Aus dem Physiologischen Institut

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Zelluläre Physiologie

Vorstand: Prof. Dr. Claudia Veigel

Entwicklung eines „chronic social defeat“-Modells in *Drosophila melanogaster*

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

David Popovic

aus München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Michael Meyer
	_____
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Benedikt Grothe
	PD Dr. Ina Giegling
	Prof. Dr. Till Roenneberg
	Prof. Dr. Dr. Martin Keck
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Jill Penn, Ph.D.
Dekan:	Prof. Dr. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	23.11.2017

Teile der Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht als:

Trannoy, S., Penn, J., Lucey, K., Popovic, D., Kravitz, E. A. (2016). "Short and long-lasting behavioral consequences of agonistic encounters between male Drosophila melanogaster." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 113(17), 4818-23

„Es gibt nichts, was du nicht lernen kannst.“

Für Edith und Ljubomir

1. Einleitung *3*

1.1. Zielsetzung der Forschungstätigkeit **3**

1.2. Depression als Krankheitsbild des 21. Jahrhunderts **3**

1.3. Tiermodelle der Depression **6**

1.4. Biologische Grundlagen: *Drosophila melanogaster* **9**
1.4.1. Physiologie der *Drosophila melanogaster* 9
1.4.2. Genetische Grundlagen der *Drosophila melanogaster* 12
1.4.3. Neuroanatomie der *Drosophila melanogaster* 15

1.5. Etablierung eines Depressionsmodells in *Drosophila melanogaster* **17**

1.6. Die Rolle von Serotonin im menschlichen Organismus **19**

1.7. Die Rolle von Serotonin im *Drosophila melanogaster*-Organismus **21**

2. Methoden *22*

2.1. Tabellarische Auflistung **22**
2.1.1. Chemikalien, Verbrauchs-/biologisches Material 22
2.1.2. Geräte 22
2.1.3. Verwendete Lösungen 22
2.1.4. Fliegenstämme 23
2.1.5. Software 23

2.2. Fliegenbestände und genetische Kreuzungen **24**
2.2.1. Das GAL4/UAS-System 25

2.3. Aufbau und Struktur eines Fliegenkampfes **28**
2.3.1. Charakteristika und Auswertung eines Fliegenkampfes 31
2.3.2. Visuelle Darstellung der Kampfhandlungen 33

2.4. Das „chronic social defeat“-Modell (CSD-Modell) **35**
2.4.1. Aufbau und Struktur des Modells 35
2.4.2. Versuch der Protokolloptimierung durch Gabe von 5-Hydroxytryptophan 36

2.5. Saccharosepräferenzanalyse (SPA) **38**
2.5.1. Aufbau und Durchführung 38
2.5.2. Bestimmung der Saccharosepräferenzratio (SPR) 40
2.5.3. Bestimmung der gesamten Nahrungsaufnahme (GNA) 41

2.6. Serotonerge Manipulationen **42**
2.6.1. Globale Manipulationsansätze 42
2.6.1.1. Chronische Serotonin-Suppression mittels α-Methyltryptophan 42
2.6.1.2. Akute Serotonin-Suppression mittels TpHxShi^{ts1} 44
2.6.1.2.1. Genetische Grundlagen 44
2.6.1.2.2. Temperaturabhängiges „chronic social defeat“-Protokoll 46
2.6.2. Spezifische Serotoninmodulation mittels *d5-HT$_{1B}$xRNAi* 48
2.6.2.1. Klinische Relevanz von 5-HT$_{1A}$-Rezeptoren 48
2.6.2.2. d5-HT$_{1B}$-Rezeptoren in Drosophila melanogaster 49
2.6.2.3. RNA-Interferenz 51
2.6.2.4. Zucht des d5-HT$_{1B}$-Fliegenstammes 52

2.7. Statistische Methoden **54**

3. Ergebnisse *55*

3.1. Phänotypische Effekte nach „chronic social defeat“ 55
3.1.1. Verringerung der Aggressivität 55
3.1.2. Verringerung der Saccharosepräferenz 56
3.1.3. Verringerung der gesamten Nahrungsaufnahme 57
3.1.4. Zusätzliche Untersuchungen zu Kampfverhalten und SPR 58

3.2. Die „chronischen Verlierer“ bestehen aus zwei Subpopulationen 61

3.3. „Empfängliche“ und „resistente“ Fliegen besitzen unterschiedliche SPR 65

3.4. Persistenz der Effekte von „chronic social defeat“ 67

3.5. Effekte der serotonergen Manipulationen im Rahmen des CSD-Modells 69
3.5.1. Chronische Serotonin-Suppression mittels α-MTP-Nahrung 69
3.5.2. Akute Serotonin-Suppression mittels *TpHxShi^{ts1}* 74
3.5.3. Spezifische Manipulation mittels *d5-HT$_{1B}$xRNAi* 75

4. Diskussion 83

4.1. Das CSD-Modell im Kontext neurobiologischer Forschung 83

4.2. Gibt es depressive *Drosophila*? 88

4.3. Kritische Betrachtung der Methodik 92

4.4. Kritische Betrachtung der Ergebnisse 103

4.5. Bedeutung von Serotonin im Kontext depressiver Störungen 107

4.6. Mögliche biologische Hintergründe von Resistenz und Empfänglichkeit 113

4.7. Nutzen des *Drosophila melanogaster*-Modells 119

4.8. Ausblick 123

5. Zusammenfassung 124

6. Danksagung 127

7. Anhang 128

7.1. Abbildungsverzeichnis 128

7.2. Figurenverzeichnis 128

7.3. Tabellenverzeichnis 129

7.4. Inhalt der beigefügten DVD mit Videobeispielen 129

7.5. Matlab-Script zur Berechnung der SPR-Funktion 129

7.6. Abkürzungsverzeichnis 129

8. Literaturverzeichnis 132

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung der Forschungstätigkeit

Die hier vorliegende Forschungsarbeit setzt sich zum Ziel, mithilfe der *Drosophila melanogaster* einen neuen Zugang zur Thematik der depressiven Störung zu finden und besteht strukturell aus zwei wesentlichen Elementen. An erster Stelle stand die Etablierung eines, unseres Wissens nach, ersten Depressionsmodells im *Drosophila melanogaster*-Organismus. Um einen Phänotyp zu erzeugen, der als depressionsähnlich interpretiert werden konnte, wurde zunächst ein experimentelles Verfahren gesucht, welches bereits robuste und reproduzierbare depressionsähnliche Symptome in anderen Spezies erzeugt. Die Wahl fiel auf das „chronic social defeat"-Modell aus dem Bereich der Nagetiere, das für die Anwendung an *Drosophila melanogaster* angepasst wurde. Der zweite Teil bestand darin mit sowohl biochemischen als auch genetischen Methoden die Rolle von Serotonin in der Entstehung des depressionsähnlichen Phänotyps zu bestimmen. Hieraus könnten sich neue genetische Ansatzpunkte zum besseren Verständnis der depressiven Symptomatik bilden, vor allem im Hinblick auf die in diesem Kontext wichtige Gen-Umwelt-Interaktion.

1.2. Depression als Krankheitsbild des 21. Jahrhunderts

Die Depression ist wie viele andere psychische Erkrankungen im Allgemeinen ein multifaktorieller Prozess, bestehend aus genetischer Prädisposition und individuell unterschiedlichen Umweltfaktoren (DGPPN/S3-Leitlinie 2009). Hierbei ist für die klinisch manifeste Depression, die im Zentrum der vorliegenden Forschungsarbeit steht, ein besonders starker Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entstehung und Progression der Krankheit nachgewiesen (Sullivan et al. 2000). Die gesundheitspolitische und sozioökonomische Relevanz dieser Erkrankung für die Bundesrepublik Deutschland wurde von 2008 bis 2011 durch die DEGS1-Studie (Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland) erfasst. Es zeigte sich, dass die Lebenszeitprävalenz einer diagnostizierten Depression 11,6% beträgt, wobei diesbezüglich Frauen (15,4% Lebenszeitprävalenz) deutlich häufiger betroffen sind als Männer (7,8% Lebenszeitprävalenz). Darüber hinaus wurde vor allem bei Frauen ein inverser Zusammenhang zwischen sozioökonomischem Status und dem Auftreten einer depressiven Störung beobachtet, der sich bei Männern in dieser Form nicht zeigte (Busch et al. 2013). Die weltweite Relevanz depressiver Erkrankungen wird durch die aktuellste WHO-Studie „Global Burden of Disease 2010" verdeutlicht. Hierbei wird die Belastung der Menschheit durch

bestimmte Krankheiten mittels der sogenannten DALY („disease adjusted life years“) quantifiziert. Diese stellen die Anzahl der Jahre dar, die entweder durch Behinderung, Einschränkung oder Tod aufgrund einer spezifischen Krankheit verloren wurden und nicht in gesundem Zustand gelebt werden konnten. Bei insgesamt 2,5 Milliarden DALY weltweit belegten depressive Störungen mit einem Anteil von 2,5% den elften Rang (62,5 Millionen DALY). Inbegriffen sind unter anderem 16 Millionen verlorene Lebensjahre durch Suizid und vier Millionen verlorene Lebensjahre durch sekundäre ischämische Herzkrankheiten (Ferrari et al. 2013). Nach ICD-10 ist die Depression beim Menschen klinisch durch einen vielfältigen Symptomkomplex gekennzeichnet, bestehend aus reduziertem Affekt und Antrieb, Anhedonie, Schlaf- und Appetitstörungen, sowie Konzentrationsschwierigkeiten (ICD-10 2014). Diese Beschwerden führen letztendlich auch zu einer deutlichen Verringerung der Lebensqualität (Daly et al. 2010). Diagnostisch werden zusätzlich zur klinischen Beurteilung durch einen Psychiater verschiedene standardisierte Tests (Beck-Depressionsinventar, Hamilton Rating Scale for Depression, Patient Health Questionnaire) vor allem zur Verlaufskontrolle der depressiven Symptomatik herangezogen. Darüber hinaus werden zunehmend Untersuchungsverfahren entwickelt, die sich weniger auf die klinische Präsentation des Patienten stützen, sondern auf Veränderungen von Biomarkern wie BDNF (brain-derived neurotrophic factor), Cortisol oder Apolipoprotein CIII basieren (Karlovic et al. 2013; Papakostas et al. 2013). Trotz der mittlerweile fortschrittlicheren Diagnostik hat es im Hinblick auf die medikamentöse Therapie in den letzten Jahren vergleichsweise wenig Veränderungen an den grundlegenden Therapieprinzipien und biochemischen Zielstrukturen gegeben (Katz et al. 2010; Pfennig et al. 2013).

Generell funktionieren die meisten Antidepressiva nach dem Prinzip der Aktivitätssteigerung des monoaminergen Systems, das die zentralen Neurotransmitter Serotonin, Dopamin und Noradrenalin umfasst. Die selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), die Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (NRI), sowie die Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) und die etwas älteren trizyklischen Antidepressiva (TZA) erhöhen die jeweiligen Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt durch Blockade der präsynaptischen Reuptake-Transporter. Deren Aufgabe besteht in der Wiederaufnahme der Transmitter aus dem synaptischen Spalt zurück in das präsynaptische Neuron, was zur Beendigung der Transmitterwirkung führt. Aus der klinischen Anwendung bekannte Charakteristika lassen jedoch darauf schließen, dass die derzeitige Behandlung noch nicht spezifisch und zielführend genug ist und die ursächlichen pathologischen Mechanismen noch

nicht zur Gänze verstanden sind. Der erste problematische Aspekt stellt hierbei die Latenzzeit bis zum Eintreten der antidepressiven Wirkung dar. Die bislang vorherrschende Meinung war, dass Antidepressiva im Allgemeinem mehrere Wochen oder auch Monate benötigen um ihre volle Wirkung zu entfalten (Quitkin et al. 1984; Trivedi 2006). Dieser Annahme stehen neuere klinische Ergebnisse gegenüber, die antidepressive Effekte bereits nach wenigen Tagen oder sogar Stunden nachweisen (Machado-Vieira et al. 2008; Papakostas et al. 2006). Darüber hinaus erscheint auch das klinische Ergebnis als weiteres Indiz für das noch unzureichende Verständnis dieser Erkrankung: bei optimierter intensivierter Antidepressiva-Therapie liegt die langfristige Remissionsrate bei ca. 42-51%, wobei reine Placebo-Gabe ebenfalls in 32-38% der Fälle zu einer langfristigen Remission führt (Khan et al. 2012). Ebenso konnte auch die Wirksamkeit bei jugendlichen (unter 18 Jahren) und älteren Patienten (über 60 Jahre) nicht eindeutig bzw. nur in bestimmten Zeitfenstern und lediglich für einzelne Substanzen (vor allem für den SSRI Fluoxetin) festgestellt werden (Picouto and Braquehais 2013; Wilkinson and Izmeth 2012). Außerdem wird für den antidepressiven Effekt ein relevanter „publication bias“ postuliert und damit teilweise die Wirksamkeit von Antidepressiva gegenüber Placebos in Frage gestellt (Mavridis and Salanti 2014; Moreno et al. 2009; Turner et al. 2008).

Mit dem Ziel den Mechanismus der Depression besser zu verstehen und damit Vorschub zu leisten für neuere und wirksamere Medikamente, hat besonders innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte die psychiatrische Genetik bzw. die Pharmakogenomik immer mehr an Bedeutung gewonnen (Laje 2013). Aufbauend auf den Beobachtungen, dass eine positive Familienanamnese für zahlreiche psychiatrische Erkrankungen, von bipolaren Störungen über Depressionen bis hin zur Schizophrenie, ein signifikanter Risikofaktor ist, wurden groß angelegte multizentrische Studien entworfen, mit dem Ziel der Detektion von bestimmten Genvarianten und Mutationen („single nucleotide polymorphisms“, SNP), die bei erkrankten Personen gehäuft auftreten (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics et al. 2013; Hirata et al. 2012; Menke et al. 2013). Parallel dazu haben sich Tiermodelle, insbesondere Mausmodelle, in den letzten Jahren als weiteres wichtiges Instrument etabliert. Hierbei werden mit verschiedenen Methoden Kandidatengene manipuliert und die Phänotypen der so veränderten Tiere in Modellen psychiatrischer Erkrankungen untersucht (Krishnan and Nestler 2008).

1.3. Tiermodelle der Depression

Da sich die hier vorliegende Arbeit dem Ziel verschrieben hat, ein Depressionsmodell im *Drosophila melanogaster*-Organismus zu entwickeln, soll ein kurzer Überblick über die bisher etablierten Tiermodelle zur Depression gegeben werden. Wie bereits erwähnt dominieren hier die Nagetiermodelle, deren gemeinsames Charakteristikum die Erzeugung eines depressionsähnlichen Zustandes durch akuten oder chronischen Stress ist. Wichtig ist hierbei die Tatsache, dass die Tiere dem jeweiligen Stressor nicht entkommen können, ihre Reaktionen dementsprechend vergeblich sind und der sich dabei entfaltende Phänotyp bestimmte Analogien zur depressiven Störung des Menschen aufweist (Cryan and Holmes 2005; Nestler et al. 2002). In diesem Sinne wird Depression oftmals abstrahiert als Unfähigkeit mit einer bestimmten Stresssituation umzugehen. Gleichzeitig wird chronischer Stress auch als einer der wichtigsten prädisponierenden Faktoren für die Entstehung einer Depression beschrieben (Monroe et al. 2007; Schmitt et al. 2014).

