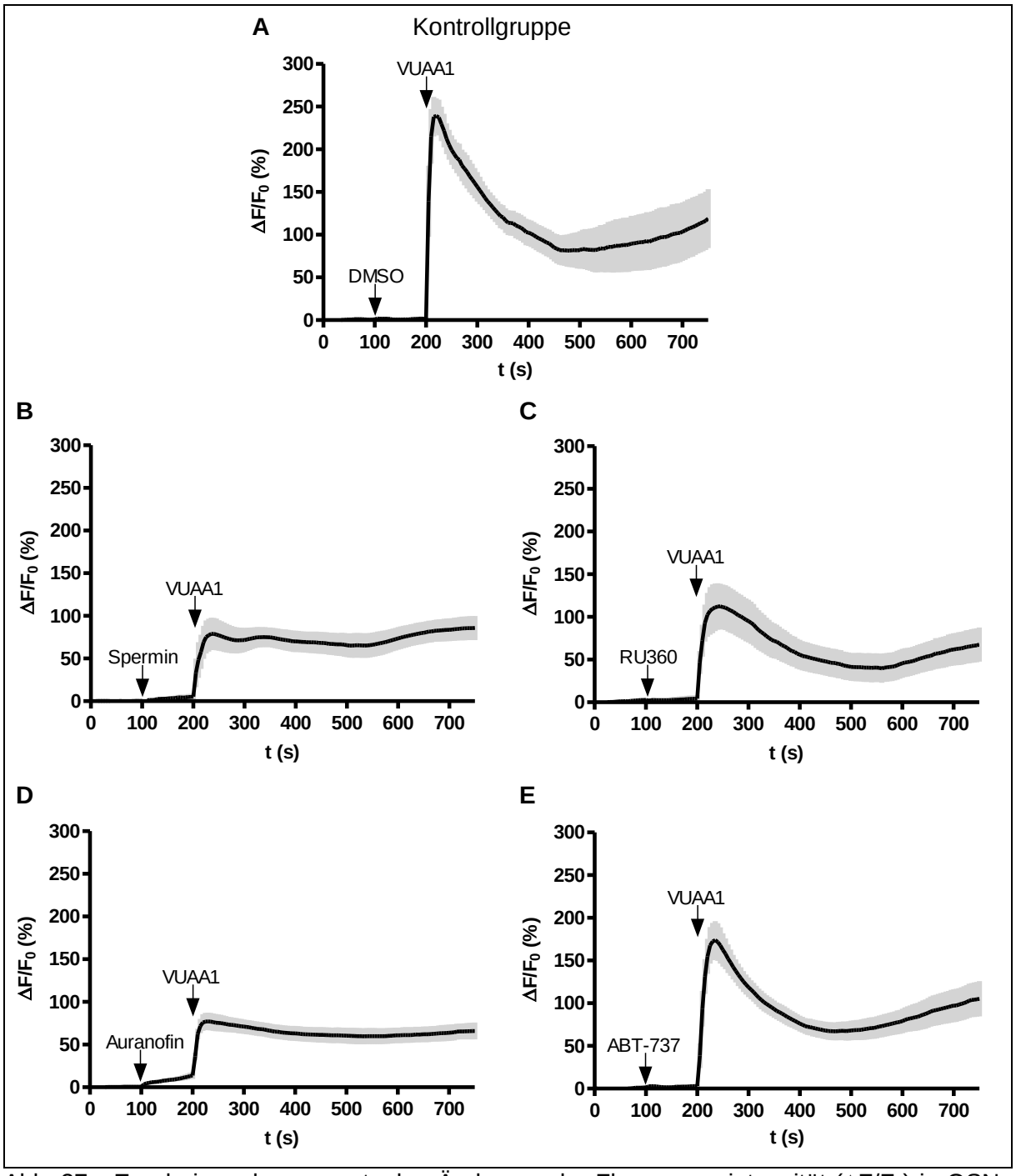

Abb. 27: Ergebnisse der prozentualen Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) in OSNs bei differenter Pharmakagabe zu t = 100 s und der Applikation des Agonisten *VUAA1* (100 µM) zu t = 200 s

Die Grafiken A – E zeigen den arithmetischen Mittelwert von $\Delta F/F_0$ innerhalb einer Messreihe, wobei die Begrenzung der grauen Fläche den Standardfehler kennzeichnet.

A) Die Ergebnisse der Kontroll-Messreihe zeigen eine starke $\Delta F/F_0$ (um ca. 245 %) nach Zugabe von *VUAA1*. Bei *DMSO* (100 µM) trat keine sichtbare $\Delta F/F_0$ ein.

B) Nach Zugabe des mCU-Aktivators *Spermin* (10 µM) ist eine sehr leichte $\Delta F/F_0$ erkennbar. Die Zugabe von *VUAA1* führte zu einer geringeren $\Delta F/F_0$ und danach zu einem nahezu konstant bleibenden Wert im Vergleich zu (A), aber schwankender als in (D).

C) Nach Zugabe des mCU-Inhibitors *RU360* (5 µM) ist ein ähnlicher Kurvenverlauf wie in (A) mit geringeren Werten für $\Delta F/F_0$ erkennbar. Die $\Delta F/F_0$-Werte sind geringer als in (E).

D) Der Kurvenverlauf von $\Delta F/F_0$ bei dem mPTP-Aktivator *Auranofin* (25 µM) ähnelt (B).

E) Nach Zugabe des mPTP-Inhibitors *ABT-737* (100 nM) und *VUUA1* ist ein ähnlicher Verlauf der Kurve wie in (A) und (C) zu verzeichnen ($\Delta F/F_0$-Werte geringer als in (A)).

In Verbindung zur Zielstellung (s. Kapitel 2) der vorliegenden Masterarbeit und der in Kapitel 3.6 aufgestellten Hypothese und den Teilhypothesen (a – d), zeigt Abb. 27 einen grafischen Überblick über die Ergebnisse für die $\Delta F/F_0$, die mit Hilfe statistischer Methoden (s. Kapitel 4.5) aus den *Ca^{2+}-Imaging*-Experimenten (s. Kapitel 4.4.2) an OSNs von Drosophila melanogaster unter Zugabe verschiedener Pharmaka (Messreihe 1 – 5, s. auch Tab. 3) hervorgingen. Die Grafiken (A – E) zeigen den Zeitverlauf des arithmetischen Mittelwerts von $\Delta F/F_0$ innerhalb einer Messreihe. Die Abweichung des Mittelwertes der Strichprobe vom Mittelwert der Grundgesamtheit wird durch die graue Fläche beschrieben, deren obere und untere Begrenzung den Standardfehler kennzeichnet.

In Abb. 27A sind die Resultate der Kontrollgruppe (1. Messreihe s. Tab. 3) zu finden, die als Vergleichswerte zur Überprüfung der Hypothesen (s. Kapitel 3.6), dass eine Veränderung der mitochondrialen Funktion zu einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zur Kontrollgruppe führt, dienen sollen. Es ist zu erkennen, dass die Verabreichung von *DMSO* (100 µM, s. Kapitel 4.3.3) einen sehr geringen Anstieg der $\Delta F/F_0$ um 1,9 ± 1,3 % hervorruft (s. auch Abb. 28A). Nach der Zugabe von *VUAA1* (100 µM) erfolgt eine sehr starke und sprunghafte $\Delta F/F_0$ um 239,1 ± 20,5 % vom Ursprungswert (s. auch Abb. 28B). Nachdem das Maximum erreicht ist, erfährt die Verlaufskurve einen kontinuierlichen Abschwung und steigt dann wieder ab einer Zeit von ca. 450 s langsam an, wobei der Standardfehler größer wird. Das Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert (R) von $\Delta F/F_0$ nach der Gabe von *DMSO* und anschließender Verabreichung von *VUAA1* beträgt 0,33 ± 0,07 (s. Abb. 29B). Nach 122,9 ± 21,6 s (s. Abb. 29A) erreicht die Verlaufskurve von $\Delta F/F_0$ einen Wert, der nur noch ein Drittel des Maximalwertes von $\Delta F/F_0$ (s. auch Abb. 27A) beträgt.

Im Folgenden wird auf die Teilhypothese (s. Kapitel 3.6, 1.a), dass die Aktivierung des mCU nicht zu einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe führt, mit Hilfe der Abb. 27B eingegangen. Nach der Zugabe des mCU-Aktivators *Spermin* (10 µM) steigt die $\Delta F/F_0$ auf einen Wert von 2,7 ± 1,8 % (s. auch Abb. 28A). Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrollgruppe ist laut *ungepaarten t*-Test nicht signifikant. Anschließend erfolgt nach der Gabe von *VUAA1* (100 µM) ein kleinerer Anstieg der $\Delta F/F_0$ auf 78,9 ± 19,1 % (s. auch Abb. 28B) im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 27A und Abb. 28B). Der dabei bestehende Unterschied zur Kontrollgruppe, der mit dem *ungepaarten t*-Test auf Signifikanz getestet wurde, ist mit ***$p \leq 0{,}001$ (s. Abb. 28B) vor und nach der *Holms*-Korrektion signifikant. Nach dem der Kurvenverlauf sein Maximum erreicht hat, erfolgt ein leichter Abschwung bis zu einer Zeit von 280 s. Dann steigt die $\Delta F/F_0$ wieder leicht bis zu einer Zeit von 340 s an und sinkt dann wieder bis zu einer Zeit von ca. 345 s ab und steigt dann wieder an. Der Kurvenverlauf ist vergleichbar zu Abb. 27D. Das Verhältnis zwischen Maximal-

und Minimalwert (R) von $\Delta F/F_0$ nach der Gabe von *Spermin* und anschließender Verabreichung von *VUAA1* beträgt 0,97 ± 0,10 (s. Abb. 29B). Der Unterschied des R von $\Delta F/F_0$ zur Kontrollgruppe ist dem *ungepaarten t*-Test zufolge mit ***p ≤ 0,001 vor und nach Holms-Korrektion signifikant (s. Abb. 29B). Eine Tauberechnung für die Messreihe mit *Spermin* und *VUUA1* ist aufgrund des Kurvenverlaufs von $\Delta F/F_0$ aus Abb. 27B nicht möglich und somit konnte auch nicht die Signifikanz des Unterschiedes von Tau berechnet werden.

In Abb. 27C wird auf die Teilhypothese (s. Kapitel 3.6, 1.b) eingegangen, dass die Hemmung des mCU zu einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe beiträgt. Es ist zu erkennen, dass nach Verabreichung des mCU-Inhibitors *RU360* (5 µM) eine sehr geringe $\Delta F/F_0$ um 2,8 ± 1,3 % (s. auch Abb. 28A) zu verzeichnen ist. Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrollgruppe ist laut *ungepaarten t*-Test nicht signifikant. Nach der darauffolgenden Applikation von *VUAA1* (100 µM) kann ein sprunghafter Anstieg der $\Delta F/F_0$ auf einen Maximalwert von 112,3 ± 26,6 % (s. auch Abb. 28B) verzeichnet werden. Der dabei bestehende Unterschied zur Kontrollgruppe, der mit dem ungepaarten t-Test auf Signifikanz getestet wurde, ist mit **p ≤ 0,01 (s. Abb. 28B) vor und nach der *Holms*-Korrektion signifikant. Nachdem das Maximum erreicht ist, erfährt die Verlaufskurve einen kontinuierlichen Abschwung und steigt dann wieder ab einer Zeit von ca. 570 s langsam an, wobei der Standardfehler annähernd gleich bleibt. Im Vergleich zur Kontrollmessung (s. Abb. 27A) ist der Maximalwert von $\Delta F/F_0$ geringer und der Standardfehler wird ab einer Zeit von ca. 450 s offensichtlich kleiner. Prinzipiell zeigen beide Kurvenverläufe aber einen sehr ähnlichen Verlauf. Gleiches ist im Vergleich zu Abb. 27E zu erwähnen. Das Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert (R) von $\Delta F/F_0$ nach der Gabe von *RU360* und anschließender Verabreichung von *VUAA1* beträgt 0,25 ± 0,13 (s. Abb. 29B). Der Unterschied des R von $\Delta F/F_0$ zur Kontrollgruppe ist dem *ungepaarten t*-Test zufolge nicht signifikant (s. Abb. 29B). Nach 194,5 ± 85,7 s (s. Abb. 29A) erreicht die Verlaufskurve von $\Delta F/F_0$ einen Wert, der nur noch ein Drittel des Maximalwertes von $\Delta F/F_0$ (s. Abb. 27C und Abb. 28B) aufweist. Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrollgruppe ist laut *ungepaarten t*-Test nicht signifikant.

Abb. 27D stellt die Ergebnisse für die Teilhypothese (s. Kapitel 3.6, 1.c) dar, dass durch die Aktivierung der mPTP eine veränderte Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu verzeichnen sei. Es ist zu erkennen, dass die Zugabe des mPTP-Aktivators *Auranofin* (25 µM) eine mäßige $\Delta F/F_0$ um 8,2 ± 2,3 % (s. auch Abb. 28A) bis 200 s verursacht. Der Unterschied zur Kontrollgruppe, der mit dem *ungepaarten t*-Test auf Signifikanz getestet wurde, ist mit p = 0,037 signifikant (s. Abb. 28A). Nach der *Holms*-Korrektion liegt ein p-Wert von 0,15 und somit keine Signifikanz mehr vor. Erfolgt dann die Applikation von *VUAA1* (100 µM), so ist nur noch eine geringe $\Delta F/F_0$ auf einen Maximalwert

von 77,1 ± 10,3 % (s. auch Abb. 28B) im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 27A) zu verzeichnen. Der dabei bestehende Unterschied zur Kontrollgruppe, der mit dem *ungepaarten t*-Test auf Signifikanz getestet wurde, ist mit ***p ≤ 0,001 (s. Abb. 28B) vor und nach der *Holms*-Korrektion signifikant. Nach dem Anstieg auf ein Maximum erfährt der Kurvenverlauf nur einen sehr leichten Abschwung und bleibt dann bei einem nahezu konstanten $\Delta F/F_0$-Wert mit einem geringen Standardfehler (Abb. 27D). Das Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert (R) von $\Delta F/F_0$ nach der Gabe von *Auranofin* und anschließender Verabreichung von *VUAA1* beträgt 0,78 ± 0,11 (s. Abb. 29B). Der Unterschied des R von $\Delta F/F_0$ zur Kontrollgruppe ist dem *ungepaarten t*-Test zufolge mit p = 0,007 nach *Holms*-Korrektion mit einem Wert von 0,022 signifikant (s. Abb. 29B). Nach 208,6 ± 126,5 s (s. Abb. 29A) erreicht die Verlaufskurve von $\Delta F/F_0$ einen Wert, der Berechnungen zufolge etwa ein Drittel des Maximalwertes von $\Delta F/F_0$ beträgt (s. Abb. 27D). Aus Abb. 29A ist somit zu erkennen, dass der Standardfehler vom Mittelwert von Tau am größten im Vergleich zu allen anderen Messreihen ist. Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrolle ist laut *ungepaarten t*-Test nicht signifikant (s. Abb. 29A).