Die meisten Tiermodelle zur Depression basieren auf dem Konzept der „erlernten Hilflosigkeit“ („learned helplessness). Hierbei ist ein häufig verwendetes Modell der sogenannte „forced-swim-test“. Hierfür wird ein Glasbehälter mit Wasser gefüllt und anschließend ein zweiteiliges Standardprotokoll durchlaufen. Zunächst wird das Nagetier am ersten Versuchstag für 15 Minuten in dem Wasserbehälter platziert und zum Schwimmen gezwungen, wobei ein Entkommen aus dieser Situation für das Tier unmöglich ist. 24 Stunden später wird dieser Versuch wiederholt, diesmal jedoch mit einer Dauer von fünf Minuten. Dabei werden die zwei folgenden Parameter gemessen: die Latenzzeit bis die Maus zum ersten Mal immobil wird, sowie die addierte Gesamtdauer der Immobilität während des fünfminütigen Versuches. Immobilität bedeutet in diesem Fall nicht, dass die Maus sich gar nicht mehr bewegt und dadurch sogar gefährdet sein könnte zu ertrinken, sondern, dass die Maus aufhört den Behälter aktiv zu explorieren, nicht mehr versucht zu entkommen und sich lediglich über Wasser hält. Mit beiden Parametern wird quantifiziert wie stark die Versuchstiere durch die Erfahrung der Ausweglosigkeit am ersten Versuchstag beeinflusst wurden und wie schnell sie am zweiten Versuchstag aufgeben und in Immobilität verharren. Führt man dem Nagetier nach dem ersten Versuch ein Antidepressivum zu, so zeigt es am zweiten Versuchstag eine verlängerte Latenzzeit bis zur ersten Immobilität, sowie eine insgesamt reduzierte Immobilitätsdauer. Diese Effekte werden dahingehend gedeutet, dass Antidepressiva die Stresstoleranz der Tiere steigern und die Resignationsneigung im zweiten

Versuch signifikant verringern (Buchkapitel mit übersichtlicher Darstellung der Methodik: Castagne et al. 2009).

Ein weiterer Test, der dem gleichen Paradigma folgt, ist der sogenannte „tail-suspension-test“. Dabei wird ein Nagetier an seinem Schwanz befestigt und kopfüber hängen gelassen. Nach anfänglichen Versuchen, dieser Situation zu entkommen, stellt das Tier seine Anstrengungen ein und verharrt in dieser Lage. Verabreicht man vor dem Versuch ein Antidepressivum, so unternimmt das Versuchstier längere und ausgiebigere Fluchtversuche und wird erst deutlich später immobil. Dies interpretiert man analog zum „forced-swim-test“ im Sinne eines gesteigerten Antriebs und einer verringerten Resignationsneigung. Beide Modelle streben die Emulation von „auswegloser Verzweiflung“ an und zeigen reproduzierbar, dass Antidepressiva einen signifikanten Effekt auf das Verhalten der Nager haben, der im Sinne einer antidepressiven oder stresspräventiven Wirkung interpretiert werden kann (Castagne et al. 2009). Der Nachteil dieses Ansatzes besteht jedoch darin, dass die Antidepressiva stets wenige Minuten oder Stunden vor der Testung verabreicht werden. Somit handelt es sich hierbei um akute Effekte, die nicht vergleichbar mit der klinischen Praxis sind. Beim Menschen stellt sich die antidepressive Wirkung frühestens nach einigen Tagen, häufiger aber erst nach Wochen bis Monaten ein. Dementsprechend büßen die experimentellen Ergebnisse aus „forced-swim-tests“ und „tail-suspension-tests“ an Aussagekraft ein.

Ein weiterer Ansatz aus dem Bereich der „erlernten Hilflosigkeit“ bedient sich der Anwendung von Elektroschocks bei Nagetieren. Im ersten Versuchsteil werden dem Versuchstier über einen gewissen Zeitraum elektrische Schocks verabreicht, denen es nicht entkommen kann. Im zweiten Teil werden ihm erneut Schocks zugefügt, nun jedoch erhält das Tier die Möglichkeit zur Flucht. Flüchtet das Versuchstier in dieser Situation jedoch nicht, sondern verharrt und lässt die elektrischen Schocks über sich ergehen, so wird dieses Verhalten als „erlernte Hilflosigkeit“ angesehen. Flüchtet das Tier, so wird anhand der Latenzzeit bis zur Fluchtergreifung ein weiterer Parameter der „erlernten Hilflosigkeit“ ermittelt (Cryan and Holmes 2005; Nestler et al. 2002). Auch in diesem Modell hatte die Gabe von Antidepressiva signifikante Effekte auf das Verhalten der Tiere. So konnte die durchschnittliche Latenzzeit bis zur Fluchtergreifung und gleichzeitig der Anteil an Tieren, die überhaupt nicht mehr flüchteten, verringert werden. Erneut wurde die Wirkung der Antidepressiva dahingehend gedeutet, dass sie die Resignationsneigung der Tiere vermindern und der Entwicklung von „erlernter Hilflosigkeit“ vorbeugen. Doch auch in diesem Fall werden die Unzulänglichkeiten des Modells schnell offensichtlich. Zum einen fällt bei diesem Ansatz die Abgrenzung zwischen

Emulation einer Depression und einer posttraumatischen Belastungsstörung sehr schwer (Nestler et al. 2002). Zum anderen zeigt nur ein geringer Anteil der Versuchstiere nach Ablauf des Protokolls die Symptomatik der „erlernten Hilflosigkeit“, wobei der Phänotyp selbst dann nur zwei bis drei Tage nachweisbar ist (Caldarone et al. 2000; Cryan and Holmes 2005). Es wird also klar, dass alle bisher genannten Modelle im Hinblick auf die Interpretation ihrer Ergebnisse begrenzt sind. Darüber hinaus werden anstelle der klinisch relevanten langfristigen Effekte der Antidepressiva lediglich die akuten Auswirkungen dargestellt, für die es jedoch bisher noch kein klinisch beobachtbares Korrelat beim Menschen gibt.

Eine Annäherung an die Untersuchung chronischer Effekte von Stressoren und deren möglicher Behandlung mittels Antidepressiva wurde mithilfe der „chronic mild stressor“-, sowie der „chronic social defeat“-Modelle unternommen.

Beim „chronic mild stressor“-Modell wird das Versuchssubjekt wiederholt und ohne jeden Zusammenhang mittelgradigen Stressoren ausgesetzt, wie zum Beispiel plötzliche Isolation, Störungen des Tag-Nacht-Zyklus, vorübergehende Nahrungsdeprivation oder Kippen der Käfige, in denen die Nagetiere beheimatet sind (Cryan and Holmes 2005; Willner 1997).

Das „chronic social defeat“-Modell, welches auch im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit steht, ist heutzutage vor allem im Nagetierbereich weit verbreitet (Avgustinovich et al. 2005; Der-Avakian et al. 2014; Krishnan and Nestler 2008). In diesen Modellen wird das männliche Versuchstier wiederholt einem dominanten, ebenfalls männlichen Gegner präsentiert, wobei es nicht zum Kampf oder physischem Schaden kommt, vielmehr jedoch zu einer psychophysiologischen Stresssituation (Krishnan et al. 2007). Dieses Modell hat sich bereits als hilfreich in der Emulation von psychiatrischen Erkrankungen des Menschen erwiesen, insbesondere auf dem Gebiet der Depression. Besonders hervorzuheben ist, dass die Effekte des „chronic social defeat“-Protokolls – vor allem Störungen des tierischen Sozialverhaltens - meist nur mittels chronischer, nicht aber akuter Antidepressivagabe behandelt werden können (bspw. Der-Avakian et al. 2014; Krishnan et al. 2007; Wilkinson et al. 2009). In Anbetracht dieser Tatsachen hat sich das „chronic social defeat“-Modell als vielversprechendes Modell mit hoher klinischer Aussagekraft erwiesen und wurde daher als Grundlage des hier entwickelten Depressionsmodells im *Drosophila melanogaster*-Organismus ausgewählt.

1.4. Biologische Grundlagen: *Drosophila melanogaster*

Bevor weiter auf die Einzelheiten des hier verwendeten Modells eingegangen wird, soll ein kurzer biologischer Exkurs eingeschoben werden, der die relevanten physiologischen, genetischen und neuroanatomischen Grundlagen des *Drosophila melanogaster*-Organismus erläutert.

1.4.1. Physiologie der *Drosophila melanogaster*

Die *Drosophila melanogaster* („Schwarzbäuchige Taufliege“) gehört innerhalb der Ordnung der Diptera zur Familie der Drosophilidae und ist im umgangssprachlichen Gebrauch vor allem als herkömmliche „Fruchtfliege“ bekannt. Die Erstbeschreibung erfolgte 1830 durch Johann Wilhelm Meigen. Wildtyp-Fruchtfliegen zeichnen sich durch rote Augen, einen gelb-bräunlichen Thorax, sowie dorsale schwarze Querstreifen aus, wobei es darüber hinaus spezifische phänotypische Unterscheidungsmerkmale gibt (Abbildung 1). Jungfräuliche Weibchen können zudem durch den markanten schwarzen Punkt (Mekonium) im distalen Bereich ihres Abdomens nachgewiesen werden (Abbildung 2)

Abbildung 1: Geschlechtsspezifische Unterschiede bei *Drosophila melanogaster*.
Die Weibchen (links) besitzen im Durchschnitt eine Länge von 2,5 mm und sind damit sichtbar länger und größer als ihre männlichen Artgenossen (rechts). Das Männchen fällt zudem durch ein intensiv schwarz gefärbtes Endstück des Abdomens auf.
Quelle: http://www.berkeley.edu/news/media/releases/2002/07/03_paras.html (abgerufen: 10.01.18)

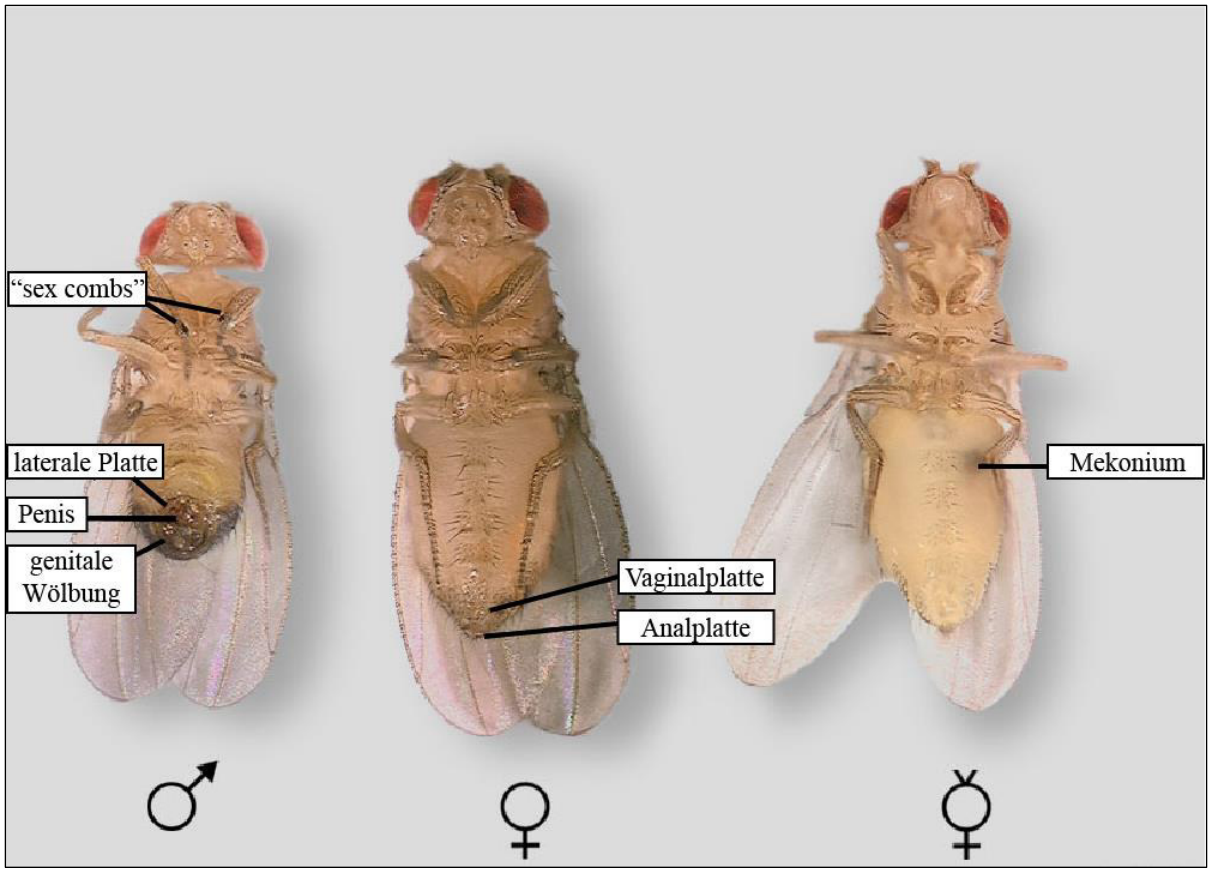


Abbildung 2: Abdominalansicht männlicher und weiblicher Fliegen.
Die auf dem Rücken platzierten Fliegen gewähren Einblick in die äußerlichen Charakteristika ihrer abdominellen Struktur. Die Männchen (links) besitzen kleine Härchen an den Vorderbeinen, die als „sex combs“ bezeichnet werden. Darüber hinaus stellt sich ihr Genital mit drei charakteristischen Bestandteilen (laterale Platte, Penis, genitale Wölbung) dar. Das Genital der adulten Weibchen (mittig) ist deutlich weniger markant ausgeprägt und lässt nur bei genauerer Betrachtung die Vaginal- und Analplatte erkennbar werden. Jungfräuliche Weibchen (rechts) lassen sich spezifisch durch einen dunklen Punkt im oberen Teil ihres Abdomens, dem Mekonium, von bereits befruchteten Weibchen unterscheiden.
Quelle:
http://www.stolaf.edu/people/colee/studentprojects/drosophila/Emily%20Landon%20drosophila%20project/procedure%20page.htm (abgerufen: 10.01.18)

Die Lebensdauer der Fruchtfliegen hängt von zahlreichen Faktoren wie Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit und Besiedlungsdichte des Territoriums ab. Die Fruchtfliege ist im Gegensatz zum endothermen Menschen eine ektotherme Spezies und passt ihre Körpertemperatur der Umgebungstemperatur an. Die Aktivität des Tieres im Allgemeinen, sowie die metabolische Aktivität im Speziellen sinken bzw. steigen mit der jeweiligen Außentemperatur. Bei höherer Außentemperatur kommt es somit zu einem schnelleren Entwicklungsprozess und einer insgesamt verkürzten Lebenserwartung, während niedrigere Temperaturen den gegenteiligen Effekt besitzen. Da sich die hier vorliegende Arbeit an den herkömmlichen Umgebungsstandards der Fachliteratur orientiert hat (25°C, 50%

Luftfeuchtigkeit, zwölf Stunden Tag/Nacht-Zyklus), sollen sich alle weiteren Beschreibungen auf jene Konditionen beschränken. Die allgemeine Entwicklungsdauer von der Paarung der Elterngeneration bis zur adulten *Drosophila* beträgt zehn Tage. Eine zu hohe Dichte an *Drosophila melanogaster* in einem begrenzten Territorium kann diese Zeit verlängern und gleichzeitig die adulte Größe verringern. Nach der Paarung legen die Weibchen ungefähr 400 Eier, bevorzugt auf faulenden Früchten oder anderen verfallenden biologischen Materialien. Aus diesen schlüpfen nach ca. einem Tag die ersten Larven (1. Larvenstadium), die anschließend eine fünftägige Wachstumsperiode durchlaufen und sich währenddessen jeweils nach dem ersten und nach dem zweiten Tag häuten (dadurch Eintritt in das 2. und 3. Larvenstadium). Daraufhin verpuppt sich die Larve für insgesamt vier weitere Tage, bevor sie als Taufliege aus ihrem Puppenstadium hervorgeht (Abbildung 3). Da die jungen Fliegen anfangs nur schwach ausgebildete Flügel besitzen und darüber hinaus noch in verschiedenen Bereichen defizitär ausgestattet sind, werden für experimentelle Studien generell drei bis vier Tage alte Tiere als adulte Fliegen bezeichnet und verwendet.

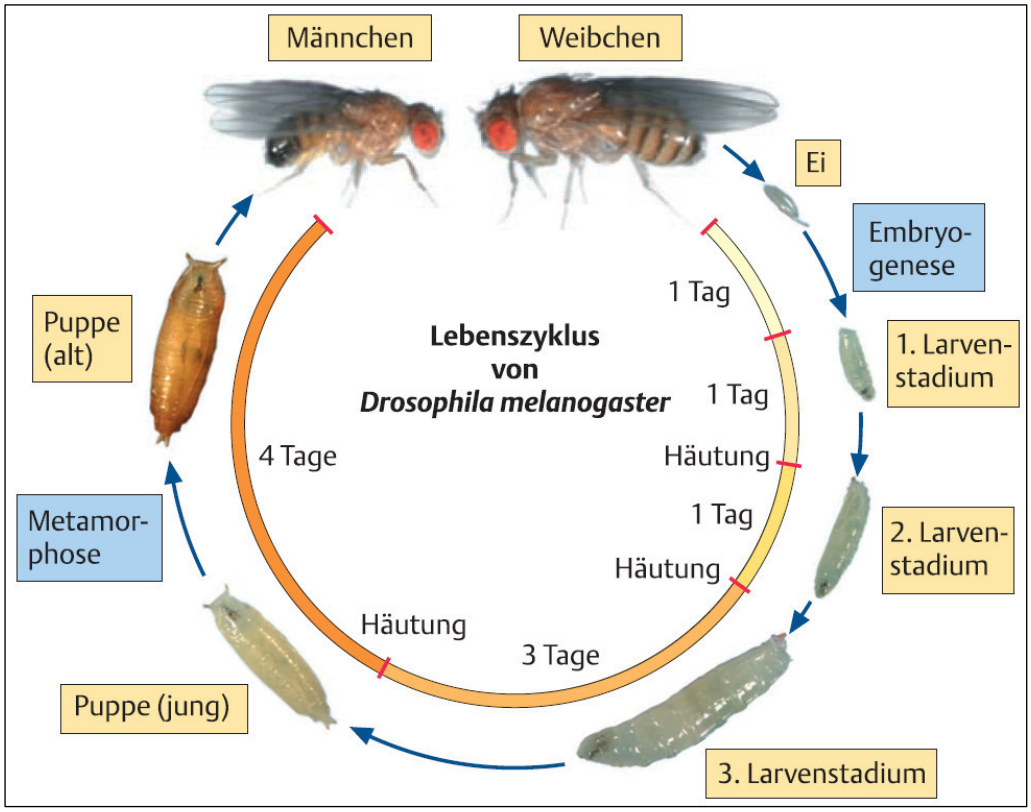


Abbildung 3: Lebenszyklus der Drosophila melanogaster
(nach Jannig 2008a)

1.4.2. Genetische Grundlagen der *Drosophila melanogaster*

Das Genom der *Drosophila melanogaster* wurde im Jahr 2000 vollständig sequenziert, besteht aus 139,5 Millionen Basenpaaren verteilt auf 19.806 Gene und kann auf der Internet-Datenbank FlyBase (www.flybase.org) abgerufen werden (Adams et al. 2000). Das Genom befindet sich auf insgesamt vier Chromosomen (die Heterosomen X bzw. Y, sowie die Autosomen 2, 3 und 4), die im Normalfall paarweise angeordnet sind (Abbildung 4).

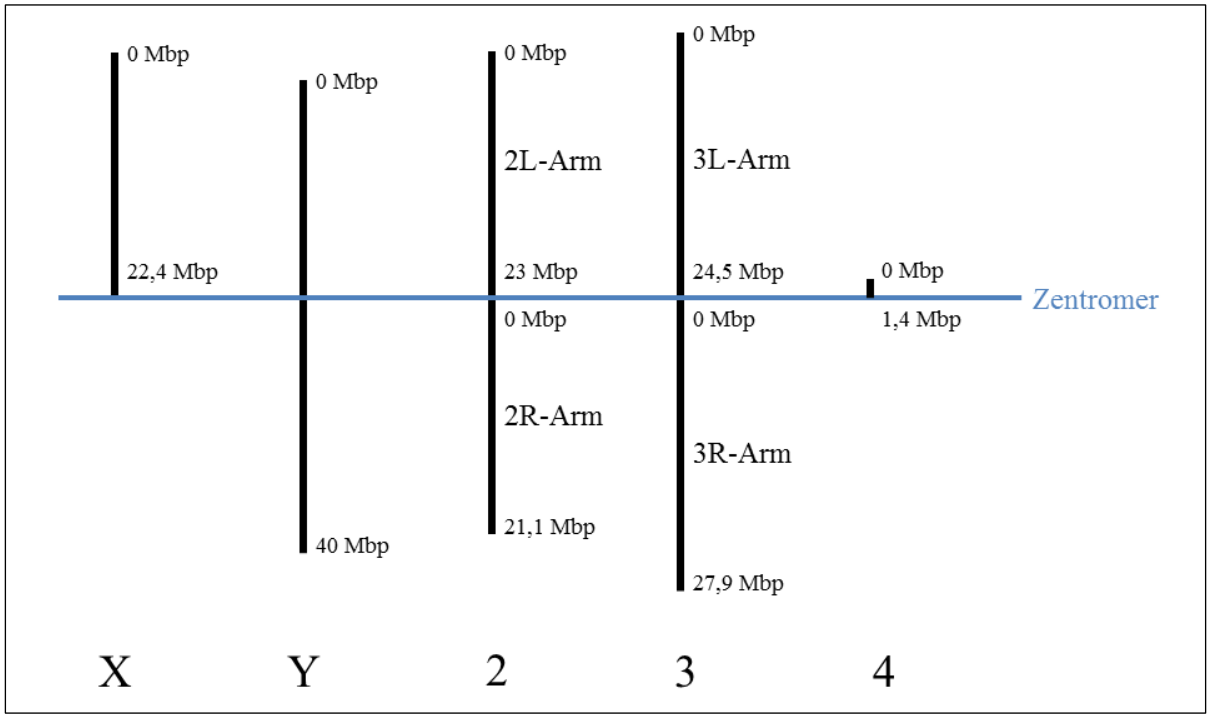


Abbildung 4: Schematische Darstellung des *Drosophila melanogaster*-Genoms.
Dargestellt sind die Heterosomen X und Y, sowie die Autosomen 2, 3 und 4. Während das X-Chromosom über lediglich einen Arm verfügt, besitzt das Y-Chromosom zwei Arme, jedoch ist nur deren summierte Länge bekannt. Für die Autosomen 2 und 3 gibt es jeweils einen linken und rechten Arm (2L/R, 3L/R), die jeweils unterschiedlich lang sind. Zu beachten ist, dass das Autosom 4 eine extrem geringe Anzahl an Basenpaaren und außer dem wichtigen „eyeless"-Gen keine relevanten Genprodukte besitzt (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Drosophila-chromosome-diagram.jpg, 10.01.2018).

Im Gegensatz zum Menschen hat das Y-Chromosom keinen Einfluss auf die Ausprägung des genetischen Geschlechts, sondern ist lediglich für die Spermienproduktion in der adulten männlichen Fliege verantwortlich. Die Theorie der Genbalance von Calvin Bridges (1889 – 1938) besagt, dass die X-Chromosomen „weibliche Determinanten" und die Autosomen „männliche Determinanten" tragen, sodass die Anzahl an X-Chromosomen im Verhältnis zum Autosomensatz (abgekürzt als A, entspricht den Chromosomen 2, 3 und 4) dafür ausschlaggebend ist, ob die männlichen oder weiblichen Einflüsse überwiegen und demzufolge ein Männchen oder ein Weibchen entsteht. Dieses sogenannte X:A-Verhältnis ist vor allem

deshalb wichtig, da bei der *Drosophila* auch mehr als zwei X-Chromosomen (z.B. 3X, 4X) bzw. ein drei- oder vierfacher Autosomensatz (z.B. 3A, 4A) vorliegen kann. Bei einem X:A-Verhältnis von 1,0 oder größer, entsteht ein Weibchen, während es bei einem X:A-Verhältnis von 0,5 oder kleiner zur Entwicklung eines Männchens kommt. Liegt ein X:A-Verhältnis zwischen 0,5 und 1,0 vor, so entstehen intersexuelle Wesen, die phänotypisch aus einem Muster von nebeneinanderliegenden männlichen und weiblichen Bereichen bestehen und steril sind. Der Regelfall ist jedoch ein diploider Autosomensatz (2A) zusammen mit entweder einem oder zwei vorliegenden X-Chromosomen (1X oder 2X). Besitzt eine Fliege zwei X-Chromosomen und einen normalen, diploiden Autosomensatz, so entsteht ein fertiles XX-Weibchen (2X:2A = 1). Liegt lediglich ein X-Chromosom bei diploidem Autosomensatz vor, so ergibt sich ein Männchen (1X:2A = 0,5). Über die Fertilität dieses Männchens entscheidet nun das Vorliegen eines Y-Chromosoms, wobei XY-Männchen fertil und X0-Männchen infertil sind. In der Mehrheit der Fälle ergeben sich somit in Analogie zum menschlichen Organismus fertile XX-Weibchen und fertile XY-Männchen (Jannig 2008b). Eine Übersicht der häufigsten Chromosomenverhältnisse ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Chromosomenkonstitution	**X:A-Verhältnis**	**Phänotyp (Geschlecht)**
3X 2A	1,5	Meta-Weibchen, semiletal, steril
3X 3A	1,0	Weibchen, triploid, fertil
2X 2A	*1,0*	*Weibchen, diploid, fertil*
2X 2A Y	1,0	Weibchen, diploid, fertil
2X 3A	0,67	Intersex (Mosaik)
2X 3A Y	0,67	Intersex (Mosaik)
1X 2A	0,5	Männchen, diploid, steril
1X 2A Y	*0,5*	*Männchen, diploid, fertil*
1X 3A Y	0,33	Meta-Männchen, semiletal, steril

Tabelle 1: Chromosomenkonstitutionen und Geschlechtsphänotypen bei Drosophila. Aufgelistet sind die häufigsten Chromosomenkonstitutionen der *Drosophila melanogaster*. Kursiv unterlegt sind die jeweiligen Normalfälle für weibliche und männliche Fruchtfliegen. Die sogenannten Meta-Wesen (Meta-Weibchen, Meta-Männchen) gehen mit einer erhöhten Letalität einher und sind steril. Das Y-Chromosom ist für die Spermienproduktion verantwortlich, sodass 2X2AY-Weibchen ohne relevante Einwirkung des Y-Chromosoms fertil und 1X2A-Männchen bei fehlendem Y-Chromosom steril sind. X, Y = Heterosomen, A = Autosomensatz, Mosaik = weibliche und männliche Differenzierungen nebeneinander (nach Jannig 2008b).

Die exakten genetischen Grundlagen der „männlichen“ und „weiblichen Determinanten“ auf den jeweiligen Chromosomen, sowie die molekularen Details, die beim Vorliegen von XX- bzw. XY-Chromosomensätzen die weibliche und männliche Differenzierung des Organismus bewirken, sollen an dieser Stelle nicht weiter erwähnt werden. Hierbei handelt es sich um sehr komplexe molekulargenetische Abläufe, die einerseits den Rahmen der hier vorliegenden Arbeit überschreiten würden und andererseits für das Verständnis sowie die Beurteilung unserer Experimente nicht erforderlich sind.

Vielmehr soll hervorgehoben werden, weshalb der *Drosophila*-Organismus einen derartig attraktiven Gegenstand genetischer Forschung darstellt und die zu Tage geförderten Ergebnisse auch für den Menschen klinisch relevant sind. Der offensichtlichste Vorteil liegt darin, dass es sich hierbei um einen äußerst pflegeleichten und dynamischen Organismus handelt. Die Haltung von Fliegenstämmen in eigens dafür angefertigten Inkubatoren ist räumlich und auch finanziell günstig durchführbar. Zum anderen lassen sich genetische Kreuzungen aufgrund der distinktiven Phänotypen leicht durchführen. Männchen und Weibchen können nicht nur voneinander unterschieden werden, sondern es kann auch leicht festgestellt werden, ob es sich bei dem Weibchen um ein jungfräuliches Individuum handelt, was die Vermeidung von Polyspermie begünstigt und klare Eltern-Tochter-Generationen schafft. Ebenso besitzen sie mit zehn Tagen eine extrem geringe Generationszeit im Vergleich zu anderen Laborорganismen wie beispielsweise der herkömmlichen Labormaus *Mus musculus* (sechs bis zehn Wochen), sodass man innerhalb weniger Wochen eine hohe Anzahl an Tochtergenerationen mit ausgewählten genetischen Alterationen und Kreuzungen produzieren kann. Darüber hinaus gibt es wirkungsvolle und effiziente Techniken, mit denen man zeitlich, örtlich und bis auf einzelne Neuronen spezifisch die Expression bestimmter Gene regulieren kann (bspw. Alekseyenko et al. 2013; Alekseyenko et al. 2010; St Johnston 2013). Darunter befindet sich auch das GAL4/UAS-System (Duffy 2002), von dem auch in dieser Arbeit Gebrauch gemacht wurde und das in späteren Abschnitten genau erläutert wird.

Die Praktikabilität sowie die zahlreichen technischen Hilfsmittel wären alle von nur geringer Bedeutung, wenn das Genom der Fruchtfliege zu stark von dem des Menschen abweichen und damit auf Orthologie basierende Interpretationen und Erkenntnisse unmöglich machen würde. Orthologe Gene sind Gene in unterschiedlichen Spezies, die auf ein Gen im letzten gemeinsamen Vorfahren dieser beiden Spezies zurückgehen und eine hohe Übereinstimmung ihrer Basensequenzen aufweisen (Lexikon der Biologie: http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/orthologe-gene/48295, abgerufen 10.01.2018). Die

Stärke des *Drosophila*-Organismus liegt nun darin, dass zahlreiche Gene, die nachweislich Pathologien im menschlichen Organismus auslösen, ein orthologes, also in hohem Maße struktur- und funktionsgleiches, Gen im Genom der Fruchtfliege besitzen. Durch neue Online-Datenbanken wie FlyAtlas (www.flyatlas.org) werden zudem stetig neue Orthologien zwischen den Genen von Menschen und *Drosophila* dokumentiert (Chien et al. 2002; Chintapalli et al. 2007; Reiter et al. 2001).

1.4.3. Neuroanatomie der *Drosophila melanogaster*

Um nun die Einführung in die biologischen Grundlagen der *Drosophila melanogaster* abzuschließen, soll im Folgenden das ZNS der Fruchtfliege in seinen Grundzügen erläutert werden (Abbildung 5). Das ZNS der *Drosophila* besitzt ca. 200.000 Neuronen und verfügt über zahlreiche verschiedene Hirnareale, deren genaue Funktion oftmals noch kaum verstanden ist. Entwicklungsgeschichtlich kann man das Gehirn der Fruchtfliege in Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum einteilen. Die optischen Loben („optical lobes“) gehören gemeinsam mit der Retina und weiteren Strukturen zum visuellen System der *Drosophila* und machen mit insgesamt ca. 120.000 – 140.000 Neuronen den größten Anteil des ZNS aus. Eine wichtige Rolle in der Geruchswahrnehmung spielen vor allem die sogenannten Antennalloben, in denen die olfaktorischen Eindrücke aus den Antennen verarbeitet werden (Nichols 2006). In direkter Nachbarschaft zu den Antennalloben findet man die sogenannten antennalen mechanosensorischen und motorischen Zentren, die für die Detektion mechanischer Reize und die Verarbeitung auditorischer Stimuli mitverantwortlich sind (Kamikouchi et al. 2009; Lai et al. 2012) . Des Weiteren gibt es noch den Zentralkomplex (CCX = „central complex“), der unter anderem an Gedächtnisbildung, Lokomotion und Paarungsverhalten beteiligt sein soll (Renn et al. 1999; Serway et al. 2009). Vor allem im Bereich der Lokomotion führt der Zentralkomplex einige Funktionen gemeinsam mit dem Pilzkörper („mushroom body“) aus. Der Pilzkörper ist darüber hinaus ein häufig beforschter Gegenstand im Feld höherer integrativer Leistungen, wie olfaktorisches und gustatorisches Lernen (Guven-Ozkan and Davis 2014; Kirkhart and Scott 2015).