In Abb. 27E wird auf die Teilhypothese (s. Kapitel 3.6, 1.d), dass die Hemmung der mPTP zu keiner veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe führt, eingegangen. Es ist zu sehen, dass nach Applikation des mPTP-Inhibitors *ABT-737* (100 nM) eine sehr geringe $\Delta F/F_0$ um 3 ± 0,5 % (s. auch Abb. 28A) zu verzeichnen ist. Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrollgruppe ist laut *ungepaarten t*-Test nicht signifikant. Nach der Verwendung von *VUAA1* (100 µM) kann ein starker und sprunghafter Anstieg der $\Delta F/F_0$ auf einen Maximalwert von 173,8 ± 22,26 % (s. auch Abb. 28B) verzeichnet werden. Der dabei bestehende Unterschied zur Kontrollgruppe, der mit dem *ungepaarten t*-Test auf Signifikanz getestet wurde, ist nicht signifikant (s. Abb. 28B). Nachdem das Maximum erreicht ist, erfährt die Verlaufskurve einen kontinuierlichen Abschwung und steigt dann wieder ab einer Zeit von ca. 450 s langsam an, wobei der Standardfehler größer wird. Im Vergleich zur Kontrollmessung (s. Abb. 27A und Abb. 28B) ist der Maximalwert von $\Delta F/F_0$ geringer und der Standardfehler wird ab einer Zeit von ca. 450 s offensichtlich kleiner. Prinzipiell zeigen beide Kurvenverläufe aber einen sehr ähnlichen Verlauf. Das Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert (R) von $\Delta F/F_0$ nach der Gabe von *ABT-737* und anschließender Verabreichung von *VUAA1* beträgt 0,38 ± 0,03 (s. Abb. 29B). Der Unterschied des R von $\Delta F/F_0$ zur Kontrollgruppe ist dem *ungepaarten t*-Test zufolge nicht signifikant (s. Abb. 29B). Nach 100,3 ± 15,5 s (s. Abb. 29A) erreicht die Verlaufskurve von $\Delta F/F_0$ einen Wert, der nur noch ein Drittel des Maximalwertes von $\Delta F/F_0$ (s. Abb. 27E und Abb. 28B) beträgt. Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrolle ist laut *ungepaarten t*-Test nicht signifikant (s. Abb. 29A).

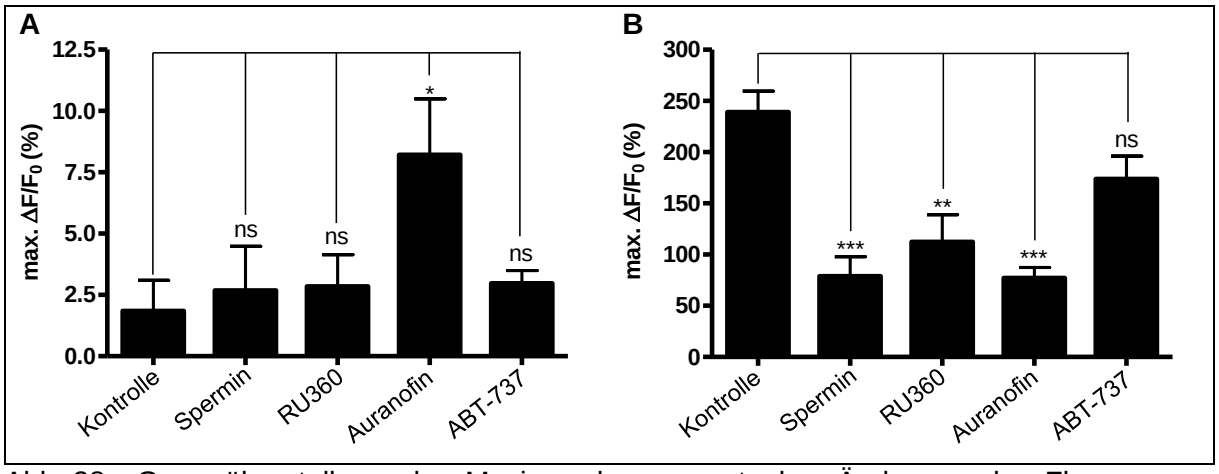

Abb. 28: Gegenüberstellung der Maxima der prozentualen Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) in OSNs nach differenter Pharmakagabe zu t = 100 s (A) und der Applikation des Agonisten *VUAA1* (100 µM) zu t = 200 s (B)

Die Sterne zeigen die Ergebnisse des *ungepaarten t*-Tests wie folgt an: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; ns = nicht signifikant.

A) Es ist zu erkennen, dass *Auranofin* als einziger Wirkstoff im Anschluss an die Applikation eine signifikante erhöhte $\Delta F/F_0$ im Vergleich zur Kontrolle zeigt. Jedoch ist hier der Standardfehler am größten im Vergleich zu allen Messreihen.

B) Die Applikation von *VUAA1* nach vorheriger Gabe von *Spermin* od. *RU360* od. *Auranofin* führt zu einer signifikant reduzierten $\Delta F/F_0$ im Vergleich zur Kontrolle. Die max. $\Delta F/F_0$ für *ABT-737* unterscheidet sich von der Kontrolle, aber nicht signifikant.

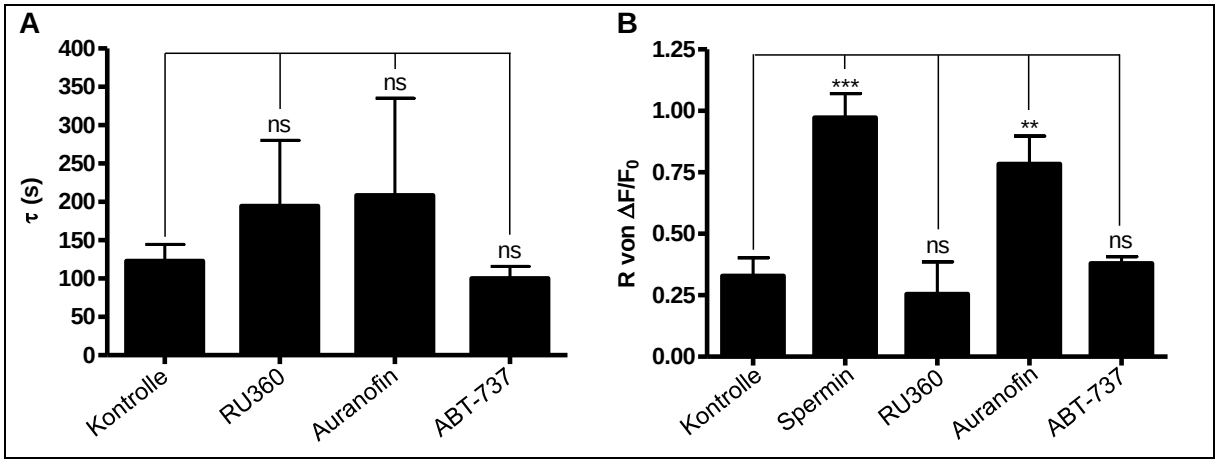

Abb. 29: Gegenüberstellung der Ergebnisse für (A) die Zeitkonstante *Tau* (τ) und (B) die Verhältnisberechnung zwischen Maximal- und Minimalwert (R) der prozentualen Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) in OSNs nach differenter Pharmakagabe zu t = 100 s und der Applikation des Agonisten *VUAA1* (100 µM) zu t = 200 s

Die Sterne zeigen die Ergebnisse des *ungepaarten t*-Tests wie folgt an: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; ns = nicht signifikant.

A) Tau (τ) stellt die Zeitkonstante der e-Funktion dar, bei der sich der vorher erreichte Höchstwert von $\Delta F/F_0$ bis auf ein Drittel seines Ursprungswertes vermindert hatte. Im Vergleich zur Kontrolle sind keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Substanzen zu erkennen. *Spermin* fehlt in dieser Betrachtung, da keine Berechnung von Tau (τ) aufgrund des Kurvenverlaufes aus Abb. 27B zu berechnen war.

B) Es ist zu erkennen, dass das R von $\Delta F/F_0$ bei *Spermin* und *Auranofin* signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrolle ist.

Weitere detailliertere Berechnungen und die konkreten Ergebnisse der statistischen Tests, gemäß Kapitel 4.5, sind auf der beiliegenden CD zu finden.

6 Diskussion

Die nachfolgende Diskussion würdigt die Ergebnisse (s. Kapitel 5) im Hinblick auf die Zielstellung (s. Kapitel 2) der vorliegenden Masterarbeit und die in Kapitel 3.6 aufgestellte Hypothese (einschließlich der Teilhypothesen 1. a) – d)), dass eine Veränderung der mitochondrialen Funktion zu einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz führt.

Zuerst sollen die Ergebnisse der Kontrollgruppe (1. Messreihe s. Tab. 3) aus Abb. 27A diskutiert werden. Wie zu erkennen ist, bewirkt *DMSO* (100 µM) nur einen sehr geringen Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz um 1,9 ± 1,3 % (s. auch Abb. 28A). Das heißt, dass ein Einfluss von *DMSO* als Lösungsmittel für *Spermin, RU360*, *Auranofin* und *ABT-737* auf die Ergebnisse der Testung für die Teilhypothesen 1. a) – d) ausgeschlossen werden kann. Ähnliche Ergebnisse für die Wirkung von *DMSO* sind auch aus Studien von z.B. Mukunda et al. (2014) und Halty-deLeon et al. (2018) bekannt. Nach der Zugabe von *VUAA1* (100 µM) erfolgt ein sehr starker und sprunghafter Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz um 239,1 ± 20,5 % vom Ursprungswert (s. Abb. 27A und Abb. 28B). Dieser sprunghafte Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz ist auf die aktivierende Wirkung dieses allosterischen Agonists auf den Korezeptors-Orco bei Insekten (s. Kapitel 3.3) zurückzuführen (Corcoran et al., 2018, Kumar et al., 2013). Die Tendenz der Ergebnisse für das Erreichen des Maximalwertes sind vergleichbar mit den Resultaten von Mukunda et al. (2014), wobei hier nur ein Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz von ca. 25 % bei gleicher Stoffmengenkonzentration von *VUUA1* zu verzeichnen war. Bei einem Versuch mit einer geringeren Stoffmengenkonzentration von *VUAA1* mit 25 µM in einer Studie von Halty-deLeon et al. (2018), konnten hingegen Werte von ca. 150 % für den Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz gemessen werden. Somit ist der ermittelte Maximalwert für den Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz aus Abb. 28A als valides Ergebnis einzustufen. Nachdem das Maximum erreicht ist, erfährt die Verlaufskurve einen kontinuierlichen Abschwung und steigt dann wieder ab einer Zeit von ca. 450 s langsam an, wobei der Standardfehler größer wird. Die Abnahme der Ca^{2+}-Fluoreszenz ist damit zu begründen, dass sich die OSNs vor einer Überladung mit Ca^{2+} schützen und folglich einem Zelltod vorbeugen (Trudeau et al., 2003). In diesem Zusammenhang schließen die ORs und Ca^{2+} wird durch Puffer gebunden oder unteranderem mit Hilfe von Ionenpumpen und -austauschern abtransportiert (Wicher, 2015). Ebenfalls wird die Ca^{2+}-Transportrate der Plasmamembran-Ca^{2+}-Pumpe über die Aktivierung von CaM stark erhöht (Budde et al., 2002). Bei der Reduktion des Ca^{2+} aus dem Zytoplasma der OSNs sollen außerdem auch das endoplasmatische Retikulum, die Mitochondrien und deren Verhältnis untereinander eine wichtige Rolle spielen (Rizzuto et al., 2009), (s. auch Kapitel 3.5). Aus den angeführten Gründen ist auch der Abschwung der Verlaufskurve für die Ca^{2+}-Fluoreszenz erklärbar.

Des Weiteren könnte der Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz nach einer Zeit von ca. 450 s mit der Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung (engl. calcium-induced calcium release (CICR)) erklärbar sein. Diese beschreibt einen biologischen Prozess in Muskelzellen, insbesondere Herzmuskelzellen, bei dem Kalzium die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Ca^{2+}-Speichern (z. B. endoplasmatisches (ER) oder sarkoplasmatisches (SR) Retikulum) aktivieren kann (Endo, 1977; Fabiato, 1983). Hierbei strömen nach der Depolarisation Kalziumionen durch L-Typ-Kalziumkanäle oder durch sarkolemmale, spannungsabhängige Kalziumkanäle (Dihydropyridinrezeptoren) in der T-Tubulus-Membran in die Zelle ein (Le Xu et al., 1998). Dort triggern sie den zusätzlichen Ca^{2+}-Einstrom in das Zytosol durch Erreichen der Aktivierungsschwelle des Ryanodin-Rezeptors (im Herz: Ryr2) in der Membran des SR (Le Xu et al., 1998). Ein derartiges Verhalten ist auch für das ER bei Neuronen beobachtet worden (Verkhratsky und Shmigol, 1996). Hierbei wird die CICR-Verfügbarkeit sowohl durch den Ca^{2+}-Gehalt der internen Speicher als auch durch die basale $[Ca^{2+}]_i$ gesteuert (Verkhratsky und Shmigol, 1996). Eine Rückkehr auf den ursprünglichen Wert, der vor der Applikation von *DMSO* bestand, scheint nicht möglich zu sein, da weiterhin ein Geruchsreisreiz der ORs durch *VUUA1* besteht. Entweder könnte es zu einer Adaptation der ORs kommen (s. Kapitel 3.3.3) oder die Werte für die Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz würden weiter ansteigen, weil durch die Verdunstung von Flüssigkeit die Konzentration von *VUAA1* künstlich erhöht wird. Kritisch zu betrachten ist der erhöhte Standardfehler, der ggf. durch weitere Übung der Antennen-präparation sowie das Schaffen von noch besseren Umgebungsbedingungen und der Auswahl noch gleichartigerer Antennen reduziert werden könnte. Zusammenfassend kann trotzdem festgestellt werden, dass sich die Ergebnisse dieser ersten Messreihe (Abb. 27A, Abb. 28, Abb. 29) zum Vergleich mit dem Resultaten der anderen Messreihen (Abb. 27B – E, Abb. 28, Abb. 29) eignen.