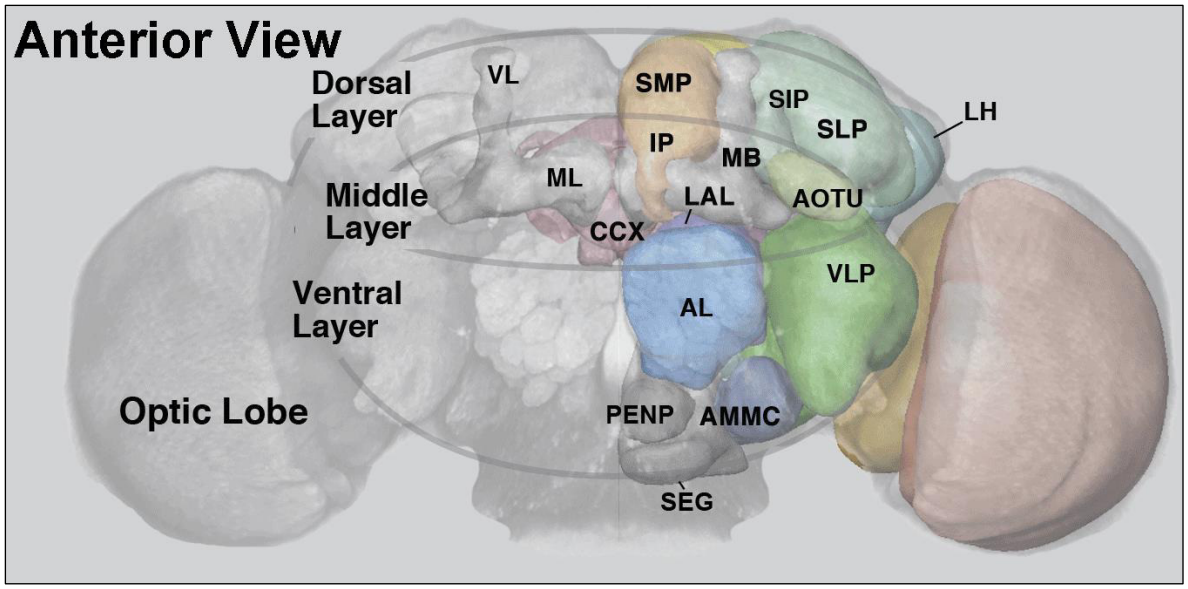


Abbildung 5: Das ZNS der Drosophila melanogaster in der Frontalansicht
Die unterschiedlichen Hirnstrukturen sind überlagert in der Frontalansicht („Anterior View“) dargestellt. Eine anatomische Einteilung lässt sich hierbei in dorsale Schicht („dorsal layer“), mittlere Schicht („middle layer“) und ventrale Schicht („ventral layer“) vornehmen. Die Hirnstrukturen sind hier sehr ausführlich markiert und benannt, die relevanten Strukturen wurden oben bereits näher beschrieben.
Dorsale Schicht: VL: vertikaler Lobus, SMP: superiores mediales Protocerebrum, SIP: superiores intermediäres Protocerebrum, SLP: superiores laterales Protocerebrum, LH: laterales Horn
Mittlere Schicht: CCX: Zentralkomplex („central complex“), MB: Pilzkörper („mushroom body“), IP: inferiores Protocerebrum, ML: medialer Lobus, LAL: lateraler akzessorischer Lobus, AOTU: anteriores optisches Tuberkel
Ventrale Schicht: AL: Antennallobus, VLP: ventrolaterales Protocerebrum, PENP: periösophageales Neuropil, AMMC: antennales mechanosensorisches und motorisches Zentrum, SEG: subösophageales Ganglion („subesophageal ganglion“).
Abbildung aus https://www.mcdb.ucla.edu/Research/Hartenstein/dbla/intro/introcomp.html (Abruf: 10.01.2018)

1.5. Etablierung eines Depressionsmodells in *Drosophila melanogaster*

Auf den Erkenntnissen der letzten Abschnitte aufbauend, erscheint es durchaus verständlich, dass die Fruchtfliege, *Drosophila melanogaster*, ein äußerst häufig verwendeter Modellorganismus ist, der in der Vergangenheit jedoch vor allem für anatomische, embryologische und biochemische Studien verwendet wurde. Innerhalb der letzten zwei Dekaden konnten jedoch zahlreiche Forschungsgruppen komplexere Verhaltensweisen nachweisen. So besitzen Fruchtfliegen Aktivitäts-Ruhe-Zyklen, die vergleichbar mit den Schlaf-Wach-Rhythmen in Säugetieren sind. Männliche Fliegen zeigen aggressives Verhalten im Kampf um Territorien oder um paarungswillige Weibchen. Ebenso sind Fruchtfliegen auch zu Gedächtnis- beziehungsweise Erinnerungsbildung über einen begrenzten Zeitraum in der Lage, wobei hier vor allem Untersuchungen in Bezug auf das olfaktorische Gedächtnis stattgefunden haben. Demzufolge sind Fruchtfliegen schon seit einiger Zeit ein intensiv beforschter Organismus auf dem Gebiet der Verhaltensgenetik, die sich mit den molekularen, zellulären und evolutionären Grundlagen tierischen Verhaltens experimentell auseinandersetzt (zur Übersicht: Vosshall 2007).

Die Untersuchung sozialer Niederlagen im Sinne eines „social defeat“-Modells ist jedoch ein relativ neues Feld der *Drosophila*-Forschung. Bereits 1915 konnte Alfred H. Sturtevant nachweisen, dass männliche *Drosophila* zu verschiedenen Formen der Aggression in der Lage sind. 1987 gelang es Ary A. Hoffmann erstmals Aggression im Kampf um Territorien experimentell auszulösen, wobei hierfür stets mehr als zwei Fliegen gleichzeitig in einer komplexen Versuchsanordnung untersucht wurden. Die jeweilige Kampferfahrung einer Fliege ist dadurch jedoch stark variabel und daher nach heutigem Maßstab nicht mehr eindeutig quantifizierbar (beschrieben in der Einleitung von: Zhou and Rao 2008). Dennoch erfuhr die Aggressionsforschung an *Drosophila* vor ungefähr 14 Jahren eine Renaissance durch eine Vereinfachung des Versuchsansatzes und einer Beschränkung auf ausschließlich zwei gegeneinander kämpfende Fruchtfliegen (Chen et al. 2002). Unter den neuen Bedingungen konnte nachgewiesen werden, dass männliche Fliegen in diesem artifiziellen Versuchsaufbau gegeneinander kämpfen sobald ein ausreichend starker Anreiz vorhanden ist, beispielsweise eine Nahrungsressource oder ein paarungsbereites Weibchen (Chen et al. 2002). In der aktuellen Forschungslandschaft besteht ein Konsens darüber, dass es auch in der freien Natur zu Kampfhandlungen zwischen männlichen Fruchtfliegen kommt und es sich hierbei nicht um einen lediglich im Labor erzeugten Phänotyp handelt. Jedoch liegen hierfür meines Wissens

keine systematischen Arbeiten vor. Dementsprechend existiert nur für die künstliche Anordnung im Labor der Nachweis von spezifischen Aggressionsmustern und Kampfhandlungen. Hierbei kämpfen stets zwei Männchen gegeneinander, die den gleichen genetischen Hintergrund haben, sozial naiv sind – das heißt, noch keinen Kontakt mit einer anderen Fliege hatten – und eine vergleichbare Größe besitzen. Im Laufe des Kampfes zeigen beide Gegner verschiedene aggressive Verhaltensmuster bis sich letztendlich eines der beiden Männchen als dominant erweist und die andere Fliege hierarchisch unterdrückt. Dies geht mit dem Gewinn der Nahrungsressource oder auch des paarungsbereiten Weibchens einher und lässt eine klare Einteilung in Gewinner und Verlierer zu. Von besonderer Bedeutung für die psychiatrische Grundlagenforschung und dementsprechend auch für die hier vorliegende Arbeit ist die Erkenntnis, dass eine Niederlage in einer solchen Auseinandersetzung weitreichende Auswirkungen auf das zukünftige Verhalten der unterlegenen Fliege hat, den man auch als „Verlierer-Effekt“ bezeichnet. Bereits nach einem einzigen verlorenen Kampf zeigt die unterlegene Fliege in einer 30 Minuten späteren Auseinandersetzung mit einem anderen Gegner eine deutlich herabgesetzte Tendenz die andere Fliege anzugreifen, eine verstärkte Neigung zur frühzeitigen Aufgabe und dadurch eine signifikant höheren Anzahl an Niederlagen (Yurkovic et al. 2006). Auch Vertreter des sogenannten „bully“-Stammes – über 34-37 Generationen selektierte, hyperaggressive Fliegen mit einem klaren Kampfvorteil gegenüber normalen Wildtyp-Fliegen – zeigen nach nur einem verlorenen Kampf eine ähnlich massive Reduktion an Aggressivität und eine ebenfalls stark erhöhte Neigung weitere Kämpfe zu verlieren (Penn et al. 2010).

Dieser „Verlierer-Effekt“ stellt einen ausgezeichneten Ansatzpunkt für die Etablierung eines ersten Depressionsmodells in *Drosophila melanogaster* dar. Obwohl ein solches Modell bereits in Nagetieren etabliert ist, erscheint es sinnvoll einen ähnlichen Versuch auch auf dem Gebiet der Fruchtfliegen zu unternehmen und die spezifischen Vorteile dieses Organismus zum weiteren Erkenntnisgewinn über die genauen Mechanismen dieser Erkrankung zu gewinnen. Diese bestehen darin, dass man sich mit einem reduktionistischen Versuchsdesign ausgewählten Depressionskomponenten im *Drosophila*-Modell annähern und nachfolgend deren molekulare und genetische Grundlagen mit einem, von anderen Tiermodellen unerreichten, Detailgrad untersuchen kann. Vor der ausführlichen Beschreibung und Auswertung des Studienansatzes, soll nun eine kurze vergleichende Einführung in die physiologische und klinische Relevanz von Serotonin gegeben werden, da dieser Neurotransmitter den biochemischen Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit darstellt.

1.6. Die Rolle von Serotonin im menschlichen Organismus

Serotonin spielt im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle in zahlreichen psychologischen und physiologischen Vorgängen, darunter so verschiedene Prozesse wie Schlafverhalten, Appetit, höhere kognitive Funktion, Impulsivität, Sexualverhalten, motorische Steuerung, sowie Modulation limbisch-affektiver Integration. Ebenso ist eine verminderte Aktivität des serotonergen Systems im menschlichen Gehirn prädisponierend für klinisch manifeste Depressionen (Flügge 2012; Förstl 2009). Die Rolle von Serotonin im Bereich der klinischen Depression ist zusammen mit Noradrenalin und Dopamin eingebettet in die sogenannte „Monoamin-Hypothese“. Diese Hypothese besagt, dass die Defizienz eines oder mehrerer dieser Transmitter eine depressive Störung bewirken bzw. prädisponierend hierfür sein kann. In Bezug auf Serotonin ist allen voran natürlich die Tatsache anzuführen, dass man bei klinisch manifesten Depressionen mithilfe von Antidepressiva, die auf verschiedene Arten die Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt erhöhen, eine Remission der Symptomatik herbeiführen kann. Jedoch gibt es zahlreiche weitere Studien, die in teilweise sehr komplexen Zusammenhängen die „Monoamin-Hypothese“ stützen. Blockiert man mithilfe von p-Chlorphenylalanin die Tryptophan-Hydroxylase, dem Schlüsselenzym der Serotoninsynthese im ZNS, so kommt es zu einem Verlust der antidepressiven Wirkung von trizyklischen Antidepressiva und MAO-Hemmern. Ebenso kommt es durch die Hemmung der Serotoninproduktion mit p-Chlorphenylalanin zu Rezidiven bei Patienten, die bereits erfolgreich unter SSRI-Behandlung remittiert waren (siehe Abschnitt 3.1 in Hamon and Blier 2013). Darüber hinaus wurde ein SNP im Tryptophan-Hydroxylase-Gen gefunden, der die Syntheseleistung des Enzyms um ca. 80% reduziert. Dieser SNP konnte bei einer Subpopulation von Patienten mit unipolarer Depression signifikant häufiger detektiert werden, als in der gesunden Vergleichspopulation (siehe Abschnitt 3.2 in Hamon and Blier 2013). Neben dem Transmitter spielen auch die jeweiligen Rezeptoren eine klinisch immens wichtige Rolle, wobei der Zusammenhang mit depressiven Störungen sehr komplex und teilweise noch nicht vollständig verstanden ist. Postmortem-Studien konnten beispielsweise zeigen, dass die Dichte an postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren bei Patienten mit depressiven Störungen reduziert ist, wobei es jedoch je nach kortikalem Abschnitt unterschiedliche Verteilungsmuster gibt. Andererseits gibt es auch präsynaptische 5-HT_{1A}-Rezeptoren, die in erster Linie eine regulatorische Funktion auf die Serotoninausschüttung in den synaptischen Spalt ausüben. Einige Studien konnten nachweisen, dass jene präsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren bei Patienten mit depressiven Störungen in erhöhter Anzahl exprimiert werden, wobei die

Studienlage hierzu insgesamt sehr kontrovers diskutiert wird. Für den 5-HT_{1B}-Rezeptor gilt ein ähnlich komplexes Bild, da dieser Rezeptor in verschiedene neurochemische Regelkreise eingebunden ist und neben Serotonin auch die GABA- und Glutamat-Transmission beeinflusst. Dennoch zeigte sich bei Postmortem-Studien, dass die Expression von 5-HT_{1B}-Rezeptoren bei Patienten mit depressiven Störungen im präfrontalen Kortex, sowie dem orbitofrontalen Kortex und dem Hippocampus vermindert ist. Der 5-HT_2-Rezeptor kann die Serotonin-Transmission sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch beeinflussen und ist eine wichtige Bindungsstelle für atypische Antipsychotika. Bei Patienten mit depressiven Störungen, die sich suizidiert hatten, konnte man eine erhöhte Expression des 5-HT_2-Rezeptors im präfrontalen Kortex und gleichzeitig eine verringerte Expression im Hippocampus feststellen. Es gäbe darüber hinaus noch zahlreiche weitere Serotoninrezeptoren zu nennen (5-$HT_{1D/F}$, 5-$HT_{2B/C}$, 5-$HT_{3/4/5/6/7}$), über die es jedoch teilweise noch sehr wenig Informationen gibt bzw. deren Einfluss auf die Pathogenese der Depression noch unklar ist. Insgesamt sollte an den ausgewählten Beispielen gezeigt werden, dass es mehrfach bestätigte und klare Zusammenhänge zwischen der zentralnervösen Serotoninproduktion bzw. -konzentration und dem Auftreten klinisch manifester Depressionen gibt. Andererseits sollte ersichtlich werden, dass die genauen Pathomechanismen und der Einfluss der einzelnen Rezeptoren auf die Depression teilweise noch wenig verstanden sind und sehr kontrovers diskutiert werden (für eine übersichtliche Darstellung der Datenlage zu den diversen Serotoninrezeptoren siehe Abschnitt 3.3 in Hamon and Blier 2013).

1.7. Die Rolle von Serotonin im *Drosophila melanogaster*-Organismus

Die bisherige Forschung an *Drosophila melanogaster* hat sich vor allem mit dem Einfluss von Serotonin auf Gedächtnisbildung, Aggression, Paarungsverhalten und Schlaf befasst. Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass Serotonin sowohl eine wichtige Funktion in der Erfassung und Speicherung der räumlichen Lokalisation und Orientierung einnimmt (Sitaraman et al. 2008), als auch ein Schlüsselelement in der kurzfristigen Einprägung olfaktorischer Sinneseindrücke darstellt (Johnson et al. 2011; Lee et al. 2011). Bezüglich des Aggressionsverhaltens lässt sich konstatieren, dass Serotonin die Intensität eines Kampfes deutlich bestimmt, nicht jedoch dessen Initiation. Analog dazu sind Fliegen mit chronischer Suppression ihrer zentralnervösen Serotoninaktivität immer noch in der Lage einen Kampf einzuleiten, können diesen jedoch nur mit unzureichender Intensität führen. In beiden Fällen wird der Mangel an Intensität dafür verantwortlich gemacht, dass sich keine eindeutigen Gewinner-Verlierer-Paare und infolgedessen auch keine Hierarchien ausbilden (Alekseyenko et al. 2010; Johnson et al. 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine globale, unspezifische Aktivierung serotonerger Neuronen zu einer Suppression des Paarungsverhaltens und einer allgemeinen Reduktion der motorischen Aktivität führt (Pooryasin and Fiala 2015). Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass die regelrechte Aktivität des d5-HT_7-Rezeptors (das „d“ wird verwendet, um aufzuzeigen, dass es sich um einen Rezeptor im *Drosophila melanogaster*-Organismus handelt) ein wichtiger Faktor für intaktes Werbungs- und Paarungsverhalten bei *Drosophila melanogaster* ist (Becnel et al. 2011). Als letzter Punkt ist der Schlaf zu nennen, wobei in diesem Zusammenhang *Drosophila melanogaster* eine besonders exponierte Position einnehmen. Unser heutiges Wissen über die genauen neurogenetischen Abläufe des Schlaf-Wach-Rhythmus stammt zu einem großen Teil aus dem Bereich der *Drosophila*-Forschung. Serotonin konnte in diesem Zusammenhang bereits mehrfach als schlaffördernder Transmitter identifiziert werden, wobei hierfür vor allem der d5-HT_{1A}-Rezeptor verantwortlich ist. Der d5-HT_2-Rezeptor scheint eine zentrale Rolle im Bereich der zirkadianen Regulation bzw. des sogenannten „Entrainments“ einzunehmen (Nall and Sehgal 2014). Diese kurze Übersicht sollte verdeutlichen, dass Serotonin im Organismus der *Drosophila melanogaster* in zahlreiche Regelkreise eingebunden ist und das Verhalten der Fruchtfliege auf vielfältige Art und Weise beeinflusst. Es sollte außerdem ersichtlich werden, dass, ähnlich wie beim Menschen, erst der Fokus auf die spezifischen Rezeptoren genauere Aussagen zur jeweiligen Wirkungsweise dieses Transmitters erlaubt.

2. Methoden

2.1. Tabellarische Auflistung

2.1.1. Chemikalien, Verbrauchs-/biologisches Material

- Farbstoffe
  - Allura Red (FD&C Red No. 40): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Art.Nr: 458848
  - Brilliant Blue (FD&C Blue No. 1): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Art.Nr: 861146
- Normale Grundnahrung/Fliegennahrung: 34 l Wasser, 316 g Agar, 1,1 kg Hefe, 4,84 kg Saccharose, 2,08 kg Maismehl; Gesamtvolumen: ca. 37,5 l
- α-Methyltryptophan (α-MTP): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Art.Nr: M8377

2.1.2. Geräte

- Nanodrop™ 2000c: Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Art. Nr: ND-2000
- Vortex-Schüttler: VWR International (Radnor, PA, USA), Art. Nr: 444-0202
- Inkubator: Percival Scientific (Perry, IA, USA), Art. Nr: I-36LL
- Zentrifuge: Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Art. Nr: 022621408 (Produktion eingestellt)
  - Maximale Beschleunigung: 16.100 G (800 – 13.200 rpm)
  - Kapazität: 24 x 1.5/2.0 ml Eppendorfgefäße
  - Temperaturkontrolle: 0°C - 40°C
- Kühlschrank: VWR International (Radnor, PA, USA), Art. Nr: LIEBCNP3513
- Mikrowelle: Panasonic Solo Inverter Mikrowelle, Art. Nr: NN-SD271S
- Videokamera: Sony MiniDV Handycam® DCR-HC52, Sony (Minato, TKY, Japan)
- Eppendorfgefäß (1,5 ml): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Art.Nr: Z666548
- Plastikwaren
  - Petrischalen (10 cm x 1,5 cm): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Art.Nr: P5731
  - “12-well-plates”: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Art.Nr: SIAL0513
- Objektträger: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Art.Nr: S8902

2.1.3. Verwendete Lösungen

- PBS-Pufferlösung: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Art.Nr: D8537

2.1.4. Fliegenstämme

- *Canton S*-Stamm, Isolierung: Etges (2007)
- *"bully"*-Stamm, Erstveröffentlichung: Penn et al. (2010)
- *TpH-GAL4*-driver, Erstveröffentlichung: Alekseyenko et al. (2010)
- *UAS-Shi^{ts1}*-Stamm, Erstveröffentlichung: Waddell et al. (2000), Kitamoto (2001)
- *UAS-dicer2;d5-HT$_{1B}$-GAL4*-driver, Erstveröffentlichung: Yuan et al. (2005)
- *UAS-d5-HT$_{1B}$-RNAi*-Stamm, Erstveröffentlichung: Yuan et al. (2005)
- Alle Stämme aus dem eigenen Laborbestand

2.1.5. Software

- Microsoft Office 2016: Microsoft (Albuquerque, New Mexico, USA)
- Graphpad Prism 6 und 7: Graphpad Software (La Jolla, California, USA)
- MATLAB R2015a: MathWorks (Natick, Massachusetts, USA)
- Adobe Master Collection CS6: Adobe Systems (San Jose, California, USA)

2.2. Fliegenbestände und genetische Kreuzungen

Die Versuchssubjekte in dem hier vorliegenden modifizierten „chronic social defeat“-Modell waren männliche, sozial naive *Drosophila melanogaster*, die im Alter von drei bis vier Tagen in den Experimentablauf eingeführt wurden. Die Fliegen wurden zwischen den Experimenten jeweils einzeln in Standardgefäßen (Reagenzgläser, 1,6 cm x 10 cm) gehalten, die mit 1,5 ml Fliegennahrung gefüllt und mit einem Baumwollstück verschlossen waren. Alternativ werden die Standardgefäße auch als sogenannte Isolationsgefäße bezeichnet. Die Nahrungsmischung wird durch Erhitzen in einer Mikrowelle verflüssigt, kann dann in diesem Zustand mit einer Pipette in die Reagenzgläser eingefüllt werden und verfestigt sich bei abkühlender Temperatur innerhalb von wenigen Minuten. Die Nahrungsmischung besteht aus 0,9% Agar-Medium, das wiederum 10,5% Saccharose, 5% Maismehl, 2,6% Backhefe und 0,23% eines Antimykotikums (Tegocept) enthält. Die Wildtyp-Fliegenstämme (Canton S) wurden vom “Drosophila Species Stock Center” der University of California at San Diego (Stamm-Nr. 14021-0231.55) bereitgestellt und erstmals 2007 in Mill Creek, Arkansas, von William Etges isoliert (Etges 2007). Die Fliegenstämme wurden in Inkubatoren gehalten, die auf eine konstante Raumtemperatur von 25°C, eine Luftfeuchtigkeit von 50% und einen 12 Stunden:12 Stunden Licht:Dunkel-Zyklus eingestellt waren.

Da die Gruppenhaltung von Fliegen zu schwer vorhersagbaren Veränderungen ihres Sozialverhaltens führt, wurden alle Versuchssubjekte und Kontrollen im Puppenstadium ungefähr 24 Stunden vor dem Schlüpfen gesammelt und in den oben beschriebenen Standardgefäßen einzeln isoliert (Abbildung 6).

Der Nahrung zugefügte Testsubstanzen wurden nach Bedarf ausgemessen, mit der flüssigen Fliegennahrung vermischt und anschließend in die Isolationsgefäße der Versuchssubjekte gefüllt. Einen Tag vor Beginn des „chronic social defeat“-Protokolls wurden die Versuchstiere mit CO_2 anästhesiert und mit Acrylfarbe auf dem dorsalen Thorax markiert, um sie im weiteren Verlauf identifizieren und von den Kontrollen unterscheiden zu können. Diese Form der Markierung ist ein Laborstandard in der *Drosophila melanogaster*-Forschung und hat keinen Einfluss auf das Verhalten der Fliegen. Die Fliegenkämpfe wurden verblindet analysiert.

Abbildung 6: *Drosophila melanogaster* in Standardgefäßen und Gruppengefäßen
Auf der linken Seite sieht man 5 Standardgefäße bzw. Isolationsgefäße, in denen jeweils eine einzelne Fruchtfliege untergebracht ist. Neben den dunklen Fliegen ist in jedem Standardgefäß noch eine hellere Struktur erkennbar. Dies ist die Hülle des Puppenstadiums, aus dem letztendlich die junge Fliege hervorgegangen ist. Auf der rechten Seite erkennt man ein Sammelgefäß mit mehreren Fliegen. Die Sammelgefäße dienen vor allem der Paarung. Die dabei entstehende Tochtergeneration wird im Puppenstadium aus dem Gruppengefäß entfernt und zur Selektion jungfräulicher Weibchen genutzt. (Bildquelle: http://www.livescience.com/1008-flirty-flies-shed-light-human-sleep-memory.html, abgerufen am 10.01.2018)

2.2.1. Das GAL4/UAS-System

Das GAL4/UAS-System ist eine präzise Methode, um die Expression bestimmter Gene in *Drosophila melanogaster* auf vielfältige Art und Weise zu manipulieren (Duffy 2002). Benötigt werden zwei verschiedene transgene Fliegenstämme, wobei ein Stamm das GAL4-Gen und der andere die UAS (Upstream Activation Sequence) enthalten muss. Diese beiden Transgene stammen ursprünglich aus der Hefe und werden weder in *Drosophila* noch in Säugetieren exprimiert. Insbesondere bei *Drosophila melanogaster* wird dieses System zur gezielten Steuerung der Genexpression genutzt. Das GAL4-Gen kodiert für das GAL4-Protein, das als Transkriptionsfaktor an die UAS bindet. Die UAS ist eine „enhancer"-Sequenz, die die Expression nachfolgender Gene steigert (Abbildung 7).

Der erste transgene Fliegenstamm ist der sogenannte „GAL4-Driver“ (auch verkürzt als „driver“ bezeichnet), welcher das GAL4-Gen zelltypspezifisch exprimiert. Hierfür wählt man einen Promotor aus, der spezifisch für den gewünschten Zelltyp ist und somit nur in einem bestimmten Gewebe bzw. in einer bestimmten Zellpopulation aktiv ist. Downstream von diesem Promotor fügt man nun das GAL4-Gen ein. Der dabei entstehende transgene Fliegenstamm exprimiert somit das GAL4-Protein nur in den Zellen, in denen der Promotor auch aktiv ist. Der zweite transgene Fliegenstamm wird benötigt, um das Gen festzulegen, das manipuliert werden soll. Indem man upstream vom gewünschten Gen eine UAS als „enhancer“ einbringt, kann dessen Regulation zukünftig durch GAL4-Bindung reguliert werden. In beiden transgenen Stämmen liegt jeweils das GAL4-Gen oder nur die UAS vor, sodass es zu keiner GAL4-UAS-Bindung kommen kann und eine Veränderung der Genexpression ausbleibt. Ebenso hat das alleinige Vorhandensein des GAL4-Proteins oder der UAS nur in den seltensten Fällen Auswirkungen auf die Entwicklung der Fliege bzw. auf den adulten Phänotyp (Brand and Perrimon 1993; Duffy 2002; Phelps and Brand 1998). Werden die beiden Fliegenstämme miteinander gekreuzt, so exprimiert die Tochtergeneration in bestimmten Zellen, die mithilfe des Promotors ausgewählt wurden, das GAL4-Gen, während gleichzeitig in allen Zellen dieser Kreuzung ein bestimmtes Gen mit einer UAS markiert ist. Die Tochtergeneration enthält dadurch eine bestimmte Anzahl an Zellen, die sowohl den Transkriptionsfaktor GAL4 als auch die enhancer-Sequenz UAS enthalten. Nur in diesen Zellen bindet das GAL4-Protein an die UAS und initiiert die Expression des downstream von der UAS gelegenen Genes. Somit ermöglicht dieses System über den „GAL4-driver“ einen spezifischen Zelltypus auszuwählen und in diesem die Expression eines gewünschten Gens zu aktivieren. Dieser Ansatz wurde stetig weiterentwickelt, sodass es mittlerweile „GAL4-driver“ gibt, die nicht nur spezifisch für bestimmte Gewebe, sondern sogar selektiv für einzelne Neuronen sind. Des Weiteren verfügt man heutzutage auch über UAS, die die Genexpression nicht nur aktivieren, sondern auch hemmen können (Jones 2009).

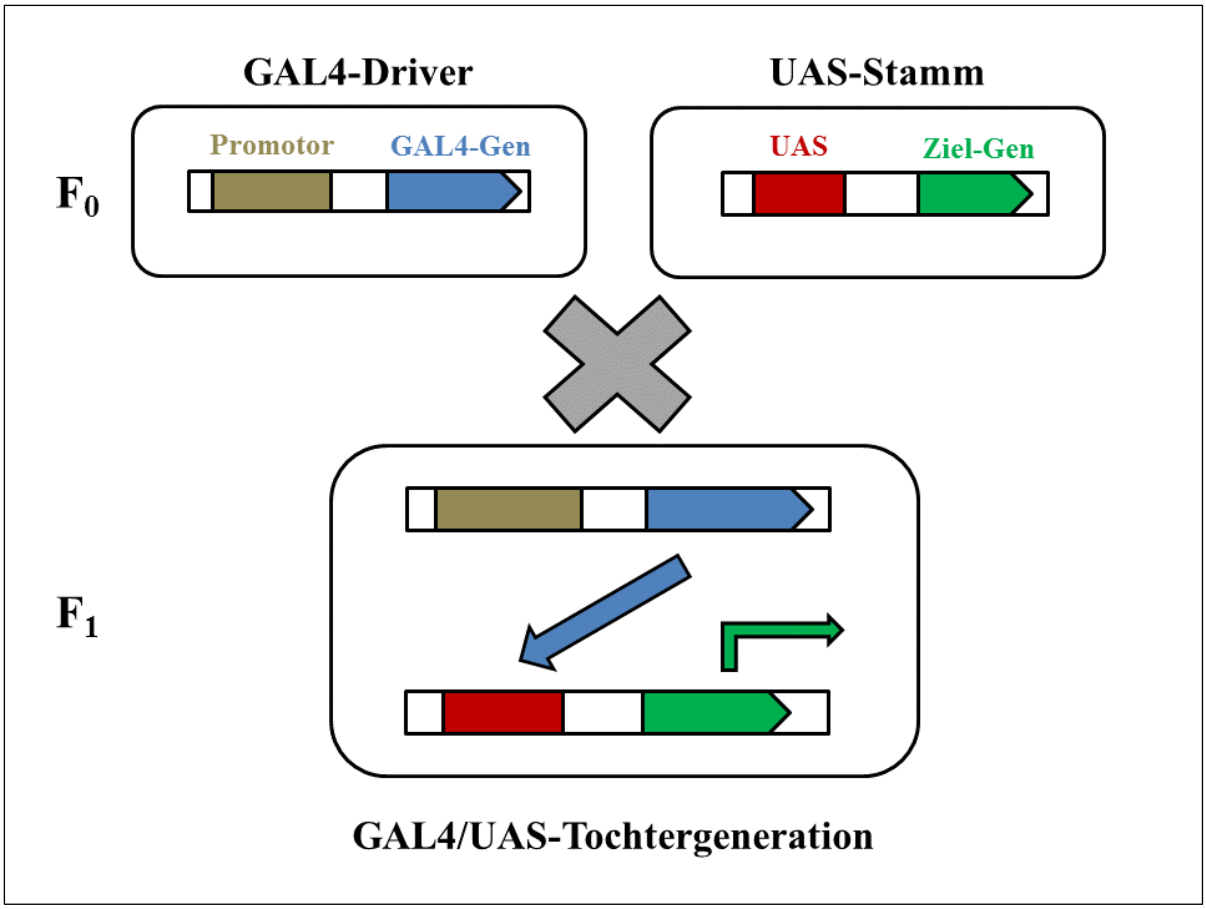


Abbildung 7: GAL4/UAS-System.
Spezifische Genexpression in der Tochtergeneration (F_1-Generation) wird ermöglicht durch Kreuzung der beiden transgenen Fliegenstämme (F_0-Generation): der GAL4-Driver exprimiert den GAL4-Transkriptionsfaktor in Abhängigkeit von einem zelltyp-spezifischen Promotor; der UAS-Stamm enthält die UAS, die nach GAL4-Bindung die Expression des gewünschten Ziel-Gens aktiviert.