Generell gilt für die Diskussion der nachfolgenden Teilhypothesen 1. a) – d), dass jede Aktion nur mit einem wechselnden Pharmakon, je nach Messreihe (s. Tab. 3), getestet worden ist. Diesbezüglich können unbekannte Nebeneffekte auftreten, die eine genauere Erforschung nach sich ziehen könnten und nicht zwangsläufig zur Ablehnung der Hypothese führen. Damit ist auch gemeint, dass die Hypothese zwar für dieses eine Pharmakon im Moment ange-nommen werden kann, aber in der Zukunft weitere Tests mit verschiedenen Modulatoren (s. Kapitel 8) des mCU und der mPTP erfolgen sollten.

6.1 Hypothese 1. a) „Wenn die Aktivierung des mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporters (mCU) erfolgt, dann ist nicht mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen.“

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse für die Teilhypothese 1.a) eingegangen. Abb. 27B zeigt auf, dass nach der Zugabe des mCU-Aktivators *Spermin* (10 µM) ein sehr leichter Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz auf einen Wert von 2,7 ± 1,8 % (s. auch Abb. 28A) zu verzeichnen war. Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrollgruppe ist nicht signifikant und entsprach der Erwartung. Trotzdem ist anzumerken, dass durch die alleinige Aktivierung des mCU auch eine Reduktion der Ca^{2+}-Fluoreszenz hätte erfolgen können. Damit ist gemeint, das vermehrt Ca^{2+} durch das Öffnen des mCU in die Mitochondrien gelangen und somit die $[Ca^{2+}]_i$ im Zytosol des OSNs hätte abnehmen können (Zoratti und Szabò, 1995). Eine mögliche Ursache, warum dies nicht geschah, könnte auf mögliche unbekannte Wechselwirkungen mit anderen Zellorganellen (z.B. endoplasmatischem Retikulum (Rizzuto et al., 2009)) zurückzuführen sein. Des Weiteren wurden durch *Spermin* ggf. weitere Ca^{2+}-transportierende Ionenkanäle beeinflusst, die in die Homöostase bei OSNs eingebunden sind. Nach der Gabe von *VUAA1* (100 µM) erfolgte ein kleinerer Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz auf 78,9 ± 19,1 % (s. auch Abb. 28B) im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 27A und Abb. 28B). Der dabei bestehende Unterschied zur Kontrollgruppe (s. Abb. 28B) ist signifikant. Dies entspricht nicht der Erwartung, da die ggf. vermehrte mitochondriale Ca^{2+}-Speicherung nach mCU-Aktivierung keinen Einfluss auf die Ca^{2+}-Freigabe in das Zytosol durch z.B. die mPTP oder dem Na^+/Ca^{2+}-Austauscher (mNCE) nach Erregung der OSN hätte haben sollen (Zoratti und Szabò, 1995). Eine mögliche Erklärung kann darin begründet sein, dass durch den schon aktivierten mCU Ca^{2+} aus Regionen sehr hoher Konzentration nahe der Plasmamembran rasch in Mitochondrien aufgenommen (Biasutto et al., 2016) wurde und dadurch nicht so schnell und stark wieder abgegeben werden konnte, wie durch andere Zellorganellen. Folglich sinkt der Wert für die Ca^{2+}-Fluoreszenz insgesamt um mehr als die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 28B). Nachdem der Kurvenverlauf sein Maximum erreicht hat, erfolgt ein leichter Abschwung bis zu einer Zeit von 280 s. Dann steigt die Ca^{2+}-Fluoreszenz wieder leicht bis zu einer Zeit von 340 s an und sinkt dann wieder bis zu einer Zeit von ca. 345 s ab und steigt dann wieder an. Der $\Delta F/F_0$-Kurvenverlauf ist vergleichbar zu Abb. 27D und ist wiederholt nicht erwartet, aber nachvollziehbar, da durch die Aktivierung des mCU viel Ca^{2+} in die Mitochondrien gelangt, dort gespeichert und dann wieder langsam von der mPTP oder dem mNCE abgegeben wird (Babcock und Hille, 1998). Auch in diesem Fall ist ein völliger Abschwung der $\Delta F/F_0$-Kurve bis zum Ursprungswert, der vor der Gabe von *Spermin* bestand, nicht möglich. Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass sich beide Substanzen in dem kurzen beobachteten Zeitraum nicht abbauen.

Das Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert (R) von der Ca^{2+}-Fluoreszenz nach der Gabe von *Spermin* und anschließender Verabreichung von *VUAA1* beträgt 0,97 ± 0,10 und ist zur Kontrollgruppe mit ***p ≤ 0,001 signifikant (s. Abb. 29B). Dieses Ergebnis war anhand der Grafiken aus Abb. 27 zu erwarten. Die Tauberechnung für die Messreihe mit *Spermin* und *VUUA1* war aufgrund des Kurvenverlaufs der Ca^{2+}-Fluoreszenz aus Abb. 27B nicht möglich. Zusammenfassend kann erklärt werden, dass Hypothese 1.a) nicht zu bestätigen ist. Trotzdem bedarf es weiterer Abklärung (s. Kapitel 8).

6.2 Hypothese 1. b) „Wenn die Hemmung des mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporters (mCU) erfolgt, dann ist mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen.“

Die Teilhypothese 1.b) kann teilweise bestätigt werden. Es ist zu erkennen, dass nach Verabreichung des mCU-Inhibitors *RU360* (5 µM) eine sehr geringer Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz um 2,8 ± 1,3 % (s. auch Abb. 28A) zu verzeichnen ist. Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrollgruppe ist nicht signifikant. Diesbezüglich ist jedoch anzumerken, dass durch die Hemmung des mCU eigentlich eine Steigerung der Werte für die Ca^{2+}-Fluoreszenz hätte erfolgen müssen. Das heißt, dass durch das Schließen des mCU weniger Ca^{2+} in die Mitochondrien gelangen und somit die $[Ca^{2+}]_i$ im Zytosol des OSNs steigen müsste (Zoratti und Szabò, 1995). Es ist zwar ein kleiner Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 27 und Abb. 28A) zu erkennen, der jedoch weiterer Abklärung bedarf (s. Kapitel 8). Eine mögliche Ursache, warum kein größerer Unterschied besteht, könnte auf mögliche unbekannte Wechselwirkungen mit anderen Zellorganellen (z.B. endoplasmatischem Retikulum (Rizzuto et al., 2009)) zurückzuführen sein. Des Weiteren wurden durch *RU360* ggf. weitere Ca^{2+}-transportierenden Ionenkanäle beeinflusst, die in die Homöostase bei OSNs eingebunden sind. Ebenso könnte die Ursache in der geringen Stoffmengenkonzentration von *RU360* begründet sein. Nach der darauffolgenden Applikation von *VUAA1* (100 µM) kann ein sprunghafter Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz auf einen Maximalwert von 112,3 ± 26,6 % (s. auch Abb. 28B) verzeichnet werden. Der dabei bestehende Unterschied zur Kontrollgruppe ist signifikant (s. Abb. 28B). Dies entspricht der Erwartung, da durch den gehemmten mCU weniger Ca^{2+} in den Mitochondrien (Biasutto et al., 2016) gespeichert werden konnte und folglich auch weniger Ca^{2+} durch andere Ca^{2+}-leitende Kanale (s. Kapitel 3.5) aus den Mitochondrien wieder abgegeben werden kann. Außerdem wurde in Experimenten von García-Rivas et al. (2006) gezeigt, dass die Verabreichung von *RU360* auch die Depolarisation der Mitochondrien durch die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) verhindert.

Dadurch könnte das deutliche Sinken der Ca^{2+}-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 28B) zu erklären sein, wobei der Standardfehler höher ist. Des Weiteren könnte auch die Möglichkeit bestehen, dass durch das lokal akkumulierte Ca^{2+} insgesamt die Zelle weniger Ca^{2+}-Aufnahme in die OSNs (Thayer et al., 1990) ermöglicht und hierdurch der Anstieg verzögert wird und es länger dauert, bis der Ruhepegel erreicht ist. Dies könnte auch eine Ursache dafür sein, warum die Verlaufskurve im Vergleich zur Kontrolle nach Erreichen des Maximum einen kontinuierlichen Abschwung aufweist und dann erst wieder ab einer Zeit von ca. 570 s langsam ansteigt, wobei der Standardfehler annähernd gleich bleibt. Im Vergleich zur Kontrollmessung (s. Abb. 27A) ist der Maximalwert für die Ca^{2+}-Fluoreszenz geringer und der Standardfehler wird ab einer Zeit von ca. 450 s offensichtlich kleiner. Die Abnahme des Standardfehler kann auch auf eine routiniertere Arbeitsweise des Versuchsdurchführenden zurückzuführen sein. Prinzipiell zeigen beide Kurvenverläufe aber einen sehr ähnlichen Verlauf. Das Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert (R) der Ca^{2+}-Fluoreszenz nach der Gabe von *RU360* und anschließender Verabreichung von *VUAA1* beträgt 0,25 ± 0,13 (s. Abb. 29B). Der Unterschied des R von der Ca^{2+}-Fluoreszenz zur Kontrollgruppe ist nicht signifikant (s. Abb. 29B). Dennoch soll darauf hingewiesen werden, dass die Abnahme von R im Vergleich zur Kontrollmessreihe auch dafür spricht, das z.B. das endoplasmatische Retikulum weniger Ca^{2+} freigeben könnte. Die Beziehungen zwischen beiden Zellorganellen sind in entsprechenden Studien (Rizzuto et al., 2009; Hayashi et al., 2009; Brito und Scorrano, 2010) nachgewiesen worden. Nach 194,5 ± 85,7 s (s. Abb. 29A) erreicht die Verlaufskurve der Ca^{2+}-Fluoreszenz einen Wert, der nur noch ein Drittel des Maximalwertes der Ca^{2+}-Fluoreszenz (s. Abb. 27C und Abb. 28B) aufweist. Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrollgruppe ist nicht signifikant, was auf den hohen Standardfehler bei der Tau-Berechnung zurückzuführen sein könnte. Prinzipiell hätten ggf. auch höhere Maximalwerte für die Ca^{2+}-Fluoreszenz als in der Kontrollgruppe erreicht werden können, da durch die Hemmung der mCU eigentlich mehr Ca^{2+} im Zytosol vorherrschen müsste (Babcock und Hille, 1998). Andererseits kann auch argumentiert werden, dass durch die Hemmung der mCU andere Ca^{2+}-Kanäle der Mitochondrien oder des endoplasmatischen Retikulums beeinflusst werden, um die normale Ca^{2+}-Homöostase aufrechtzuerhalten (Babcock und Hille, 1998). Trotz unterschiedlicher Betrachtungsweisen ist die Hypothese 1. b) zu bestätigen, auch wenn es einer genaueren Abklärung bedarf.

6.3 Hypothese 1. c) „Wenn die Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitäts-transitionspore (mPTP) erfolgt, dann ist mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen."

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse für die Teilhypothese 1.c) eigegangen. Es ist zu erkennen, dass die Zugabe des mPTP-Aktivators *Auranofin* (25 µM) einen mäßigen Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz um 8,2 ± 2,3 % (s. Abb. 27D und Abb. 28A) bis 200 s verursacht. Der Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit p = 0,037 signifikant (s. Abb. 28A). Nach der *Holms*-Korrektion liegt ein p-Wert von 0,15 und somit keine Signifikanz mehr vor. Diesbezüglich ist zu erwähnen, dass durch die alleinige Aktivierung des mPTP eine Steigerung der Ca^{2+}-Fluoreszenz zu erwarten war. Damit ist gemeint, das vermehrt Ca^{2+} durch das Öffnen der mPTP aus den Mitochondrien in das Zytosol der OSNs gelangen müsste und somit die $[Ca^{2+}]_i$ steige (Zoratti und Szabò, 1995). Dies ist folglich in der vorliegenden Studie auch geschehen. Eine mögliche Ursache, warum dies nicht in einer noch signifikanteren und unterscheidbareren Art und Weise geschah, könnte auf mögliche unbekannte Wechselwirkungen mit anderen Zellorganellen (z.B. endoplasmatischem Retikulum (Rizzuto et al., 2009)) zurückzuführen sein. Des Weiteren wurden durch *Auranofin* ggf. weitere Ca^{2+}-transportierende Ionenkanäle beeinflusst, die in die Homöostase bei OSNs eingebunden sind. Erfolgt dann die Applikation von *VUAA1* (100 µM), so ist nur noch ein geringer Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz auf einen Maximalwert von 77,1 ± 10,3 % (s. auch Abb. 28/B) im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 27A) zu verzeichnen. Der dabei bestehende Unterschied zur Kontrollgruppe ist signifikant (s. Abb. 28B). Dieser signifikante Unterschied entspricht der Erwartung, da durch die schon aktivierte mPTP ein gewisser Anteil an Ca^{2+} aus den Mitochondrien ausgeströmt ist (Biasutto et al., 2016). Dadurch, dass bereits vor der Stimulation der ORs mit *VUAA1* die Werte für die Ca^{2+}-Fluoreszenz anstiegen, deutet dieses Verhalten auf einen erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ im Zytosol der OSNs hin. Somit scheint eine Adaptation der ORs, d.h. Ionenkanäle schließen, im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 28B) erreicht zu sein. Durch die nach *Auranofin*-Gabe wahrscheinlich begonnene Adaptation, findet dann eine geringere Aufnahme von Ca^{2+} aus dem extrazellulärem Raum und intrazellulären Ca^{2+}-Speichern statt. Dadurch scheint das Sinken der Werte für die Ca^{2+}-Fluoreszenz um mehr als die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 28B) erklärbar zu sein. Nach dem Anstieg auf ein Maximum erfährt der Kurvenverlauf nur einen sehr leichten Abschwung und verbleibt dann bei einer nahezu konstanten Ca^{2+}-Fluoreszenz mit einem geringen Standardfehler (Abb. 27D) Der beschriebene Kurvenverlauf der Ca^{2+}-Fluoreszenz ist nachvollziehbar, da durch die Aktivierung der mPTP auch nach OR-Stimulation weiterhin viel Ca^{2+} aus den Mitochondrien auszuströmen scheint. Ein Abschwung gemäß der Kontrollgruppe wird vermutlich erst geschehen, wenn sich wenige bis keine Ca^{2+} in den Mitochondrien befinden.

Das Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert (R) der Ca^{2+}-Fluoreszenz nach der Gabe von *Auranofin* und anschließender Verabreichung von *VUAA1* beträgt 0,78 ± 0,11 (s. Abb. 29B). Der Unterschied des R von der Ca^{2+}-Fluoreszenz zur Kontrollgruppe ist signifikant (s. Abb. 29B). Dieses Ergebnis ist eindeutig, wiederspiegelt die in Abb. 27A/D dargestellte Situation und ist durch die zuvor geschilderten möglichen Ursachen begründbar. Nach 208,6 ± 126,5 s (s. Abb. 29A) erreicht die Verlaufskurve der Ca^{2+}-Fluoreszenz einen Wert, der Berechnungen zufolge etwa ein Drittel des Maximalwertes der Ca^{2+}-Fluoreszenz beträgt (s. Abb. 27D). Aus Abb. 29A ist somit zu erkennen, dass der Standardfehler vom Mittelwert von Tau am größten im Vergleich zu allen anderen Messreihen ist. Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrolle ist nicht signifikant (s. Abb. 29A). In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass die Rückkehr zum Ruheplateau länger dauert als bei der Kontrollgruppe. Aufgrund der vorangegangenen Schilderungen ist Hypothese 1.c) als zutreffend anzunehmen.

6.4 Hypothese 1. d) „Wenn die Hemmung der mitochondrialen Permeabilitäts-transitionspore (mPTP) erfolgt, dann ist nicht mit einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu rechnen.“

Die Teilhypothese 1.d) wird nachfolgend auf Grundlage der Ergebnisse aus Kapitel 5 diskutiert. Wie aus Abb. 27E ersichtlich wurde, erfolgt nach der Applikation des mPTP-Inhibitors *ABT-737* (100 nM) ein sehr geringer Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz um 3 ± 0,5 % (s. Abb. 28A). Der dabei auftretende Unterschied zur Kontrollgruppe ist nicht signifikant. Es wurde auch keine Änderung erwartet, da die alleinige Hemmung der mPTP keine direkte Veränderung der Ca^{2+}-Fluoreszenz zur Folge haben müsste. Dies ist damit zu begründen, das keine Ca^{2+} durch die mPTP aus den Mitochondrien gelangen und somit die $[Ca^{2+}]_i$ im Zytosol des OSNs gleich bleibt (Zoratti und Szabò, 1995) oder sinkt. Nach der Gabe von *VUAA1* (100 µM) kann ein starker und sprunghafter Anstieg der Ca^{2+}-Fluoreszenz auf einen Maximalwert von 173,8 ± 22,26 % (s. Abb. 28B) verzeichnet werden. Der dabei bestehende Unterschied zur Kontrollgruppe ist nicht signifikant (s. Abb. 28B). Dies entspricht der Erwartung und ist mit der Tatsache zu begründen, dass die mPTP auch im regulären Zustand erst öffnet, wenn die mitochondriale Ca^{2+}-Ladung eine bestimmte Grenze überschreitet und Ca^{2+} zur Homöostase benötigt wird (Babcock und Hille, 1998). Des Weiteren ist die mPTP nicht der Hauptakteur, der in der Physiologie der Homöostase bei Geruchsantworten benötigt wird (Babcock und Hille, 1998). Unter bestimmten Umständen kann sich die mPTP trotzdem vorübergehend in einem Modus mit niedriger Ionenleitfähigkeit öffnen, um selektivere Ionenflüsse zu ermöglichen (Ichas et al., 1997).

Der trotzdem etwas geringere Maximalwert der Ca^{2+}-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 27A/E und Abb. 28B) ist damit zu erklären, das ein gewisser Anteil an Ca^{2+} in den Mitochondrien verbleibt und somit und nicht in das Zytoplasma abgegeben wird (Biasutto et al., 2016). Nachdem das Maximum erreicht ist, erfährt die Verlaufskurve einen kontinuierlichen Abschwung und steigt dann wieder ab einer Zeit von ca. 450 s langsam an, wobei der Standardfehler größer wird. Im Vergleich zur Kontrollmessung (s. Abb. 27A und Abb. 28B) ist der Maximalwert der Ca^{2+}-Fluoreszenz geringer und der Standardfehler wird ab einer Zeit von ca. 450 s offensichtlich kleiner. Dieser kleinere Standardfehler mag vor allem daran liegen, dass der Versuchsdurchführende bei der fünften Messreihe über ein erhebliches Maß an vermehrter Routine verfügte. Das Verhältnis zwischen Maximal- und Minimalwert (R) der Ca^{2+}-Fluoreszenz nach der Gabe von *ABT-737* und anschließender Verabreichung von *VUAA1* beträgt 0,38 ± 0,03 (s. Abb. 29B). Der Unterschied des R von der Ca^{2+}-Fluoreszenz zur Kontrollgruppe ist dem *ungepaarten t*-Test zufolge nicht signifikant (s. Abb. 29B) und ließ sich auch schon aus den Grafiken A/E der Abb. 27 schlussfolgern. Nach 100,3 ± 15,5 s (s. Abb. 29A) erreicht die Verlaufskurve der Ca^{2+}-Fluoreszenz einen Wert, der nur noch ein Drittel des Maximalwertes von der Ca^{2+}-Fluoreszenz (s. Abb. 27E und Abb. 28B) beträgt. Hierbei auftretenden Vorgänge in den OSNs sind mit den gleichen Ausführungen, wie zur Kontrollgruppe begründbar. Die Mehrzahl der Ergebnisse aus der statistischen Auswertung sprechen dafür, dass die Teilhypothese 1.d) angenommen werden kann.

Nach der Diskussion der Teilhypothesen ist nun auch ein Rückschluss auf die Haupthypothese möglich. Dadurch, dass alle Teilhypothesen bestätig werden konnten, ist ein Grundstein für den Beweis der Hypothese gelegt, dass eine Veränderung der mitochondrialen Funktion zu einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz führt.

Das Auftreten von zufälligen und systematischen Fehlern ist nahezu auszuschließen, da sich detailliert an die Durchführung, gemäß Kapitel 4.4, gehalten wurde. Des Weiteren unterlagen alle Messergebnisse einer Plausibilitätskontrolle.

7 Zusammenfassung

Der Überbegriff für das Erkennen chemischer Substanzen in der Umwelt von Organismen lautet Chemorezeption (Menco et al., 2004). Für die Aufnahme eines Geschmacks- oder Duftreizes bedarf es Rezeptoren, die von Neuronen exprimiert und in die Dendritenmembran eingebaut sind (Azevedo et al., 2009). Die Erforschung und Entschlüsselung der einzelnen Abläufe und Mechanismen ist eine Aufgabe der Neurobiologie (Triebel, 2018). Als Modellorganismen kommen hierbei verschiedenste Insekten, wie die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zum Einsatz (Castle et al., 1906). Neurobiologisch betrachtet, besteht ihr Vorteil darin, dass sie trotz der Komplexität des Nervensystems eine überschaubare Anzahl von Nervenzellen aufweist (Janning und Knust, 2004). Bezüglich ihres Duftverhaltens konnte nachgewiesen werden, dass auch noch geringste Mengen relevanter Duftstoffe (Mukunda et al., 2016) ausreichen, um z.B. Nahrung, Artgenossen oder Feinde wahrzunehmen und eine Duftorientierung (Steiner, 1953) zu gewährleisten. Bei Insekten kann eine kurze Exposition gegenüber Sexualpheromonen zu einer kurzzeitigen, als auch langfristigen Steigerung der Empfindlichkeit von Geruchsrezeptoren (ORs) bezüglich derartiger Pheromone führen (Anderson et al., 2007). Für Säugetiere wurde berichtet, dass die durch **Mitochondrien** gesteuerte Ca^{2+}-Mobilisierung eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung des breiten dynamischen Antwortbereichs und der Empfindlichkeit olfaktorischer sensorischer Neurone (OSNs) spielt (Fluegge et al., 2012). Hinsichtlich der Sensitisierung von ORs bei Insekten ist die Beteiligung der Mitochondrien bisher ungeklärt (Mukunda et al., 2016) und wirft offene Fragen auf.

Daher bestand das Ziel dieser Masterarbeit in der Untersuchung des mitochondrialen Einflusses auf die Duftantwort der OSNs bei ***Drosophila melanogaster***. Diesbezüglich erfolgte die pharmakologische Beeinflussung von Proteinkomplexen, die in den Ca^{2+}-Import (mitochondrialer Ca^{2+}-Uniporter (mCU)) und Ca^{2+}-Export (mitochondriale Permeabilitätstransitionspore (mPTP)) in OSNs eingebunden sind (Zoratti et al., 1995). Hierfür wurde bei der vorliegenden Studie ein prospektives, experimentelles, bivariates, kontrolliertes und offenes Studiendesign gewählt. Es erfolgten **Antennenpräparationen**, gemäß Mukunda et al. (2014), die den genetisch kodierten Ca^{2+}-Indikator „GCaMP6f“ (Nakai et al., 2001) in Orco-exprimierenden OSNs aufwiesen. Anschließend wurden ex-vivo fluoreszenzoptische Messungen mittels ***Ca^{2+}-Imaging*** durchgeführt. Währenddessen erfolgte, je nach Messreihe (s. Tab. 3), die Applikation diverser Pharmaka nach 100 s und des Agonisten *VUAA1* (100 µM) nach 200 s. Als Kontrollgruppe dienten Antennenpräparationen, die mit *DMSO* (100 µM) und *VUUA1* in Kontakt gebracht wurden. Zur Aktivierung des mCU kam *Spermin* (10 µM) zum Einsatz. Während die Hemmung des mCU mit *RU360* (5 µM) erfolgte. Die Aktivierung der mPTP geschah mit *Auranofin* (25 µM), wobei für die Inhibition *ABT-737* (100 nM) benutzt wurde.

Als Ergebnis konnten unteranderem signifikante Unterschiede für die Maxima der prozentualen Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) in OSNs zwischen der Kontrollgruppe und den Messreihen (s. Abb. 28) für den mPTP-Aktivator *Auranofin* (25 µM), den mCU-Aktivator *Spermin* (10 µM) und den mCU-Inhibitor *RU360* (5 µM) festgestellt werden. Die Unterschiede bestehen vor allem in einer um ca. die Hälfte verminderten Intensität der Ca^{2+}-Fluoreszenz. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Ca^{2+}-Fluoreszenz nach *VUAA1*-Gabe bei der Messreihe für *Spermin* und *Auranofin* (s. Abb. 29B) signifikant weniger sinkt, als bei der Kontrollgruppe. Des Weiteren wurde für den mPTP-Inhibitor *ABT-737* (100 nM) kein signifikanter Einfluss auf die Duftantwort von OSNs nachgewiesen (Abb. 29B).

Aus der Auswertung der Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass diese Masterarbeit die ersten Nachweise dafür liefert, dass die pharmakologische Modulation des mCU oder die Aktivierung der mPTP zu einer reduzierten Duftantwort der OSNs von *Drosophila melanogaster* führt. Es liegt somit auch eine Beteiligung der Mitochondrien bei der Insekten-ORs-Sensitisierung nahe. Jedoch bedarf es weiterer Tests mit anderen Modulatoren (s. Tab. 6 in Kapitel 8) und ggf. größerer Fallzahl.

8 Schlussfolgerung und Ausblick

Aus den Ausführungen in Kapitel 5 und 6 ergeben sich Hinweise dafür, dass eine Veränderung der mitochondrialen Funktion zu einer veränderten Antwort der OSNs auf einen Duftreiz führt. Insbesondere scheint dieser Umstand für den mCU-Aktivator *Spermin*, den mCU-Inhibitor *RU360* und den mPTP-Aktivator *Auranofin* zutreffend zu sein. Auch die Teilhypothese 1.d), dass die Hemmung der mPTP keine veränderte Antwort der OSNs auf einen Duftreiz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe führt, konnte mit Hilfe von *ABT-737* bestätigt werden. Eine generelle Aussage über die Modulation der mCU und der mPTP ist jedoch nicht möglich. Hierzu müssen weitere Tests mit anderen Modulatoren erfolgen. Einige Beispiele hierfür sind in Tab. 6 zusammengetragen und könnten eine Grundlage für künftige Folgestudien bilden.