2.3. Aufbau und Struktur eines Fliegenkampfes

Der Kampf zwischen zwei Fliegen findet in einer Arena statt, die aus mehreren Komponenten gefertigt wird (Abbildung 8). Zunächst nimmt man vier der Länge nach halbierte mikroskopische Objektträger und klebt sie an ihren Enden zusammen, sodass eine Glaskammer mit quadratischer Grundfläche entsteht (Seitenlänge: 3,75 cm; Höhe: 2,5 cm; Dicke der Objektträger 1 mm). Diese Glaskammer wird nun in eine Petrischale (Durchmesser: 10 cm) gestellt, die eine 1-2 cm hohe Agarosegel-Schicht enthält und den Boden der Arena darstellt. In diese Arena wird anschließend der sogenannte „food cup“ platziert. Dieser besteht aus einem kleinem zylindrischen Behältnis (Durchmesser: 1,5 cm; Höhe: 1 cm), das mit normaler Fliegennahrung angefüllt ist. Auf die Fliegennahrung können anschließend als zweiter besonderer Anreiz beispielsweise Hefekörner, einige Tropfen Apfelsaft oder ein kurz zuvor geköpftes Weibchen gegeben werden. Dadurch kämpfen die männlichen Fliegen sowohl um die Grundnahrungsressource selbst als auch um ein weiteres begehrenswertes Objekt. In der Praxis hat sich das Weibchen als stärkster Auslöser von aggressivem Verhalten erwiesen, sodass in der hier vorliegenden Arbeit ausschließlich Weibchen als zweite Komponente verwendet wurden. Das Weibchen wird kurz vor dem Kampf geköpft und danach mit leichtem Druck in der Nahrung befestigt, sodass die Männchen den Körper des Weibchens sehen und gleichzeitig auch die weiterhin sezernierten Duftstoffe wahrnehmen können. Gedeckelt wird die Arena mit einer weiteren Petrischale, die mehrere kleine Luftlöcher zur Luftversorgung, sowie ein größeres Loch zur Einbringung der Fliegen in die Arena, enthält (Chen et al. 2002). Alle Kämpfe dauerten 90 Minuten und wurden, soweit nicht anderweitig deklariert, bei 25° Grad Celsius und 50% Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Ebenfalls wurden alle Kämpfe mit einer Sony MiniDV Handycam DCR-HC52 während der gesamten Dauer gefilmt und anschließend verblindet ausgewertet.

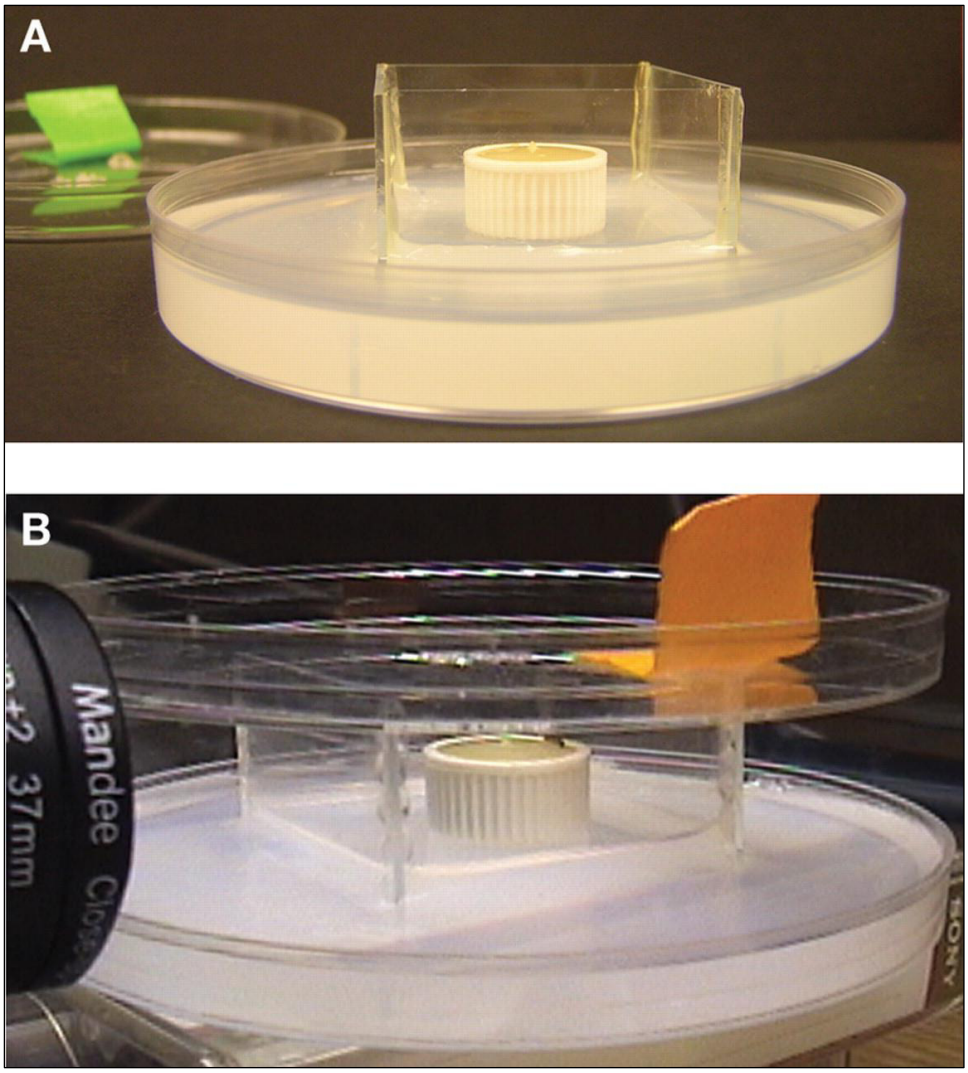


Abbildung 8: Aufbau der Arena
A) Bestandteile der Arena: Petrischale gefüllt mit Agarosegel; in das Gel eingedrückte viereckige Kammer bestehend aus jeweils zwei der Länge nach halbierten Objektträgern; im Zentrum der Kammer liegender „food cup“ (hier ohne Weibchen); Deckelung der Arena mit einer weiteren Petrischale (im Hintergrund mit grünem Klebestreifen erkennbar).
B) Die Arena ist abgedeckt und der darin stattfindende Kampf wird von einer Videokamera (am linken Bildrand sichtbar) aufgezeichnet. Das orange Stück Klebestreifen dient zur Abdeckung des Loches im Deckel der Petrischale, über das die Fliegen in die Arena eingebracht wurden. (Certel and Kravitz 2012)

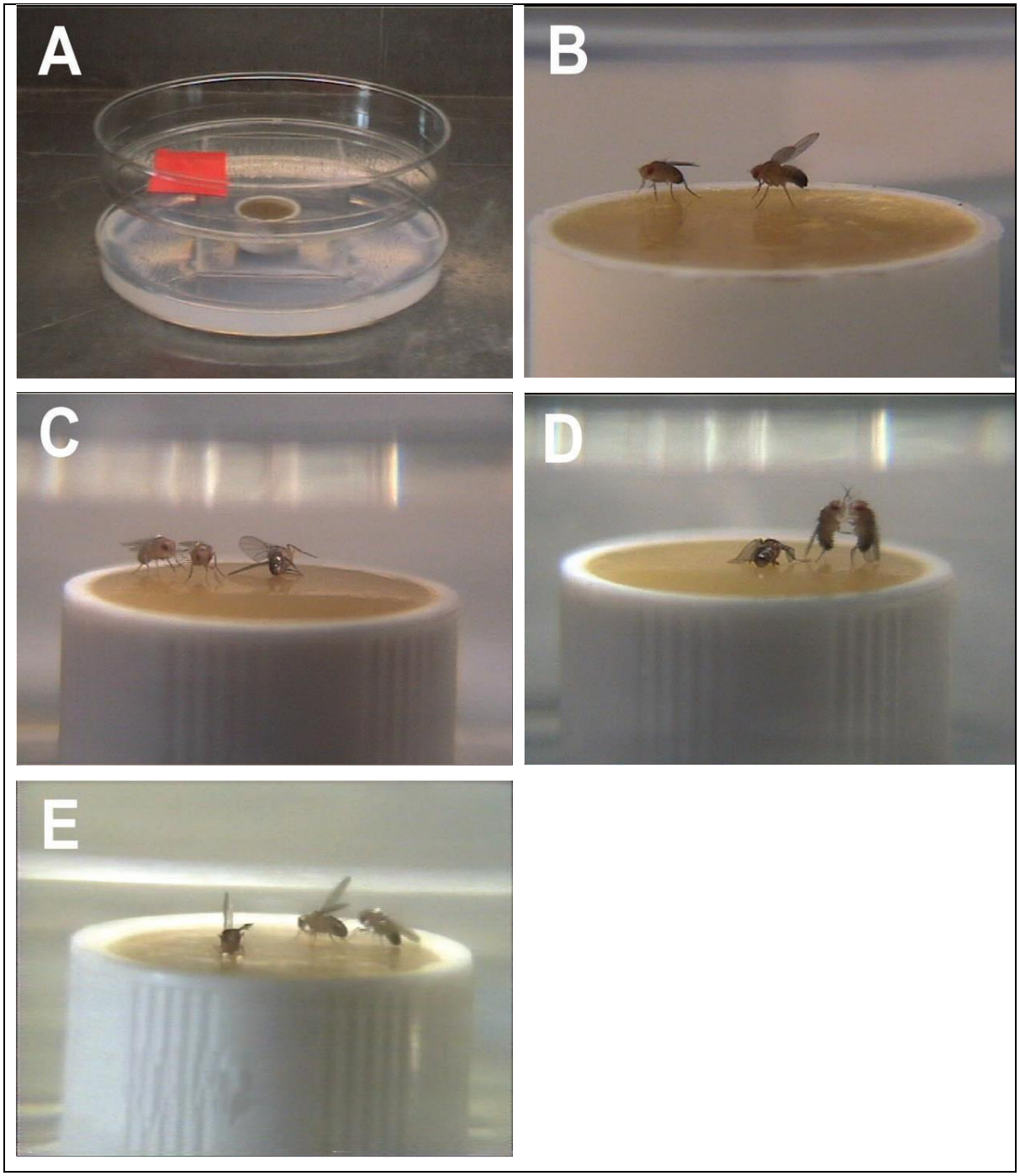


Abbildung 9: Verschiedene Szenen aus Fliegenkämpfen.
A) Blick auf eine Arena mit Glaskammer, Petrischale mit Agarosegel, Petrischale als Deckplatte und „food cup“ in der Mitte der Arena. B) Zwei männliche Fliegen auf dem „food cup“ bei Verwendung von Apfelsaft als zweitem Anreiz. C), D) und E) Zwei kämpfende männliche Fliegen mit einer geköpften weiblichen Fliege in der Mitte des „food cups“. Die weißen Markierungen auf dem dorsalen Thorax der Fliegen ist in C) und E) gut erkennbar (Chen et al. 2002).

2.3.1. Charakteristika und Auswertung eines Fliegenkampfes

Sobald man beide Fliegen mit einem sogenannten Aspirator in die Arena eingebracht hat (eine Vorrichtung, die mit leichtem Luftdruck Fliegen ansaugen und herausblasen kann), dauert es nur wenige Minuten bis die beiden Männchen orientiert sind und sich auf dem „food cup“ einfinden. Nach einer weiteren kurzen Orientierungsphase, in der die Männchen zum einen die Anwesenheit des Weibchens und zum anderen die Gegenwart des anderen Männchens registrieren, kommt es zu ersten aggressiven Verhaltensweisen. Hierbei gibt es zahlreiche verschiedene Formen, die sich sowohl nach der Art (Angriff, Verteidigung) als auch der Intensität (hoch, niedrig) der Muster einstufen lassen (Tabelle 2). Bei weiblichen Fliegen werden nur Handlungen niedriger Intensität, wie beispielsweise „holding“ oder „wing threat“ beobachtet. Dominanzen und Hierarchien mit klaren Gewinnern und Verlierern werden nicht ausgebildet (Chen et al. 2002; Penn et al. 2010). Männliche Fliegen sind jedoch zu einem breiten Spektrum an aggressivem Verhalten in der Lage, von „boxing“ über „tussling“ bis hin zum „lunging“. Der sogenannte „lunge“, eine Handlung, bei der sich die angreifende Fliege auf ihre Hinterbeine stellt, um sich danach mit ihren Vorderbeinen auf den Gegner zu werfen, ist das am häufigsten verwendete Angriffsmanöver von Wildtyp-Fliegen. Es ist aufgrund seiner eindeutigen Identifizierbarkeit anhand des Videomaterials heutzutage der Goldstandard in der Analyse von Kämpfen. Im Laufe des Kampfes ergeben sich also verschiedene Angriffs- und Verteidigungsmanöver zwischen den beiden Fliegen, allen voran der erwähnte „lunge“, bis letztendlich eine der beiden Fliegen aufgibt und von dem „food cup“ in die Peripherie der Arena flüchtet. Die auf dem „food cup“ verbleibende Fliege hat sich damit als die dominante erwiesen und widmet sich anschließend der Nahrung und dem Weibchen. Jedoch bedeutet dies nicht das Ende des Kampfes, denn die zunächst unterlegene Fliege kehrt für gewöhnlich etliche Male auf den „food cup“ zurück, wodurch es immer wieder zu Auseinandersetzungen mit der dominanten Fliege kommt, bis die unterlegene Fliege schlussendlich in der Peripherie verbleibt und die Hierarchie etabliert ist (Chen et al. 2002; Penn et al. 2010; Yurkovic et al. 2006). Eine extrem seltene Erscheinung ist hierbei der sogenannte „hierarchy switch“, bei dem es der zuerst unterlegenen Fliege nach Rückkehr auf den „food cup“ gelingt die vormals dominante Fliege zu besiegen und selber dominant zu werden. Systematische Arbeiten zur Häufigkeit und Ätiologie dieses Ereignisses liegen aktuell nicht vor. Aufgrund der Interpretationsunsicherheit und schwierigen Klassifikationen wurden diese Ereignisse nicht in die Auswertung einbezogen und gesondert notiert.

Angriff (niedrige Intensität)	
„approach“	Fliege senkt ihren Oberkörper und nähert sich der gegnerischen Fliege
„low-level fencing“	Die Fliegen stehen nebeneinander strecken jeweils ein Bein zur Seite aus und schlagen damit auf den Gegner ein
„wing threat“	Fliege stellt ruckartig beide Flügel im 45° Winkel auf
„shoving“	Fliege nähert sich dem Gegner und versucht ihn mit ihrem Körper zu schubsen und abzudrängen
„holding“	Fliege hält den Gegner mit den Vorderbeinen fest und versucht ihn damit zu immobilisieren
„high-level fencing“	Die Fliegen stehen sich direkt gegenüber, strecken ein Bein aus und schlagen damit auf den Gegner ein
Angriff (hohe Intensität)	
„lunging“	Fliege stellt sich auf ihre Hinterbeine, schnellt rückartig nach vorne und wirft sich dabei mit ihren Vorderbeinen auf den Gegner
„boxing“	Beide Fliegen stehen auf ihren Hinterbeinen und schlagen mit ihren Vorderbeinen aufeinander ein
„tussling“	Beide Fliegen kämpfen mit höchster Intensität, werfen sich gegenseitig durch die Arena und verlassen dabei auch teilweise den „food cup“
Verteidigung	
„walk away“	Fliege dreht sich um und entfernt sich langsam vom Gegner
„defensive wing threat“	Fliege dreht sich vom Gegner weg und stellt die Flügel um 45° auf
„run/chased away“	Fliege rennt vor der angreifenden Fliege weg
„fly away“	Fliege fliegt weg, verlässt den „food cup“ und verliert den Kampf

Tabelle 2: Übersicht der verschiedenen Verhaltensmuster der Fliegen während eines Kampfes. (Chen et al. 2002)

2.3.2. Visuelle Darstellung der Kampfhandlungen

Auf der beiliegenden DVD sind insgesamt neun Videoaufnahmen enthalten, die verschiedene Kampfhandlungen der *Drosophila melanogaster* veranschaulichen sollen. Die Filmdateien liegen in den Formaten „.mov“ und „.mp4“ vor und sind mit dem QuickTime-Player, dem Windows Media Player und dem VLC Media Player abspielbar. Alle Filmaufnahmen wurden in unserem Labor durchgeführt und stammen aus unterschiedlichen, separat durchgeführten Fliegenkämpfen.