Tab. 6: Beispiele für Modulatoren mitochondrialer Proteine in der Plasmamembran

	mitochondrialer Ca^{2+}-Uniporter (mCU)	**mitochondriale Permeabilitäts-transitionspore (mPTP)**
Aktivator	- Kaempferol[1] - 4,4′,4″-(4-Propyl-[1H]-Pyrazole-1,3,5-Triyl)-Trisphenol (PPT)[2]	- Citrinin (HB3839)[3] - Anorganisches Polyphosphat (PolyP)[4]
Inhibitor	- DS16570511[5] - KB-R7943-Mesylat[6]	- Rotenon[7] - Olesoxim (TRO19622)[8]
Quellen:	[1]Hamilton et al. (2018), [2]Vay et al. (2007), [3]Da Lozzo et al. (1998), [4]Solesio et al. (2016), [5]Kon et al. (2017), [6]Santo-Domingo et al. (2007), [7]Li et al. (2003), [8]Bordet et al. (2010)	

Des Weiteren könnte in weiteren Studien mit differenten Stoffmengenkonzentrationen experimentiert werden, um Schwellenwertbestimmungen erfolgen zu lassen. Ebenso könnten auch andere Ionentransportvorrichtungen der Mitochondrien (s. Kapitel 3.5) eine Modulation erfahren. So wird beispielweise der Na^+/Ca^{2+}-Austauscher (mNCE) mit CGP-37157 (Hamilton et al., 2018) gehemmt. Diesbezüglich sind auch gleichzeitige Modulierungen der verschiedenen mitochondrialen Ionenkanäle, wie der mCU und des mNCE mit KB-R7943-Mesylat (Santo-Domingo et al., 2007) möglich. Auch die Wechselwirkungen zwischen Mitochondrien und anderen Zellorganellen sind von Interesse. So wurde z.B. von Vay et al. (2007) nachgewiesen, dass die Hemmung des mNCE zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt. Auch für die Untersuchung des Sensitisierungsprozesses bei ORs können die Ergebnisse dieser Masterarbeit hilfreich sein. Diesbezüglich könnte beispielsweise ein ähnlicher Versuchsaufbau, wie bei Mukunda et al. (2016) in Verbindung zu Mitochondrien beeinflussenden Pharmaka erfolgen. Hierdurch würde auch eine Verbindung zwischen *Patch-Clamp*-Versuchen und *Ca^{2+}-Imaging* herstellbar. Des Weiteren wäre eine Steigerung der untersuchten Antennenzahl pro Pharmakon von Vorteil, um ein noch valideres Ergebnis zu erzielen. Diesbezüglich könnte auch eine noch definierte Fallzahlplanung von Vorteil sein. Ebenso ist die Schnitttechnik über der Arista der Antenne (s. Kapitel 4.4.1) durch weiteres Training des Versuchsdurchführenden zu perfektionieren, sodass unter Umständen noch homogenere Ergebnisse zu erzielen wären. Denkbar wäre auch ein zukünftig automatisierter Antennenpräparationsprozess, der jedes Mal Ergebnisse mit gleichbleibender Qualität liefern würde. Bei einer weiterführenden Studie wäre es auch sinnvoll, die Auswertung der Ca^{2+}-Fluoreszenz für die einzelnen Zellkompartimente der OSNs (ODS, IDS, Soma, s. Kapitel 3.4.2) getrennt voneinander durchzuführen. Bisher muss die Auswahl der ROIs manuell erfolgen. Sollte in Zukunft eine Möglichkeit geschaffen werden dies automatisch erfolgen zu lassen, so könnte gleichbleibend eine präzise Auswahl der ROIs geschehen. Folglich wäre ggf. eine große Zeitersparnis und Minimierung von Fehlerquellen möglich. Des Weiteren wäre eine automatisierte Fokussierung des Mikroskops von Vorteil, die es erlaube auf eine Ebene in der Antennenpräparation scharf zu stellen, die die OSNs am besten abbildet. Somit könnten möglichst gleich viele ROIs in Neuronen markiert und zur Auswertung herangezogen werden. Neben diesen beschriebenen Wunschvorstellungen in der rein technischen Verfahrensweise, könnte auch die bisher geläufige manuelle Applikation der Testsubstanzen verbessert und standardisiert werden. So wäre es wünschenswert, dass die Verabreichung der Pharmaka über eine spezielle technische Vorrichtung geschehe. Dadurch wäre gewährleistet, dass die Gabe jedes Pharmakons immer zentral und zu genau definierten Zeiten erfolgt. Dieses präzisere Vorgehen könnte weitere Fehlerquellen reduzieren und ein Öffnen der Klappe des Messplatzes (s. Abb. 22) vermeiden. Ebenso könnte das Anmischen des Testsubstanzen einen Automatisierungsprozess durchlaufen.

Literaturverzeichnis

ABUIN, L., B. BARGETON, M.H. ULBRICH, E.Y. ISACOFF, S. KELLENBERGER und R. BENTON, 2011. Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors [online]. *Neuron*, **69**(1), 44-60. ISSN 0896-6273. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neuron.2010.11.042

AI, M., S. MIN, Y. GROSJEAN, C. LEBLANC, R. BELL, R. BENTON und G.S.B. SUH, 2010. Acid sensing by the Drosophila olfactory system [online]. *Nature*, **468**(7324), 691-695. ISSN 0028-0836. Verfügbar unter: doi:10.1038/nature09537

ANDERSON, P., B.S. HANSSON, U. NILSSON, Q. HAN, M. SJÖHOLM, N. SKALS und S. ANTON, 2007. Increased behavioral and neuronal sensitivity to sex pheromone after brief odor experience in a moth [online]. *Chemical senses*, **32**(5), 483-491. Chemical senses. Verfügbar unter: doi:10.1093/chemse/bjm017

AULUCK, P.K., H.Y.E. CHAN, J.Q. TROJANOWSKI, V.M.Y. LEE und N.M. BONINI, 2002. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease [online]. *Science*, **295**(5556), 865-868. ISSN 0036-8075. Verfügbar unter: doi:10.1126/science.1067389

AZEVEDO, F.A.C., L.R.B. CARVALHO, L.T. GRINBERG, J.M. FARFEL, R.E.L. FERRETTI, R.E.P. LEITE, W. JACOB FILHO, R. LENT und S. HERCULANO-HOUZEL, 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain [online]. *The Journal of comparative neurology*, **513**(5), 532-541. The Journal of comparative neurology. Verfügbar unter: doi:10.1002/cne.21974.

BABCOCK, D.F. und B. HILLE, 1998. Mitochondrial oversight of cellular Ca^{2+}-signaling [online]. *Current Opinion in Neurobiology*, **8**(3), 398-404. ISSN 09594388 [Zugriff am: 15. November 2018]. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0959-4388(98)80067-6

BACHMANN, M., R. COSTA, R. PERUZZO, E. PROSDOCIMI, V. CHECCHETTO und L. LEANZA, 2018. Targeting Mitochondrial Ion Channels to Fight Cancer [online]. *International journal of molecular sciences*, **19**(7). International journal of molecular sciences. Verfügbar unter: doi:10.3390/ijms19072060

BADSHA, F., P. KAIN, S. PRABHAKAR, S. SUNDARAM, R. PADINJAT, V. RODRIGUES und G. HASAN, 2012. Mutants in Drosophila TRPC channels reduce olfactory sensitivity to carbon dioxide [online]. *PloS one*, **7**(11), e49848. PloS one. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pone.0049848

BALLINGER, D.G. und S. BENZER, 1989. Targeted gene mutations in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**(23), 9402-9406.

BARGMANN, C.I., 2006. Comparative chemosensation from receptors to ecology [online]. *Nature*, **2006**(444), 295-301. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/nature05402

BARON, K.T. und S.A. THAYER, 1997. CGP37157 modulates mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *European journal of pharmacology*, **340**(2-3), 295-300.

BASKETT, T.F., 2003. The resuscitation greats. Sydney Ringer and lactated Ringer's solution. *Resuscitation*, **58**(1), 5-7.

BENTON, R., S. SACHSE, S.W. MICHNICK und L.B. VOSSHALL, 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo [online]. *PLoS biology*, **4**(2), e20. PLoS biology. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pbio.0040020

BIASUTTO, L., M. AZZOLINI, I. SZABÒ und M. ZORATTI, 2016. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016 [online]. An update. *Biochimica et biophysica acta*, **1863**(10), 2515-2530. ISSN 0006-3002. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.bbamcr.2016.02.012

BORDET, T., P. BERNA, J.-L. ABITBOL und R.M. PRUSS, 2010. Olesoxime (TRO19622) [online]. A Novel Mitochondrial-Targeted Neuroprotective Compound. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, **3**(2), 345-368. ISSN 1424-8247. Verfügbar unter: doi:10.3390/ph3020345

BRAYTON, C.F., 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO). A review. *The Cornell veterinarian*, **76**(1), 61-90.

BRITO, O.M. de und L. SCORRANO, 2010. An intimate liaison [online]. Spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *The EMBO journal*, **29**(16), 2715-2723. The EMBO journal. Verfügbar unter: doi:10.1038/emboj.2010.177

BUDDE, T., S. MEUTH und H.-C. PAPE, 2002. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels [online]. *Nature reviews. Neuroscience*, **3**(11), 873-883. ISSN 1471-0048. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrn959

BUTTERWICK, J.A., J. DEL MÁRMOL, K.H. KIM, M.A. KAHLSON, J.A. ROGOW, T. WALZ und V. RUTA, 2018. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco [online]. *Nature*, **560**(7719), 447-452. ISSN 0028-0836. Verfügbar unter: doi:10.1038/s41586-018-0420-8

CASTLE, W.E., F.W. CARPENTER, A.H. CLARK, S.O. MAST und W.M. BARROWS, 1906. The Effects of Inbreeding, Cross-Breeding, and Selection upon the Fertility and Variability of Drosophila [online]. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, **41**(33), 731. ISSN 01999818. Verfügbar unter: doi:10.2307/20022155

CHATTERJEE, A., G. ROMAN und P.E. HARDIN, 2009. Go contributes to olfactory reception in Drosophila melanogaster [online]. *BMC physiology*, **9**, 22. BMC physiology. Verfügbar unter: doi:10.1186/1472-6793-9-22

CHEN, T.-W., T.J. WARDILL, Y. SUN, S.R. PULVER, S.L. RENNINGER, A. BAOHAN, E.R. SCHREITER, R.A. KERR, M.B. ORGER, V. JAYARAMAN, L.L. LOOGER, K. SVOBODA und D.S. KIM, 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity [online]. *Nature*, **499**(7458), 295-300. ISSN 0028-0836. Verfügbar unter: doi:10.1038/nature12354

CORCORAN, J.A., Y. SONNTAG, M.N. ANDERSSON, U. JOHANSON und C. LÖFSTEDT, 2018. Endogenous insensitivity to the Orco agonist VUAA1 reveals novel olfactory receptor complex properties in the specialist fly Mayetiola destructor [online]. *Scientific reports*, **8**(1), 3489. Scientific reports. Verfügbar unter: doi:10.1038/s41598-018-21631-3

CROSET, V., R. RYTZ, S.F. CUMMINS, A. BUDD, D. BRAWAND, H. KAESSMANN, T.J. GIBSON und R. BENTON, 2010. Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction [online]. *PLoS genetics*, **6**(8), e1001064. PLoS genetics. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pgen.1001064

DA LOZZO, E.J., M.B.M. OLIVEIRA und E.G.S. CARNIERI, 1998. Citrinin-induced mitochondrial permeability transition [online]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **12**(5), 291-297. ISSN 1095-6670. Verfügbar unter: doi:10.1002/(SICI)1099-0461(1998)12:5<291::AID-JBT5>3.0.CO;2-G

DAVID, N.A., 1972. The pharmacology of dimethyl sulfoxide [online]. *Annual review of pharmacology*, **12**, 353-374. ISSN 0066-4251. Verfügbar unter: doi:10.1146/annurev.pa.12.040172.002033

DEKKER, T., I. IBBA, K.P. SIJU, M.C. STENSMYR und B.S. HANSSON, 2006. Olfactory shifts parallel superspecialism for toxic fruit in Drosophila melanogaster sibling, D. sechellia [online]. *Current Biology*, **16**(1), 101-109. ISSN 09609822. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cub.2005.11.075

DETTNER, K. und W. PETERS, Hg., 2010. *Lehrbuch der Entomologie.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. ISBN 978-3-8274-2617-8.

DUFFY, J.B., 2002. GAL4 system in Drosophila [online]. A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, **34**(1-2), 1-15. Genesis (New York, N.Y. : 2000). Verfügbar unter: doi:10.1002/gene.10150

ENDO, M., 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum [online]. *Physiological reviews*, **57**(1), 71-108. ISSN 0031-9333. Verfügbar unter: doi:10.1152/physrev.1977.57.1.71

FABIATO, A., 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum [online]. *The American journal of physiology*, **245**(1), C1-14. ISSN 0002-9513. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1

FINKLER, W., 1923. Kopftransplantation an Insekten [online]. *Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik*, **99**(1), 104-118. Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Verfügbar unter: doi:10.1007/BF02108510

FLUEGGE, D., L.M. MOELLER, A. CICHY, M. GORIN, A. WETH, S. VEITINGER, S. CAINARCA, S. LOHMER, S. CORAZZA, E.M. NEUHAUS, W. BAUMGARTNER, J. SPEHR und M. SPEHR, 2012. Mitochondrial Ca($^{2+}$) mobilization is a key element in olfactory signaling [online]. *Nature neuroscience*, **15**(5), 754-762. Nature neuroscience. Verfügbar unter: doi:10.1038/nn.3074

GARCÍA-RIVAS, G.d.J., K. CARVAJAL, F. CORREA und C. ZAZUETA, 2006. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo [online]. *British journal of pharmacology*, **149**(7), 829-837. ISSN 0007-1188. Verfügbar unter: doi:10.1038/sj.bjp.0706932

GETAHUN, M.N., D. WICHER, B.S. HANSSON und S.B. OLSSON, 2012. Temporal response dynamics of Drosophila olfactory sensory neurons depends on receptor type and response polarity [online]. *Frontiers in cellular neuroscience*, **6**, 54. ISSN 1662-5102. Verfügbar unter: doi:10.3389/fncel.2012.00054

GETAHUN, M.N., M. THOMA, S. LAVISTA-LLANOS, I. KEESEY, R.A. FANDINO, M. KNADEN, D. WICHER, S.B. OLSSON und B.S. HANSSON, 2016. Intracellular regulation of the insect chemoreceptor complex impacts odour localization in flying insects [online]. *The Journal of experimental biology*, **219**(Pt 21), 3428-3438. The Journal of experimental biology. Verfügbar unter: doi:10.1242/jeb.143396

GETAHUN, M.N., S.B. OLSSON, S. LAVISTA-LLANOS, B.S. HANSSON und D. WICHER, 2013. Insect odorant response sensitivity is tuned by metabotropically autoregulated olfactory receptors [online]. *PloS one*, **8**(3), e58889. PloS one. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pone.0058889

GONZALEZ, S., J. BERTHELOT, J. JINER, C. PERRIN-TRICAUD, R. FERNANDO, R. CHRAST, G. LENAERS und N. TRICAUD, 2016. Blocking mitochondrial calcium release in Schwann cells prevents demyelinating neuropathies [online]. *The Journal of clinical investigation*, **126**(3), 1023-1038. The Journal of clinical investigation. Verfügbar unter: doi:10.1172/JCI84505

GYULKHANDANYAN, A.V., A. MUTLU, J. FREEDMAN und V. LEYTIN, 2015. Mitochondrial permeability transition pore (MPTP)-dependent and -independent pathways of mitochondrial membrane depolarization, cell shrinkage and microparticle formation during platelet apoptosis [online]. *British journal of haematology*, **169**(1), 142-145. British journal of haematology. Verfügbar unter: doi:10.1111/bjh.13180

HALLEM, E.A. und J.R. CARLSON, 2006. Coding of odors by a receptor repertoire [online]. *Cell*, **125**(1), 143-160. ISSN 0092-8674. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cell.2006.01.050

HALTY-DELEON, L., B.S. HANSSON und D. WICHER, 2018. The Drosophila melanogaster Na^+/Ca^{2+} Exchanger CALX Controls the Ca^{2+} Level in Olfactory Sensory Neurons at Rest and After Odorant Receptor Activation [online]. *Frontiers in cellular neuroscience*, **12**(12), 186. ISSN 1662-5102. Verfügbar unter: doi:10.3389/fncel.2018.00186

HAMILTON, S., R. TERENTYEVA, T.Y. KIM, P. BRONK, R.T. CLEMENTS, J. O-UCHI, G. CSORDÁS, B.-R. CHOI und D. TERENTYEV, 2018. Pharmacological Modulation of Mitochondrial Ca^{2+} Content Regulates Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release via Oxidation of the Ryanodine Receptor by Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species [online]. *Frontiers in physiology*, **9**, 1831. Frontiers in physiology. Verfügbar unter: doi:10.3389/fphys.2018.01831

HANSSON, B.S. und M.C. STENSMYR, 2011. Evolution of insect olfaction [online]. *Neuron*, **72**(5), 698-711. ISSN 0896-6273. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neuron.2011.11.003

Hansson, Bill S. [online] [Zugriff am: 29. März 2018]. Verfügbar unter: https://www.mpg.de/382649/chemische_oekologie_wissM23

HAYASHI, T., R. RIZZUTO, G. HAJNOCZKY und T.-P. SU, 2009. MAM [online]. More than just a housekeeper. *Trends in cell biology*, **19**(2), 81-88. Trends in cell biology. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.tcb.2008.12.002

HOPPE, U.C., 2010. Mitochondrial calcium channels [online]. *FEBS letters*, **584**(10), 1975-1981. FEBS letters. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.febslet.2010.04.017

ICHAS, F., L.S. JOUAVILLE und J.P. MAZAT, 1997. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*, **89**(7), 1145-1153.

IGNATIOUS RAJA, J.S., N. KATANAYEVA, V.L. KATANAEV und C.G. GALIZIA, 2014. Role of Go/i subgroup of G proteins in olfactory signaling of Drosophila melanogaster [online]. *The European journal of neuroscience*, **39**(8), 1245-1255. The European journal of neuroscience. Verfügbar unter: doi:10.1111/ejn.12481

IMMING, C., 2014. *Auranofin* [online] [Zugriff am: 29. Januar 2019]. Verfügbar unter: https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-01-03814

ITOH, T., F. YOKOHARI, T. TANIMURA und Y. TOMINAGA, 1991. External morphology of sensilla in the sacculus of an antennal flagellum of the fruit fly Drosophila melanogaster Meigen (Diptera [online]. Drosophilidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **20**(4-5), 235-243. ISSN 00207322. Verfügbar unter: doi:10.1016/0020-7322(91)90013-Y

JANNING, W. und E. KNUST, 2004. *Genetik. Allgemeine Genetik, Molekulare Genetik, Entwicklungsgenetik ; 29 Tabellen.* Stuttgart: Thieme. ISBN 3131287713.

JONES, P.L., G.M. PASK, D.C. RINKER und L.J. ZWIEBEL, 2011. Functional agonism of insect odorant receptor ion channels [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(21), 8821-8825. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.1102425108

JONES, W.D., P. CAYIRLIOGLU, I.G. KADOW und L.B. VOSSHALL, 2007. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in Drosophila [online]. *Nature*, **445**(7123), 86-90. ISSN 0028-0836. Verfügbar unter: doi:10.1038/nature05466

KAIDERY, N.A., R. BANERJEE, L. YANG, N.A. SMIRNOVA, D.M. HUSHPULIAN, K.T. LIBY, C.R. WILLIAMS, M. YAMAMOTO, T.W. KENSLER, R.R. RATAN, M.B. SPORN, M.F. BEAL, I.G. GAZARYAN und B. THOMAS, 2013. Targeting Nrf2-mediated gene transcription by extremely potent synthetic triterpenoids attenuate dopaminergic neurotoxicity in the MPTP mouse model of Parkinson's disease [online]. *Antioxidants & redox signaling*, **18**(2), 139-157. Antioxidants & redox signaling. Verfügbar unter: doi:10.1089/ars.2011.4491

KAISER, K. und S.F. GOODWIN, 1990. "Site-selected" transposon mutagenesis of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**(5), 1686-1690.

KAUPP, U.B., 2010. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities [online]. *Nature reviews. Neuroscience*, **11**(3), 188-200. ISSN 1471-0048. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrn2789

KETTLER, R., 2003. *Charakterisierung olfaktorischer Rezeptoren in Drosophila melanogaster* [Online]. Dissertation. Bochum [Zugriff am: 18. April 2018]. Verfügbar unter: https:// www.researchgate.net/profile/Raffael_Kettler/publication/40535337_Charakterisierung_ olfaktorischer_Rezeptoren_in_Drosophila_melanogaster/links/543cea3c0cf24ef33b765001/ Charakterisierung-olfaktorischer-Rezeptoren-in-Drosophila-melanogaster.pdf

KLINE, M.P., S.V. RAJKUMAR, M.M. TIMM, T.K. KIMLINGER, J.L. HAUG, J.A. LUST, P.R. GREIPP und S. KUMAR, 2007. ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells [online]. *Leukemia*, **21**(7), 1549-1560. ISSN 0887-6924. Verfügbar unter: doi:10.1038/sj.leu.2404719

KON, N., M. MURAKOSHI, A. ISOBE, K. KAGECHIKA, N. MIYOSHI und T. NAGAYAMA, 2017. DS16570511 is a small-molecule inhibitor of the mitochondrial calcium uniporter [online]. *Cell death discovery*, **3**, 17045. ISSN 2058-7716. Verfügbar unter: doi:10.1038/cddiscovery.2017.45

KONOPLEVA, M., R. CONTRACTOR, T. TSAO, I. SAMUDIO, P.P. RUVOLO, S. KITADA, X. DENG, D. ZHAI, Y.-X. SHI, T. SNEED, M. VERHAEGEN, M. SOENGAS, V.R. RUVOLO, T. MCQUEEN, W.D. SCHOBER, J.C. WATT, T. JIFFAR, X. LING, F.C. MARINI, D. HARRIS, M. DIETRICH, Z. ESTROV, J. MCCUBREY, W.S. MAY, J.C. REED und M. ANDREEFF, 2006. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia [online]. *Cancer cell*, **10**(5), 375-388. ISSN 1535-6108. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.ccr.2006.10.006

KRIEGER, J. und H. BREER, 1999. Olfactory Reception in Invertebrates [online]. *Science*, **286**(5440), 720-723. ISSN 0036-8075. Verfügbar unter: doi:10.1126/science.286.5440.720

KUGLER, H., 1972. Zur Bestäubung von Salvia sclarea L. durch Holzbienen (Xylocopa violacea L.) [online]. ö*sterreichische Botanische Zeitschrift*, **120**(1-2), 77-85. ISSN 0378-2697. Verfügbar unter: doi:10.1007/BF01373259

KUMAR, B.N., R.W. TAYLOR, G.M. PASK, L.J. ZWIEBEL, R.D. NEWCOMB und D.L. CHRISTIE, 2013. A conserved aspartic acid is important for agonist (VUAA1) and odorant/tuning receptor-dependent activation of the insect odorant co-receptor (Orco) [online]. *PloS one*, **8**(7), e70218. PloS one. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pone.0070218

LANGENBUCH, R., 1954. Zur Frage der Ursache für die Resistenz von Insekten gegenüber lipidlöslichen Insektiziden [online]. *Die Naturwissenschaften*, **41**(3), 70. ISSN 0028-1042. Verfügbar unter: doi:10.1007/BF00634190

LE XU, J.P. EU, G. MEISSNER und J.S. STAMLER, 1998. Activation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) by Poly-S-Nitrosylation [online]. *Science*, **279**(5348), 234-237. ISSN 0036-8075. Verfügbar unter: doi:10.1126/science.279.5348.234

LI, N., K. RAGHEB, G. LAWLER, J. STURGIS, B. RAJWA, J.A. MELENDEZ und J.P. ROBINSON, 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production [online]. *The Journal of biological chemistry*, **278**(10), 8516-8525. ISSN 0021-9258. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.M210432200

LITSKY, M.L. und D.R. PFEIFFER, 1997. Regulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by external adenine nucleotides [online]. The uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. *Biochemistry*, **36**(23), 7071-7080. ISSN 0006-2960. Verfügbar unter: doi:10.1021/bi970180y

LIU, Y.-C., M.W. PEARCE, T. HONDA, T.K. JOHNSON, S. CHARLU, K.R. SHARMA, M. IMAD, R.E. BURKE, K.E. ZINSMAIER, A. RAY, A. DAHANUKAR, M. de BRUYNE und C.G. WARR, 2014. The Drosophila melanogaster phospholipid flippase dATP8B is required for odorant receptor function [online]. *PLoS genetics*, **10**(3), e1004209. PLoS genetics. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pgen.1004209

LOCKWOOD, A.P.M., 1961. “Ringer”, solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition [online]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **2**(4), 241-289. Comparative Biochemistry and Physiology. Verfügbar unter: doi:10.1016/0010-406X(61)90113-X

MARSH, J.L. und L.M. THOMPSON, 2004. Can flies help humans treat neurodegenerative diseases? [online]. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **26**(5), 485-496. ISSN 0265-9247. Verfügbar unter: doi:10.1002/bies.20029

MARTÍN, F., M.J. CHARRO und E. ALCORTA, 2001. Mutations affecting the cAMP transduction pathway modify olfaction in Drosophila. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, **187**(5), 359-370.

Max-Planck-Institute & Experten [online] [Zugriff am: 29. März 2018]. Verfügbar unter: https://www.mpg.de/11659628/forschungseinstiegsseite

MCDOWALL, J., 2015. *Calmodulin* [online]. 25 November 2015 [Zugriff am: 19. Januar 2019]. Verfügbar unter: http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_3/Page_1.htm

MENCO, B., M. WITT und E. MUGNAINI, 2004. The chemical senses, olfaction and taste [online]. A tribute to Al Farbman. *Journal of neurocytology*, **33**(6), 575-702. ISSN 0300-4864. Verfügbar unter: doi:10.1007/s11068-005-3326-y

MISSBACH, C., H.K. DWECK, H. VOGEL, A. VILCINSKAS, M.C. STENSMYR, B.S. HANSSON und E. GROSSE-WILDE, 2014. Evolution of insect olfactory receptors [online]. *eLife*, **3**, e02115. eLife. Verfügbar unter: doi:10.7554/eLife.02115

MORGAN, T.H., 1910. SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA [online]. *Science*, **32**(812), 120-122. ISSN 0036-8075. Verfügbar unter: doi:10.1126/science.32.812.120

MPI CE: Rezeption & Transduktion [online] [Zugriff am: 29. März 2018]. Verfügbar unter: https://www.ice.mpg.de/ext/index.php?id=622&L=1

MPI für chemische Ökologie [online] [Zugriff am: 29. März 2018]. Verfügbar unter: https://www.mpg.de/forschung/institute/chemische-oekologie

MUKUNDA, L., F. MIAZZI, S. KALTOFEN, B.S. HANSSON und D. WICHER, 2014. Calmodulin modulates insect odorant receptor function [online]. *Cell calcium*, **55**(4), 191-199. ISSN 1532-1991. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.ceca.2014.02.013

MUKUNDA, L., F. MIAZZI, V. SARGSYAN, B.S. HANSSON und D. WICHER, 2016. Calmodulin Affects Sensitization of Drosophila melanogaster Odorant Receptors [online]. *Frontiers in cellular neuroscience*, **10**, 1-17. ISSN 1662-5102. Verfügbar unter: doi:10.3389/fncel.2016.00028

NAKAGAWA, T., M. PELLEGRINO, K. SATO, L.B. VOSSHALL und K. TOUHARA, 2012. Amino acid residues contributing to function of the heteromeric insect olfactory receptor complex [online]. *PloS one*, **7**(3), e32372. PloS one. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pone.0032372

NAKAI, J., M. OHKURA und K. IMOTO, 2001. A high signal-to-noise $Ca^{(2+)}$ probe composed of a single green fluorescent protein [online]. *Nature biotechnology*, **19**(2), 137-141. ISSN 1087-0156. Verfügbar unter: doi:10.1038/84397

NEWMAN, T., C. SINADINOS, A. JOHNSTON, M. SEALEY und A. MUDHER, 2011. Using Drosophila models of neurodegenerative diseases for drug discovery [online]. *Expert opinion on drug discovery*, **6**(2), 129-140. Expert opinion on drug discovery. Verfügbar unter: doi:10.1517/17460441.2011.549124

NGUYEN, J.P., F.B. SHIPLEY, A.N. LINDER, G.S. PLUMMER, M. LIU, S.U. SETRU, J.W. SHAEVITZ und A.M. LEIFER, 2016. Whole-brain calcium imaging with cellular resolution in freely behaving Caenorhabditis elegans [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**(8), E1074-81. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.1507110112

NICHOLLS, D.G. und I.D. SCOTT, 1980. The role of mitochondria in the regulation of calcium ion transport in synaptosomes. *Biochemical Society transactions*, **8**(3), 264-266.