Der erste Film zeigt das sogenannte „fencing“, bei dem die Fliegen ein Bein ausstrecken und den Gegner damit berühren bzw. ihn damit schlagen (vor allem bei Sekunde 7 bis 11 gut sichtbar). Da die Fliegen im Film während des „fencing“ nebeneinanderstehen, handelt es sich hierbei um „low-level fencing“. Der zweite Film zeigt das „holding“, bei dem sich die angreifende, grün markierte Fliege auf den schwarz markierten Gegner stützt, diesen mit den beiden Vorderbeinen greift und versucht zu immobilisieren. Der dritte Film zeigt den „wing threat“, bei dem die weiß markierte Fliege ihre Flügel hoch aufstellt und damit versucht den grün markierten Gegner einzuschüchtern. Sehr gut ist hierbei sichtbar, wie die Fliege zunächst einen „lunge“ ausführt und danach den „wing threat“ präsentiert. Die Filme 4 und 5 zeigen den „lunge“, der für die Auswertung von Kämpfen der maßgebliche Parameter ist. Da es sich bei dem „lunge“ um eine enorm schnell ablaufende Bewegung handelt, sind beide Videos in Zeitlupe gefilmt worden. In beiden Filmen kann man sehr gut erkennen, wie sich die angreifende Fliege auf ihre Hinterbeine stellt, mit den Vorderbeinen nach oben ausholt und sich dann ruckartig auf die gegnerische Fliege stürzt. In Film 5 kann man bei genaueren Hinsehen auch noch sehen, wie die angreifende Fliege nach dem eigentlichen „lunge“ die gegnerische Fliege auch noch kurz festhält. Dies kann mitunter bei „lunges“ auftreten, ist jedoch nur bei Aufnahmen mit sehr hoher visueller und zeitlicher Auflösung zu erkennen.

Die Filme 6 bis 9 zeigen mehrere Fliegenkämpfe in Normalgeschwindigkeit. Der sechste Film zeigt den Anfang eines Kampfes, bei dem die Aggression rasch zunimmt und beide Fliegen (grün und weiß markiert) wechselseitige „lunges“ und teilweise auch „holds“ durchführen. Der weitere Verlauf des Kampfes bzw. die Hierarchiebildung sind hier nicht aufgenommen. Der siebte Film zeigt sehr eindrücklich wie zunächst die erste Fliege angreift und zahlreiche „lunges“ durchführt (Sekunde 0 bis 5), bevor die andere Fliege zum Gegenangriff übergeht (ab Sekunde 6). Beide Fliegen erscheinen sehr aggressiv und es sind zahlreiche „lunges“ und „holds“ erkennbar. Zum Ende der Aufnahme hin stehen beide Fliegen auf ihren Hinterbeinen und schlagen sich wechselseitig mit ihren Vorderbeinen, was man als „boxing“ bezeichnet (ab

Sekunde 14). Das sogenannte „boxing“ ist eines der Aggressionsmuster mit der höchsten Intensität und wird nur dann beobachtet, wenn beide Fliegen ein ausreichend hohes Aggressionslevel aufweisen. Der achte Kampf zeigt einen typischen Kampfverlauf, bei dem die weiße Fliege nach mehreren „lunges“ ihren grün markierten Gegner in die Flucht schlägt. Zu Beginn sieht man ein kurzes „fencing“ der grün markierten Fliege (Sekunde 0 bis 1), woraufhin die weiß markierte Fliege sofort zum Angriff übergeht und ihren Gegner mit insgesamt 10 „lunges“ zum ersten Mal vom „food cup“ verjagt (Sekunde 1 bis 6). Die grün markierte Fliege landet jedoch sofort wieder auf dem „food cup“, sodass die weiß markierte Fliege ihren Angriff ohne Zögern fortsetzt. Es kommt zu einer schnellen Abfolge von „lunges“ und „holds“, die letztendlich dazu führt, dass die grün markierte Fliege endgültig den „food cup“ verlässt (Sekunde 6 bis 10). Der neunte Film setzt ein, nachdem die weiß markierte Fliege ihre erste Auseinandersetzung mit der grün markierten Fliege gewonnen hat und nun ihr Territorium verteidigt. Sichtbar wird, wie robust die gebildeten Gewinner-Verlierer-Paare sind und wie die siegreiche Fliege ihre Dominanz behauptet. Zunächst sieht man wie die grün markierte Fliege an der Außenseite des „food cups“ herauf klettert (Sekunde 0 bis 3) und dann sogar eine kurze Weile an der Kante des „food cups“ verharrt und augenscheinlich die weiß markierte Fliege beobachtet (Sekunde 3 bis 5). Anschließend betritt sie den „food cup“ und nähert sich der weiß markierten Fliege an, die sofort in den Angriff übergeht. Die weiß markierte Fliege attackiert die grün markierte Fliege mit insgesamt 7 „lunges“ und zwingt diese damit erneut in die Flucht (Sekunde 5 bis 11).

Selbstverständlich gibt es zahlreiche weitere Verhaltensmuster, jedoch sollten mit den gezeigten Videoaufnahmen die wichtigsten Muster und der generelle Ablauf von Fliegenkämpfen möglichst anschaulich dargestellt werden. Für den weiteren Verlauf dieser Arbeit ist vor allem der „lunge“ und die Formierung von klaren Hierarchien besonders wichtig.

2.4. Das „chronic social defeat“-Modell (CSD-Modell)

2.4.1. Aufbau und Struktur des Modells

Das hier verwendete „chronic social defeat“-Modell (CSD-Modell) ist in Aufbau und Struktur an die wegweisende Arbeit von Nestler und Kollegen (Krishnan et al. 2007) angelehnt und für den *Drosophila*-Organismus modifiziert worden (Abbildung 10). Die Versuchssubjekte waren drei bis fünf Tage alte, sozial naive Wildtyp-*Drosophila*, die dem „Canton S“-Stamm angehörten und im weiteren Verlauf als CS-Fliegen bezeichnet werden. Diese naiven CS-Fliegen, die noch keinen Kontakt zu einer anderen Fliege hatten, wurden zunächst farblich markiert und am Tag danach in ein sechs Tage dauerndes „chronic social defeat“-Protokoll eingeschleust. An jedem dieser sechs Tage musste die CS-Fliege um die gleiche Uhrzeit und bei jeweils identischen Raum- und Temperaturbedingungen gegen eine Fliege des „bully“-Stammes kämpfen. Diese „bully“-Fliegen sind hyperaggressive Fliegen, die über 34-37 Inzuchtgenerationen selektiert wurden und ein massiv gesteigertes Aggressions-, sowie ein klar überlegenes Kampfverhalten zeigen. Sie entscheiden 94% ihrer Kämpfe gegen CS-Fliegen für sich (Penn et al. 2010). Zudem wurden für dieses Experiment nur besonders große „bully“-Fliegen ausgewählt, die deutlich größer waren als ihre CS-Gegner. Die täglichen Kämpfe zwischen den CS-Versuchsfliegen und den „bully“-Gegnern wurden über eine Videokamera aufgezeichnet und anschließend ausgewertet. Nur falls über die Videoanalyse klar nachgewiesen werden konnte, dass die CS-Fliege ihren Kampf gegen den „bully“ verloren hatte, wurde sie im CSD-Protokoll behalten. Konnte kein klarer Gewinner bzw. Verlierer identifiziert werden oder gewann die CS-Fliege ihren Kampf, so kam es zum Ausschluss der CS-Fliege aus dem CSD-Protokoll. Letztendlich erhielt man am Ende des sechsten Versuchstages eine Gruppe an CS-Fliegen, die sechs Kämpfe innerhalb von sechs Tagen gegen die hyperaggressiven „bully“-Fliegen verloren hatten. Am siebten Tag mussten diese „chronischen Verlierer“ nun im sogenannten Testkampf gegen naive CS-Fliegen antreten, die gleich groß und gleich alt waren, aber keinerlei vorherige Kampferfahrung besaßen. Unabhängig vom Ausgang des Testkampfes wurden die „chronischen Verlierer“ am achten Tag einer weiteren phänotypischen Untersuchung in Form einer Saccharosepräferenzanalyse (s.u.) unterzogen. Da deren Auswertung eine komplizierte Verarbeitung der „chronischen Verlierer“ erforderte, die auch mit der Abtrennung ihrer Köpfe einherging, stellte der achte Versuchstag zugleich auch den Abschluss des „chronic social defeat“-Protokolls dar.

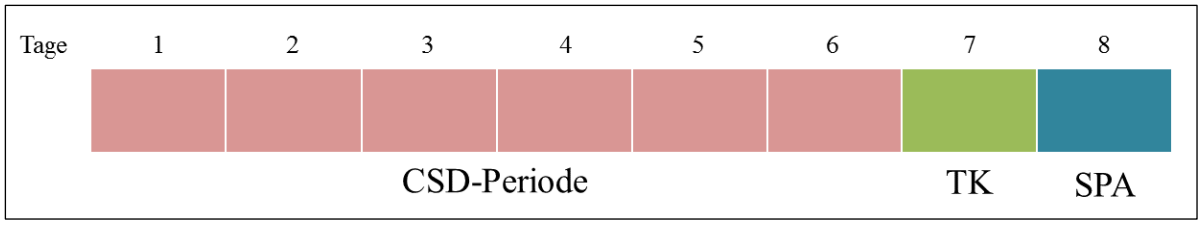


Abbildung 10: Ablauf des „chronic social defeat"-Protokolls.
CSD-Periode („chronic social defeat"-Periode), TK (Testkampf), SPA (Saccharosepräferenzanalyse)

2.4.2. Versuch der Protokolloptimierung durch Gabe von 5-Hydroxytryptophan

In Anbetracht der Tatsache, dass die Gesamtdauer des „chronic social defeat"-Protokolls acht Tage betrug und damit gemessen an herkömmlichen Experimenten auf dem Gebiet der *Drosophila melanogaster* außerordentlich aufwendig war, wurde ein Ansatz gesucht, den Ablauf des Experiments zu optimieren. In diesem Sinne, versuchten wir die Kämpfe während der CSD-Periode noch deutlicher zugunsten der „bully"-Fliegen zu verändern. Dadurch sollte die Anzahl an CS-Fliegen, die aufgrund eines gewonnenen Kampfes aus dem Protokoll ausscheiden, verringert und die Anzahl an „chronischen Verlierern" erhöht werden. Um dies zu erreichen versuchten wir die Aggressivität bzw. die Kampfkraft der „bully"-Fliegen noch weiter zu steigern. Trotz der hohen Gewinnchance der „bully"-Fliegen mussten allein aufgrund der enorm hohen Anzahl der Kämpfe immer wieder CS-Fliegen ausgeschlossen werden, da ein einziger Sieg gegen einen „bully" ein absolutes Ausschlusskriterium war. In Anbetracht der Tatsache, dass Serotonin die Intensität eines Kampfes zwischen zwei männlichen *Drosophila* signifikant steigert (Alekseyenko et al. 2010), versuchten wir mittels einer artifiziellen Erhöhung der Serotoninkonzentration im Gehirn der „bully"-Fliegen eine noch höhere Kampfbereitschaft und damit eine Steigerung der Gewinnrate gegen CS-Fliegen zu erreichen.

Hierzu züchteten wir „bully"-Fliegen, denen wir 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) in ihre herkömmliche Fliegennahrung mischten. 5-HTP ist eine Aminosäure, aus der im ZNS der *Drosophila* Serotonin synthetisiert wird. Eine Beimischung von 5-HTP zur normalen Fliegennahrung über einen Zeitraum von vier Tagen erhöht die Serotoninkonzentration im ZNS der Fliege um das 20-fache (Dierick and Greenspan 2007). In diesem Sinne hofften wir mittels einer Steigerung der zentralnervösen Serotoninkonzentration noch aggressivere „bully"-Fliegen zu erzeugen. Die „bully"-Fliegen, die wir letztendlich auf diese Weise generierten, zeigten zwar eine geringere Latenzzeit bis zum Erreichen des „food cups", jedoch fanden wir darüber hinaus keine relevanten phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu herkömmlichen „bully"-Fliegen. Insbesondere ließ sich keine Zunahme von aggressivem

Verhalten detektieren. Dementsprechend führten wir die Versuchsreihe unverändert mit den normalen „bully“-Fliegen fort.

2.5. Saccharosepräferenzanalyse (SPA)

Nach der „chronic social defeat“-Periode und dem Testkampf folgte jeweils am Ende des Protokolls die eigens für dieses Experiment entworfene Saccharosepräferenzanalyse (SPA), die nun ausführlich erläutert werden soll.

2.5.1. Aufbau und Durchführung

Für die SPA benötigt man eine „12-well-plate“ (eine Platte aus durchsichtigem Plastik mit 3x4 Vertiefungen, siehe Ausschnitt in Abbildung 11) und zwei verschiedene Nahrungsmischungen. Die „12-well-plate“ besteht aus Polystyren und besitzt 12 kreisförmige Vertiefungen (Durchmesser: 2 cm, Tiefe: 1,5 cm). In diese Vertiefungen wird von beiden Nahrungsmischungen jeweils ein Tropfen (ca. 10 µl) platziert. Beide Nahrungsmischungen basieren auf der herkömmlichen, bereits beschriebenen, Fliegennahrung und unterscheiden sich lediglich durch ihren Saccharosegehalt. Eine der Nahrungsmischungen enthält 130 mg Saccharose/ml Fliegennahrung, während die andere mit 260 mg Saccharose/ml Fliegennahrung den doppelten Zuckergehalt aufweist. Diese Mischungen werden mit rotem (Allura Red, Red No.40, Absorptionsmaximum bei 504 nm) oder blauem Lebensmittelfarbstoff (Brilliant Blue, Blue No.1, Absorptionsmaximum bei 630 nm) eingefärbt, wobei zu 1 ml Nahrungsmischung 800 µl Farbstoff gegeben werden. Der Vorteil des Gebrauchs dieser Farbstoffe besteht darin, dass sie im Gastrointestinaltrakt der *Drosophila* nicht prozessiert und nach einer gewissen Zeit unverdaut wieder ausgeschieden werden (Edgecomb et al. 1994). Ebenso wurde die Färbung der jeweiligen Nahrungsmischungen alternierend zwischen Allura Red und Brilliant Blue gewechselt, um einen möglichen Einfluss der Farbe auf das Essverhalten zu vermeiden. Zunächst bereitet man die Nahrungsmischungen vor, pipettiert sie dann tropfenweise in die jeweiligen „wells“, platziert die Fliegen einzeln die „wells“ und deckt diese direkt danach mit einer Glasplatte ab. Anschließend werden die Fliegen für zwei Stunden unter kontrollierten Bedingungen (25°C, Licht, 50% Luftfeuchtigkeit) in den „wells“ belassen (Abbildung 11). Die Zeitdauer von zwei Stunden wurde von uns als Kompromiss nach zahlreichen Testläufen gewählt. Durch diese vergleichsweise lange Essperiode konnte sichergestellt werden, dass die Fliegen ausreichend Nahrung bzw. Farbstoff aufnehmen, ohne vorher ihren Appetit mit einer zusätzlichen Hungerphase steigern zu müssen. In einigen anderen Publikationen werden deutlich kürzere Essensphasen verwendet, um das Experiment praktikabler durchführen zu können. Um dennoch eine ausreichende Nahrungs- und Farbstoffaufnahme zu gewährleisten, wird von den meisten Autoren eine mehrstündige Hungerphase vor der Essensphase eingerichtet. In unserem Fall wäre eine solche Hungerphase jedoch ein unnötiger, zusätzlicher

Einflussfaktor, der den Effekt von „chronic social defeat“ auf die Nahrungsaufnahme und die Saccharosepräferenz beeinflussen würde. Dementsprechend verzichteten wir auf die Hungerphase und verlängerten die Phase der Nahrungsaufnahme. Ebenso erwiesen sich zwei Stunden als Essensphase geeignet, da in unseren Versuchen eine Ausscheidung der Nahrung bzw. des Farbstoffes erst nach ungefähr drei Stunden begann. Dies ist auf unsere Beobachtungen gestützt, wobei keine systematischen Daten hierzu von uns erhoben wurden. Eine kritische Betrachtung der SPA findet sich im Diskussionsteil dieser Arbeit (siehe 4.3).

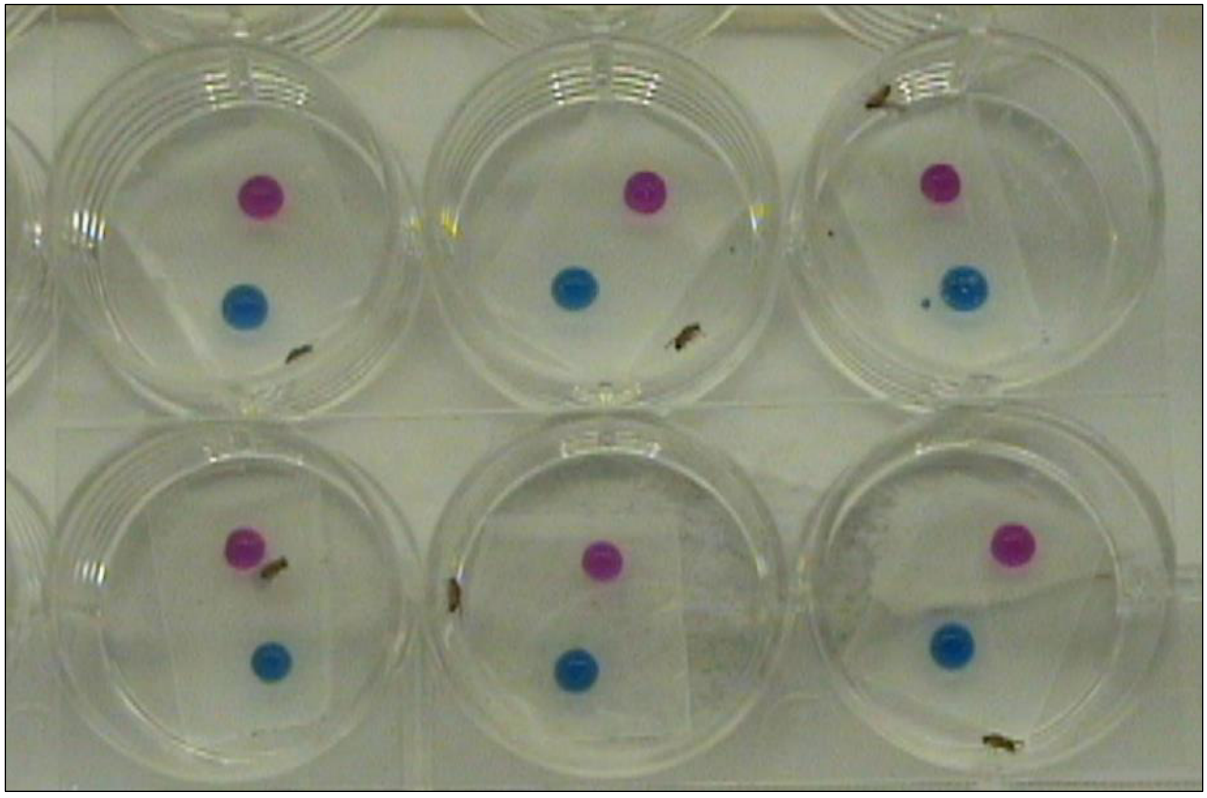


Abbildung 11: Darstellung des experimentellen SPA-Ansatzes.
Blick von oben auf eine laufende SPA: sichtbar sind 6 von 12 „wells“ (Vertiefungen), die jeweils zwei Tropfen gefärbte Nahrung und eine Fliege enthalten

Unmittelbar nach Ablauf der Versuchsdauer werden die „12-well-plates“ mitsamt den enthaltenen Fliegen vorsichtig eingesammelt und in einem Gefrierschrank (-18°C) platziert. Durch die starke Absenkung der Umgebungstemperatur werden die Fliegen direkt nach Abschluss des Versuchs immobilisiert und der gesamte Metabolismus gestoppt. Somit prozessieren die Fliegen die gerade aufgenommene Nahrung nicht mehr weiter, wodurch eine nachträgliche Beeinflussung des Testergebnisses durch Ausscheidung des Farbstoffes nach dem Ende des Beobachtungszeitraumes verhindert wird. Zudem wirkt die Einfrierung auch als schnelles und effizientes Mittel den Tod der Fliegen herbeizuführen ohne unnötige Stressreaktionen oder körperliche Schäden zu bewirken (Luckinbill 1998). Am folgenden Tag

müssen die toten Fliegen für die Auswertung mittels Spektralphotometrie vorbereitet werden. Ziel ist hierbei den Farbstoff, den die Fliege während der Essensphase aufgenommen hat und der zu diesem Zeitpunkt in ihrem Gastrointestinaltrakt gespeichert ist, möglichst vollständig zu extrahieren. Wichtig ist hierbei auch, dass der Farbstoff in einer möglichst klaren, für die Spektralphotometrie zugänglichen Flüssigkeit gelöst wird. Jede einzelne Fliege wird separat behandelt und verarbeitet, sodass pro Fliege eine Probe für die Spektralphotometrie entsteht. Zuerst werden die Fliegen mithilfe einer Rasierklinge unter mikroskopischer Betrachtung geköpft, um zu verhindern, dass der rote Farbstoff aus den Augen der Fliegen mit der spektralphotometrischen Auswertung interferiert. Danach wird der Korpus der Fliege in 100 µl PBS-Pufferlösung (Phosphate buffered saline) mit einem kleinen Mörser in einem Reaktionsgefäß homogenisiert und anschließend bei 16.000 G für 40 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstehende, klare Überstand stellt die Probe für die nachfolgende Spektralphotometrie dar. Dieser Überstand besteht im Wesentlichen aus der initial hinzugefügten PBS-Pufferlösung und dem darin in Lösung gegangenen Farbstoff, der ursprünglich im Korpus bzw. im Gastrointestinaltrakt der Fliege enthalten war.

2.5.2. Bestimmung der Saccharosepräferenzratio (SPR)

Das derzeit gängigste, und auch hier verwendete Gerät, ist das sogenannte Zweistrahl-UV/Visual-Spektrometer (in unserem Fall ein Nanodrop 2000c). Die beiden verwendeten Farbstoffe (Allura Red, Brilliant Blue) haben ihre Absorptionsmaxima bei 504 nm und 630 nm. Folglich wurde die Absorption des Überstandes im Nanodrop 2000c bei Wellenlängen von 504 nm und 630 nm im Vergleich zur Referenz PBS gemessen. Die Konzentration des Farbstoffes im Überstand wurde mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt. Als Standardkurve diente eine Verdünnungskurve aus einer vorher durchgeführten seriellen Verdünnung des Allura Red- bzw. des Brilliant Blue-Farbstoffes in PBS-Pufferlösung.

Um sicherzustellen, dass die beiden Farbstoffe möglichst die einzigen absorbierenden Substanzen in der generierten Probelösung sind, müssen alle weiteren Stoffe, die potentiell absorbierend wirken können, beseitigt werden. Die initiale Dekapitation und Entsorgung der Fliegenköpfe verhindert, dass der rote Farbstoff aus den Augen der Fliegen mit der Messung interferiert. Mithilfe der Zentrifugation entfernt man Zellmaterial sowie Verunreinigungen aus der Probe. Da die Fliegen in insgesamt 100 µl PBS-Pufferlösung (V) homogenisiert und die Konzentration des Farbstoffes in der Probelösung (C) spektrophotometrisch ermittelt wurde, kann man die Gesamtmenge (M) eines beliebigen Farbstoffes (X), die im Körper der Fliege enthalten war, wie folgt berechnen:

$$C(X) = \frac{M(X)}{V}, \qquad M(X) = C(X) \times V, \qquad M(X) = C(X) \times 100\mu l$$

Die aufgenommene Menge an Farbstoffen soll verwendet werden um eine mögliche Präferenz der Fliegen für süße bzw. für normale Nahrung zu quantifizieren. Hierfür soll als Parameter die sogenannte Saccharosepräferenzratio (SPR) eingeführt werden. Da der jeweilige Farbstoff stets im festen Verhältnis von 800 µl zu 1 ml Fliegennahrung zugegeben wurde, ist die aufgenommene Menge an Farbstoff proportional zur verzehrten Menge an Fliegennahrung, zu der dieser Farbstoff beigemischt wurde. Wurde nun beispielsweise die süße Nahrung (SN) mit Allura Red (AR) und die normale Nahrung (NN) mit Brilliant Blue (BB) angefärbt, so kann man die SPR als Verhältnis von SN- und NN-Aufnahme wie folgt ermitteln:

$$SPR = \frac{M(AR)}{M(BB)} = \frac{C(AR) \times 100\mu l}{C(BB) \times 100\mu l} = \frac{C(AR)}{C(BB)} = \frac{SN}{NN}$$

Mithilfe der Spektrophotometrie lässt sich die Konzentration der Farbstoffe C(AR) und C(BB) messen und dementsprechend die Präferenz einer Fliege für süße Nahrung gegenüber normaler Nahrung quantifizieren.

2.5.3. Bestimmung der gesamten Nahrungsaufnahme (GNA)

Mit einigen zusätzlichen Rechenvorgängen kann man darüber hinaus auch die gesamte Nahrungsaufnahme (GNA) der Fliegen ermitteln. Die bereits kalkulierten Mengen an aufgenommenen Farbstoffen (AR, BB) dienen als Grundlage für die Berechnung der insgesamt verzehrten Menge an Fliegennahrung. Zu Beginn des SPA-Protokolls wurde jeweils 1 ml süßer bzw. normaler Nahrung 800 µl des jeweiligen Farbstoffes beigemischt. Setzt man nun das Beispiel aus dem vorherigen Paragraphen fort (süße Nahrung mit AR und normale Nahrung mit BB gefärbt), so kann man die absoluten Mengen an süßer Nahrung und normaler Nahrung wie folgt berechnen:

$$\frac{M(SN)}{M(AR)} = \frac{1}{0{,}8}, \qquad M(SN) = \frac{M(AR)}{0{,}8} = M(AR) \times 1{,}25$$

$$\frac{M(NN)}{M(BB)} = \frac{1}{0{,}8}, \qquad M(NN) = \frac{M(BB)}{0{,}8} = M(BB) \times 1{,}25$$

Die GNA ergibt sich durch Addition der aufgenommenen Mengen an süßer und normaler Nahrung:

$$GNA = M(SN) + M(NN)$$

2.6. Serotonerge Manipulationen

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, spielt der Neurotransmitter Serotonin im *Drosophila melanogaster*-Organismus eine elementare Rolle in den Bereichen Gedächtnisbildung und Aggression (Alekseyenko et al. 2010; Dierick and Greenspan 2007; Lee et al. 2011; Miczek et al. 2007; Sitaraman et al. 2012; Sitaraman et al. 2008). Aus diesem Grund wollten wir genauer untersuchen, auf welche Art und Weise Serotonin die phänotypischen Effekte von „chronic social defeat" beeinflusst. Hierfür wählten wir zunächst globale Manipulationsmethoden aus, mit denen wir die gesamte Serotoninkonzentration im ZNS der *Drosophila* veränderten. Im weiteren Verlauf nutzten wir spezifischere genetische Instrumente, die im Anschluss erläutert werden sollen.

2.6.1. Globale Manipulationsansätze

Als globale Manipulationsansätze verwendeten wir sowohl eine diätetische Methode mittels α-Methyltryptophan-Fütterung (α-MTP), als auch eine genetische, bei der wir das GAL4/UAS-System verwendeten. Diese beiden Ansätze sollen nun näher beschrieben werden.

2.6.1.1. Chronische Serotonin-Suppression mittels α-Methyltryptophan

α-Methyltryptophan (α-MTP) ist ein spezifischer Inhibitor der Tryptophan-Hydroxylase (TpH), welche das erste Schlüsselenzym der Serotoninsynthese im ZNS der *Drosophila* darstellt (Abbildung 12). Das zweite Schlüsselenzym ist die DOPA-Decarboxylase (DDC), die neben Serotonin auch für die Biosynthese von Dopamin und Tryptamin mittels Decarboxylierung zuständig ist. Frühere Arbeiten von Dierick und Greenspan zeigen, dass durch Zusatz von α-MTP zur Fliegennahrung die zentralnervöse Serotoninkonzentration signifikant gesenkt werden kann. Hierfür wurden drei Tage alte männliche Fliegen für insgesamt vier Tage auf einer Nahrungsmischung gehalten, die zusätzlich 20 mmol/l α-MTP enthielt. Nach dieser Fütterungsperiode wurde die Serotoninkonzentration im ZNS der *Drosophila* mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ermittelt, wobei eine Reduktion der zentralnervösen Serotoninkonzentration um 50% beobachtet wurde (Dierick and Greenspan 2007).

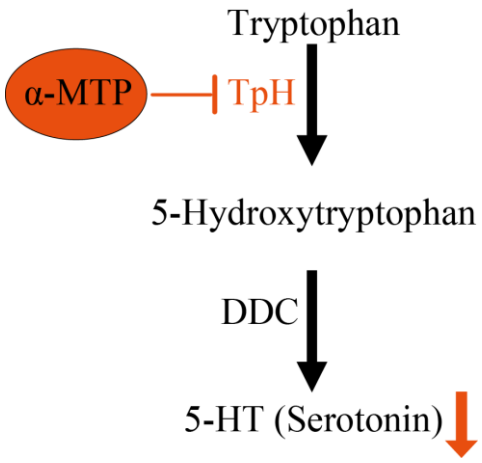


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Serotoninsynthese in *Drosophila melanogaster*. Tryptophan wird durch die Tryptophan-Hydroxylase (TpH) zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) umgewandelt. Mithilfe der DOPA-Decarboxylase (DDC) entsteht anschließend aus 5-HTP der Neurotransmitter 5-Hydroxytryptamin (5-HT), der vor allem unter dem Namen Serotonin bekannt ist. Die Inhibition von TpH durch α-MTP ist hier schematisch dargestellt. Die Inhibition der TpH führt zu einer effizienten Hemmung der Serotoninsynthese. Zugabe von α-MTP zur Fliegennahrung führt dementsprechend zu einer signifikanten Verringerung der zentralnervösen Serotoninkonzentration (nach Dierick and Greenspan 2007, Supplementary Fig.2, Online-Version).

Um α-MTP in unserem CSD-Modell nutzen zu können, mussten wir nur geringfügige Änderungen an dem Versuchsaufbau vornehmen (Abbildung 13). Um eine signifikante Reduktion der zentralnervösen Serotoninkonzentration zu gewährleisten, wollten wir uns so streng wie möglich an das Protokoll von Dierick und Greenspan halten. Dementsprechend hielten wir die Fliegen ab ihrem dritten Lebenstag für insgesamt vier Tage auf α-MTP-Nahrung und begannen erst danach die „chronic social defeat"-Phase. Somit traten diese Fliegen im Alter von sieben Tagen und damit vier Tage später als bisher in den Versuchsablauf ein. Da keine Informationen darüber erhältlich sind wie lange der Suppressionseffekt von α-MTP auf das serotonerge System anhält, wurden die Fliegen für die gesamte Dauer des Experiments auf α-MTP-Nahrung gehalten.