NIKOLAEV, V.O., M. BÜNEMANN, L. HEIN, A. HANNAWACKER und M.J. LOHSE, 2004. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation [online]. *The Journal of biological chemistry*, **279**(36), 37215-37218. ISSN 0021-9258. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.C400302200

NOLTE, A., N.W. FUNK, L. MUKUNDA, P. GAWALEK, A. WERCKENTHIN, B.S. HANSSON, D. WICHER und M. STENGL, 2013. In situ tip-recordings found no evidence for an Orco-based ionotropic mechanism of pheromone-transduction in Manduca sexta [online]. *PloS one*, **8**(5), e62648. PloS one. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pone.0062648

O'KANE, C.J. und W.J. GEHRING, 1987. Detection in situ of genomic regulatory elements in Drosophila [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**(24), 9123-9127. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.84.24.9123

PASK, G.M., P.L. JONES, M. RÜTZLER, D.C. RINKER und L.J. ZWIEBEL, 2011. Heteromeric Anopheline odorant receptors exhibit distinct channel properties [online]. *PloS one*, **6**(12), e28774. PloS one. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pone.0028774

PÉGARD, N.C., H.-Y. LIU, N. ANTIPA, M. GERLOCK, H. ADESNIK und L. WALLER, 2016. Compressive light-field microscopy for 3D neural activity recording [online]. *Optica*, **3**(5), 517. ISSN 2334-2536. Verfügbar unter: doi:10.1364/OPTICA.3.000517

PERRIMON und STERN, 1999. Pattern formation and developmental mechanisms unresolved issues of pattern formation. *Current opinion in genetics & development*, **9**(4), 387-389.

PIATER, J., 2012. Die industrielle Tierhaltung und Fleischproduktion und ihre globalen Auswirkungen. Unser täglich Fleisch – Herbsttagung 2011 in Löwenstein. *Unser Fromm Forum 16/2012*, 60-61.

QUINN, W.G., W.A. HARRIS und S. BENZER, 1974. Conditioned Behavior in Drosophila melanogaster [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71**(3), 708-712. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.71.3.708

REISERT, J., P.J. BAUER, K.-W. YAU und S. FRINGS, 2003. The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons [online]. *The Journal of general physiology*, **122**(3), 349-363. ISSN 0022-1295. Verfügbar unter: doi:10.1085/jgp.200308888

REMUND, U. und E.F. BOLLER, 1975. Qualitätskontrolle bei Insekten [online]. Messung von Flugparametern. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **78**(1-4), 113-126. ISSN 00442240. Verfügbar unter: doi:10.1111/j.1439-0418.1975.tb04161.x

RIESGO-ESCOVAR, J., D. RAHA und J.R. CARLSON, 1995. Requirement for a phospholipase C in odor response. Overlap between olfaction and vision in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(7), 2864-2868.

RILKE, R.M., 2004. *Die Gedichte. [nach der von Ernst Zinn besorgten Edition der Sämtlichen Werke].* 15. Aufl. Frankfurt am Main: Insel-Verl. ISBN 9783458143246.

RIZZUTO, R., S. MARCHI, M. BONORA, P. AGUIARI, A. BONONI, D. de STEFANI, C. GIORGI, S. LEO, A. RIMESSI, R. SIVIERO, E. ZECCHINI und P. PINTON, 2009. $Ca^{(2+)}$ transfer from the ER to mitochondria [online]. When, how and why. *Biochimica et biophysica acta*, **1787**(11), 1342-1351. ISSN 0006-3002. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.bbabio.2009.03.015

ROBERTSON, H.M. und L.B. KENT, 2009. Evolution of the gene lineage encoding the carbon dioxide receptor in insects [online]. *Journal of insect science (Online)*, **9**, 19. Journal of insect science (Online). Verfügbar unter: doi:10.1673/031.009.1901

SACHSE, S. und J. KRIEGER, 2011. Der Geruchsinn der Insekten – Primärprozesse der Duftstofferkennung und Kodierung [online]. *e-Neuroforum*, **17**(3), 3970. e-Neuroforum. Verfügbar unter: doi:10.1515/nf-2011-0303

SANTO-DOMINGO, J., L. VAY, E. HERNÁNDEZ-SANMIGUEL, C.D. LOBATÓN, A. MORENO, M. MONTERO und J. ALVAREZ, 2007. The plasma membrane Na^+/Ca^{2+} exchange inhibitor KB-R7943 is also a potent inhibitor of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter [online]. *British journal of pharmacology*, **151**(5), 647-654. ISSN 0007-1188. Verfügbar unter: doi:10.1038/sj.bjp.0707260

SARGSYAN, V., M.N. GETAHUN, S.L. LLANOS, S.B. OLSSON, B.S. HANSSON und D. WICHER, 2011. Phosphorylation via PKC Regulates the Function of the Drosophila Odorant Co-Receptor [online]. *Frontiers in cellular neuroscience*, **5**, 5. ISSN 1662-5102. Verfügbar unter: doi:10.3389/fncel.2011.00005

SATO, K., M. PELLEGRINO, T. NAKAGAWA, T. NAKAGAWA, L.B. VOSSHALL und K. TOUHARA, 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels [online]. *Nature*, **452**(7190), 1002-1006. ISSN 0028-0836. Verfügbar unter: doi:10.1038/nature06850

SCHLIEPER, C., 1928. Über die Helligkeitsverteilung im Spektrum bei verschiedenen Insekten [online]. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, **8**(2), 281-288. ISSN 0340-7594. Verfügbar unter: doi:10.1007/BF00340897

SCHMIDT, R.F., G. THEWS und F. LANG, Hg., 2000. *Physiologie des Menschen. Mit 96 Tabellen.* 28., korrigierte und aktualisierte Aufl. Berlin: Springer. Springer-Lehrbuch. ISBN 3540667334.

SCHWAERZEL, M., M. HEISENBERG und T. ZARS, 2002. Extinction Antagonizes Olfactory Memory at the Subcellular Level [online]. *Neuron*, **35**(5), 951-960. ISSN 0896-6273. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0896-6273(02)00832-2

SHANBHAG, S.R., B. MÜLLER und R.A. STEINBRECHT, 2000. Atlas of olfactory organs of Drosophila melanogaster [online]. *Arthropod Structure & Development*, **29**(3), 211-229. ISSN 14678039. Verfügbar unter: doi:10.1016/S1467-8039(00)00028-1

SHIGEKAZU, O., T. MASAHIRO und L. YUICHI, 2011. *Visualization and analysis of neural activity|IINO Laboratory* [online]. *Shigekazu Oda, Masahiro Tomioka and Yuichi Iino, Neuronal plasticity regulated by the insulin-like signaling pathway underlies salt chemotaxis learning in Caenorhabditis elegans. J Neurophysiol 27 April 2011.* 6 April 2018 [Zugriff am: 27. Januar 2019]. Verfügbar unter: http://molecular-ethology.bs.s.u-tokyo.ac.jp/labHP/E/EResearch/11.html

SHUKLA, S.P., C. PLATA, M. REICHELT, S. STEIGER, D.G. HECKEL, M. KALTENPOTH, A. VILCINSKAS und H. VOGEL, 2018. Microbiome-assisted carrion preservation aids larval development in a burying beetle [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**(44), 11274-11279. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.1812808115

SOLESIO, M.E., P.A. ELUSTONDO, E. ZAKHARIAN und E.V. PAVLOV, 2016. Inorganic polyphosphate (polyP) as an activator and structural component of the mitochondrial permeability transition pore [online]. *Biochemical Society transactions*, **44**(1), 7-12. ISSN 0300-5127. Verfügbar unter: doi:10.1042/BST20150206

SPRADLING, A. und G. RUBIN, 1982. Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes [online]. *Science*, **218**(4570), 341-347. ISSN 0036-8075. Verfügbar unter: doi:10.1126/science.6289435

STEINER, G., 1953. Zur Duftorientierung fliegender Insekten [online]. *Die Naturwissenschaften*, **40**(19), 514-515. ISSN 0028-1042. Verfügbar unter: doi:10.1007/BF00629075

STOSIEK, C., O. GARASCHUK, K. HOLTHOFF und A. KONNERTH, 2003. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(12), 7319-7324. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.1232232100

SUH, D.H., M.-K. KIM, H.S. KIM, H.H. CHUNG und Y.S. SONG, 2013. Mitochondrial permeability transition pore as a selective target for anti-cancer therapy [online]. *Frontiers in oncology*, **3**, 41. Frontiers in oncology. Verfügbar unter: doi:10.3389/fonc.2013.00041

SVICHAR, N., P. KOSTYUK und A. VERKHRATSKY, 1997. Mitochondria buffer Ca^{2+} entry but not intracellular Ca^{2+} release in mouse DRG neurones. *Neuroreport*, **8**(18), 3929-3932.

SZABO, T. und F. HUBER, Hg., 1970. *Elektrische Organe und Elektrorezeption bei Fischen. Nervöse Grundlagen der akustischen Kommunikation bei Insekten.* Wiesbaden: VS Verlag für Sozialwissenschaften. ISBN 978-3-663-01046-3.

THAYER, S.A. und R.J. MILLER, 1990. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *The Journal of physiology*, **425**, 85-115.

TRIEBEL, H.-D., 2018. *Zellbiologie und Stoffwechsel, Neurobiologie, Ökologie.* Hallbergmoos: Stark. Biologie-Kompakt / Hans-Dieter Triebel. 1. ISBN 9783849033248.

TRUDEAU, M.C. und W.N. ZAGOTTA, 2003. Calcium/calmodulin modulation of olfactory and rod cyclic nucleotide-gated ion channels [online]. *The Journal of biological chemistry*, **278**(21), 18705-18708. ISSN 0021-9258. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.R300001200

VAN HARREVELD, A., 1936. A Physiological Solution for Freshwater Crustaceans [online]. *Experimental Biology and Medicine*, **34**(4), 428-432. ISSN 1535-3702. Verfügbar unter: doi:10.3181/00379727-34-8647C

VARGHESE, E. und D. BÜSSELBERG, 2014. Auranofin, an anti-rheumatic gold compound, modulates apoptosis by elevating the intracellular calcium concentration ($Ca^{2+}I$) in mcf-7 breast cancer cells [online]. *Cancers*, **6**(4), 2243-2258. ISSN 2072-6694 [Zugriff am: 12. November 2018]. Verfügbar unter: doi:10.3390/cancers6042243

VAY, L., E. HERNÁNDEZ-SANMIGUEL, J. SANTO-DOMINGO, C.D. LOBATÓN, A. MORENO, M. MONTERO und J. ALVAREZ, 2007. Modulation of $Ca^{(2+)}$ release and $Ca^{(2+)}$ oscillations in HeLa cells and fibroblasts by mitochondrial $Ca^{(2+)}$ uniporter stimulation [online]. *The Journal of physiology*, **580**(Pt 1), 39-49. ISSN 0022-3751. Verfügbar unter: doi:10.1113/jphysiol.2006.126391

VERKHRATSKY, A. und A. SHMIGOL, 1996. Calcium-induced calcium release in neurones [online]. *Cell calcium*, **19**(1), 1-14. ISSN 1532-1991. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0143-4160(96)90009-3

WÄGELE, J.W., 2018. Das Insektensterben und die Versäumnisse der Wissenschaft [online]. *Biologie in unserer Zeit*, **48**(6), 347. Biologie in unserer Zeit. Verfügbar unter: doi:10.1002/biuz.201870602

WANG, C., N. XIE, Y. WANG, Y. LI, X. GE und M. WANG, 2015. Role of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Rat Hippocampal Neuronal Death After Pilocarpine-Induced Status Epilepticus [online]. *Neurochemical research*, **40**(8), 1739-1746. Neurochemical research. Verfügbar unter: doi:10.1007/s11064-015-1657-3

WEBER, E., 2018. Die Natur als Dienstleistungsbetrieb. In: E. WEBER, Hg. *Biodiversität. Warum wir ohne Vielfalt nicht leben können.* Berlin, Germany: Springer, S. 203-217. ISBN 978-3-662-55623-8.

WERTH, J.L. und S.A. THAYER, 1994. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **14**(1), 348-356.

WETZEL, C.H., H.J. BEHRENDT, G. GISSELMANN, K.F. STÖRTKUHL, B. HOVEMANN und H. HATT, 2001. Functional expression and characterization of a Drosophila odorant receptor in a heterologous cell system [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(16), 9377-9380. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.151103998

WHITE, R.J. und I.J. REYNOLDS, 1996. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons. An early signal specific to excitotoxin exposure. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**(18), 5688-5697.

WICHER, D., 2015. Olfactory signaling in insects. In: R. GLATZ, Hg. *Progress in molecular biology and translational science.* First edition. Waltham, Massachusetts: Academic Press, S. 37-54. ISBN 978-0-12-802912-1.

WICHER, D., R. SCHÄFER, R. BAUERNFEIND, M.C. STENSMYR, R. HELLER, S.H. HEINEMANN und B.S. HANSSON, 2008. Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels [online]. *Nature*, **452**(7190), 1007-1011. ISSN 0028-0836. Verfügbar unter: doi:10.1038/nature06861

WOHLGEMUTH, R., 1989. Überlebensdauer vorratsschädlicher Insekten in Getreidekühllägern [online]. *Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz*, **62**(6), 114-119. ISSN 0340-7330. Verfügbar unter: doi:10.1007/BF01903203

XIE, N., C. WU, C. WANG, X. CHENG, L. ZHANG, H. ZHANG und Y. LIAN, 2017. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter inhibits Aβ-induced apoptosis by reducing reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress in cultured microglia [online]. *Brain research*, **1676**, 100-106. Brain research [Zugriff am: 12. November 2018]. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.brainres.2017.08.035

YAO, C.A. und J.R. CARLSON, 2010. Role of G-proteins in odor-sensing and CO2-sensing neurons in Drosophila [online]. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**(13), 4562-4572. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. Verfügbar unter: doi:10.1523/JNEUROSCI.6357-09.2010

YEW, J.Y., 2016. *Basic principle of the GCaMP calcium imaging technique* [online] [Zugriff am: 27. Januar 2019]. Verfügbar unter: https://www.researchgate.net/figure/Basic-principle-of-the-GCaMP-calcium-imaging-technique-GCaMP5G-is-genetically-expressed_fig1_301702016

YU, T., C. CHEN, Y. SUN, H. SUN, T.-H. LI, J. MENG und X. SHI, 2015. ABT-737 sensitizes curcumin-induced anti-melanoma cell activity through facilitating mPTP death pathway [online]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **464**(1), 286-291. Biochemical and Biophysical Research Communications [Zugriff am: 12. November 2018]. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.144

ZOEBELEIN, G., 1956. Der Honigtau als Nahrung der Insekten [online]. Teil I. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **38**(4), 369-416. ISSN 00442240. Verfügbar unter: doi:10.1111/j.1439-0418.1956.tb01612.x

ZORATTI, M. und I. SZABÒ, 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et biophysica acta*, **1241**(2), 139-176.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lebenszyklus von *Drosophila* ... 4
Abb. 2: Anatomie der äußeren primären olfaktorischen Sinnesorgane der Fruchtfliege ... 6
Abb. 3: Weg eines Geruchsmoleküls aus der äußeren Umgebung zum Riechrezeptor ... 7
Abb. 4: Struktur der olfaktorischen Rezeptorproteine von Insekten ... 10
Abb. 5: Reaktion von OSNs, die verschiedene olfaktorische Rezeptortypen exprimieren, auf die Geruchsstimulation ... 12
Abb. 6: Signaltransduktion im Zusammenhang mit der Erfassung von Kohlendioxid durch GRs ... 12
Abb. 7: Aktivierung und Regulierung von ORs für die Duftwahrnehmung ... 13
Abb. 8: Aktivierung und Regulierung von Pheromon-ORs ... 14
Abb. 9: Beispiel für *Ca^{2+}-Imaging* bei einem Or22a (und GCaMP3.0) - exprimierenden OSN von Drosophila melanogaster in Gegenwart von 10 µM W7 ... 20
Abb. 10: Modell zur Erklärung der Sensitisierung von OSN in basikonischen Sensillen ... 21
Abb. 11: Transportwege von Ca^{2+} und H^+ entlang der inneren Mitochondrienmembran ... 23
Abb. 12: Beweise für eine schnelle Freigabe von zytoplasmatischen Ca^{2+} (Ca_c) in die Mitochondrien eines Neurons. ... 24
Abb. 13: Brutschrank der Fa. SNIJDERS SCIENTIFIC B.V. ... 30
Abb. 14: Fliegenentnahme aus Zuchtgefäß und Umsetzung in Transportplastikröhrchen 31
Abb. 15: Vorbereitung des Präparationsplatzes ... 31
Abb. 16: Arbeitsplatz am Präpariermikroskop ... 32
Abb. 17: Methode zur Entfernung der Antennen bei der Fruchtfliege ... 33
Abb. 18: Schneidevorgang bei einer einzelnen Antenne von *Drosophila melanogaster* ... 33
Abb. 19: Aktivierung des Kalziumindikatiors „GCaMP“ ... 35
Abb. 20: *Drosophila*-Antennenpräparation ... 35
Abb. 21: Grundprinzip der *Ca^{2+}-Imaging*-Technik bei GCaMP ... 36
Abb. 22: Messplatz für *Ca^{2+}-Imaging* ... 40
Abb. 23: Scharfgestellte OSNs in einer Antennenpräparation zu Beginn des *Ca^{2+}-Imaging*s ... 41
Abb. 24: Markierte Regionen des Interesses (ROIs) bei einer Antennenpräparation der Kontrollgruppe zum 70. Messzyklus im *Ca^{2+}-Imaging*. ... 42
Abb. 25: Darstellung der geänderten Fluoreszenzintensität der OSNs nach Verabreichung der zweiten Substanz im Vergleich zu Abb. 23. ... 43
Abb. 26: Grafische Darstellung der Fluoreszenzänderung während des *Ca^{2+}-Imaging*s unter Zugabe zweier Substanzen ... 43

Abb. 27: Ergebnisse der prozentualen Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) in OSNs bei differenter Pharmakagabe zu t = 100 s und der Applikation des Agonisten *VUAA1* (100 µM) zu t = 200 s 47

Abb. 28: Gegenüberstellung der Maxima der prozentualen Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) in OSNs nach differenter Pharmakagabe zu t = 100 s (A) und der Applikation des Agonisten *VUAA1* (100 µM) zu t = 200 s (B) 51

Abb. 29: Gegenüberstellung der Ergebnisse für (A) die Zeitkonstante *Tau* (τ) und (B) die Verhältnisberechnung zwischen Maximal- und Minimalwert (R) der prozentualen Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) in OSNs nach differenter Pharmakagabe zu t = 100 s und Applikation des Agonisten *VUAA1* (100 µM) zu t = 200 s.... 51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Materialien und Hilfsmittel für die Antennenpräparation der Fruchtfliege 29
Tab. 2: Materialien und Hilfsmittel für fluoreszenzoptische Versuche 29
Tab. 3: Verabreichung differenter Testsubstanzen im Hinblick auf die jeweilige Messreihe 42
Tab. 4: Verwendete Formeln für die Auswertung der Rohmessdaten 45
Tab. 5: Beispiel für Rohmessdaten aus einem Experiment in Kontroll-Messreihe 1 46
Tab. 6: Beispiele für Modulatoren mitochondrialer Proteine in der Plasmamembran 61

Anlagen

Beschreibung der Forschungseinrichtung……..……Anlage 1, Blatt 1

Beschreibung der Forschungseinrichtung

Die Masterarbeit wurde am Max-Planck-Institut (MPI) für chemische Ökologie in 07745 Jena in der Abteilung der Evolutionären Neuroethologie unter Verantwortung von Herrn Dr. Dieter Wicher durchgeführt.

Im Allgemeinen ist die Max-Planck-Gesellschaft ein Träger, der eine Vielzahl von Forschungseinrichtungen in Deutschland und im Ausland betreibt. Hinsichtlich der Auswahl und Durchführung ihrer Forschungsaufgaben sind die Max-Planck-Institute frei und unabhängig (*Max-Planck-Institute & Experten, 2018*). Die einzelnen MPIs forschen auf Gebieten der Lebens-, Natur- und Geisteswissenschaften. Hierbei wird von einer Vielzahl an interdisziplinärer Zusammenarbeit profitiert (*Max-Planck-Institute & Experten, 2018*).

Speziell im MPI für chemische Ökologie in Jena werden die Rolle, Vielfalt und die Eigenschaften von chemischen Signalen untersucht, die bei den Interaktionen zwischen Organismen und ihrer Umwelt auftreten können (*MPI für chemische Ökologie, 2018*). Für das Verständnis dieses komplexen Systems der chemischer Kommunikation, arbeiten am Institut Wissenschaftler aus den Bereichen Ökologie, Biochemie, organische Chemie sowie Insektenkunde zusammen. Hierbei steht die Ko-Evolution von Pflanzen und Insekten im Mittelpunkt ihrer Forschungen (*MPI für chemische Ökologie, 2018*).

Wie oben beschrieben, fand die eigentliche Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Dieter Wicher in der Abteilung der Evolutionären Neuroethologie statt. Diese Abteilung wird von dem Schweden und Honorarprofessor Dr. Bill S. Hansson geleitet (*Hansson, 2018*). Speziell in Dr. Wichers Arbeitsgruppe wird untersucht, wie die Geruchsrezeptoren der *Drosophila* Duftsignale in elektrische Signale umwandeln und über welche Mechanismen diese in den verschiedenen Kompartimenten der olfaktorischen sensorischen Neuronen verstärkt und verarbeitet werden(*MPI CE: Rezeption & Transduktion,* 2018). Das Hauptaugenmerk läge hierbei in der Beantwortung der Frage, wie die Manifestation der Anpassung eines Organismus an eine ökologische Nische auf der Ebene der Duftrezeptoren und der interneuronalen Kommunikation ablaufe (*MPI CE: Rezeption & Transduktion,* 2018). Elektrophysiologische Experimente an Rezeptorneuronen *(in situ* und isoliert) und in heterologen Expressionssystemen kommen zur Beantwortung dieser Fragestellungen zum Einsatz. Ergänzend finden auch optische bildgebende Verfahren Anwendung (*MPI CE: Rezeption & Transduktion,* 2018).

Ehrenwörtliche Erklärung und Einverständniserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in der gleichen oder ähnlichen Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher noch nicht veröffentlicht.

Hiermit erkläre ich mich mit der Einsichtnahme in meine Abschlussarbeit in der Bibliothek der EAH Jena **nicht** einverstanden.

Ort, Datum Unterschrift

Danksagung

Die vergangenen Monate der Masterarbeit und die Jahre des Studiums waren anstrengend, entbehrungsreich und teilweise mit sehr vielen Zweifeln an mir selbst und der Gesamtsituation behaftet. Sie haben mir aber auch dabei geholfen, mit schwierigen Bedingungen umzugehen und scheinbar unüberwindbare Hürden erfolgreich hinter mir zu lassen. Für das Durchhaltevermögen und das stetige Arbeiten an weiteren Lösungsansätzen möchte ich mich in erster Linie bei mir selbst bedanken.

Nicht vergessen möchte ich meine Eltern. Sie fingen mich in den beschriebenen Situationen auf, machten mir Mut und stärkten mir den Rücken; wenn es notwendig erschien. Ohne ihre Erziehung wäre ich nicht der Mensch, der ich heute bin. Ich habe Wertvorstellungen und Verhaltensweisen vermittelt bekommen, die mich auszeichnen und mein ganzes Leben hindurch prägten und prägen werden. Dafür bin ich euch sehr dankbar.

Besonders in fachlicher, aber auch menschlicher Hinsicht möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Dieter Wicher des MPI für chemische Ökologie in Jena bedanken, der maßgeblich am Gelingen dieser Masterarbeit beteiligt war. Er zeigte mir Lösungswege auf, passte das Studiendesign an geänderte äußere Bedingungen an, ging auf meine individuelle persönliche Situation mit Verständnis, Sachverstand sowie seiner gewohnt ruhigen Art ein und eröffnete mir den Zugang zu bis dato unbekannten wissenschaftlichen Arbeitstechniken. Bestimmt war es für ihn nicht immer einfach mit mir und meiner Art neue Dinge anzugehen, wobei so manches Missverständnis im Raum stand. Nichtsdestotrotz habe ich mich unter seiner Betreuung sehr wohl gefühlt und möchte ihm auf diesem Wege hierfür noch einmal großen Dank aussprechen.

Frau Dr. rer. nat. Carola Wicher (LfbA) der EAH Jena zeigte mir mit Ihren Vorlesungen im Themengebiet der „Physiologie des Sehens“ einen völlig neuen Blick auf das Fachgebiet der Neurobiologie auf. Durch eine von ihr angestoßene Exkursion in die Abteilung der „Evolutionären Neuroethologie“ am MPI für chemische Ökologie in Jena, wurde mein geweckte Interesse weiterhin gefördert. Anfänglich bestand meinerseits nur der Wunsch, ein Forschungspraktikum in der genannten Abteilung zu absolvieren. Mit ihrer Hilfe konnte jedoch das Durchführen einer Masterarbeit realisiert werden. Sie stand mir beratend zur Seite, machte mich auf Unstimmigkeiten aufmerksam und legte mir die kritische Betrachtung meiner Messergebnisse nahe. Außerdem lernte ich ihren ruhigen Umgang mit Problemstellungen und ihre empathischen Fähigkeiten während der Masterarbeit und des gesamten Studiums schätzen. Vielen Dank für all diese geschilderten Sachverhalte.

Nicht unbeachtet möchte ich die Hilfe der Mitarbeiter aus der beschriebenen Abteilung des MPI in Jena lassen.

Beginnen möchte ich mit Frau S. Laubrich, die mich jederzeit bei organisatorischen Fragen unterstützte. Des Weiteren wies mich Frau S. Trautheim in den Umgang mit gentechnisch veränderten Fruchtfliegen in einem speziellen Labor ein und erklärte die zu beachtenden Besonderheiten. Ein ganz besonderer Dank gilt auch Frau S. Kaltofen, die mir die Methode der Antennenpräparation bei *Drosophila melanogaster* zeigte. Außerdem bereitete sie die zu verwendende Stoffgemische nach Herstellerangabe vor, sodass ich nur noch für die gewünschte Konzentration Sorge tragen musste. Auch bei messtechnischen Prozessen unterstützte sie mich hilfreich und konnte somit zum Gelingen einiger Experimente einen wertvollen Beitrag leisten. Ein weiterer Aspekt ist ihre stets freundliche Art, die so manche trübe Gedanken verschwinden ließen. In fachlichen Fragestellungen konnte ich in Frau L. Halty-deLeon (M. Sc.) eine besonnene junge Frau finden, die mich an ihrem Erfahrungsschatz teilhaben ließ. Ihre Erklärungen trugen dazu bei, dass einige Schwierigkeiten im experimentellen Ablauf ausgeräumt werden konnten. Auch Frau K. Jain (B. Sc.) erleichterte mir vor allem in der Anfangszeit das Zurechtfinden am MPI, indem sie mir eine kleine Führung und einige Tipps in Bezug auf die Antennenpräparation gab.

Ganz besonders möchte ich Herrn Ph. D. F. Miazzi danken. Er lieferte auf alle aufkommenden Fragen eine schlüssige Antwort. Zudem erklärte er mir das Herstellen von Stoffgemischen mit definierter Konzentration, gab Tipps zur Antennenpräparation, wies mich in die Methode des Ca^{2+}-*Imagings* ein, zeigte die Applikation von Testsubtanzen und stellte mir die Benutzung von *Prism 4* bei der statistischen Auswertung der ermittelten Daten vor.

Abschließend möchte ich mich bei allen nicht erwähnten Personen bedanken, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet haben und an die ich gerne zurückdenke. Ihnen ist das folgende Gedicht von Rainer Maria Rilke (1875 – 1926) gewidmet:

"Es weht der Wind ein Blatt vom Baum, von vielen Blättern eines,
dies eine Blatt, man merkt es kaum, denn eines ist ja keines.
Doch dieses Blatt allein, war Teil von unserem Leben,
drum wird dies Blatt allein, uns immer wieder fehlen."
(Rilke, 2004)

Thesen

<u>These 1:</u>

„Die Aktivierung des mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporters führt zu einer deutlich reduzierten, aber länger andauernden Antwort olfaktorischer sensorischer Neurone auf einen Duftreiz bei *Drosophila melanogaster* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe."

<u>These 2:</u>

„Die Hemmung des mitochondrialen Ca^{2+}-Uniporters führt nur zu einer leichten Reduktion der Antwort olfaktorischer sensorischer Neurone auf einen Duftreiz bei *Drosophila melanogaster* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe."

<u>These 3:</u>

„Die Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore hat einen direkten Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration zur Folge und führt zu einer deutlich reduzierten, aber länger andauernden Antwort olfaktorischer sensorischer Neurone auf einen Duftreiz bei *Drosophila melanogaster* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe."

<u>These 4:</u>

„Die Hemmung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore führt zu einer nicht signifikanten Reduktion der Antwort olfaktorischer sensorischer Neurone auf einen Duftreiz bei *Drosophila melanogaster* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe."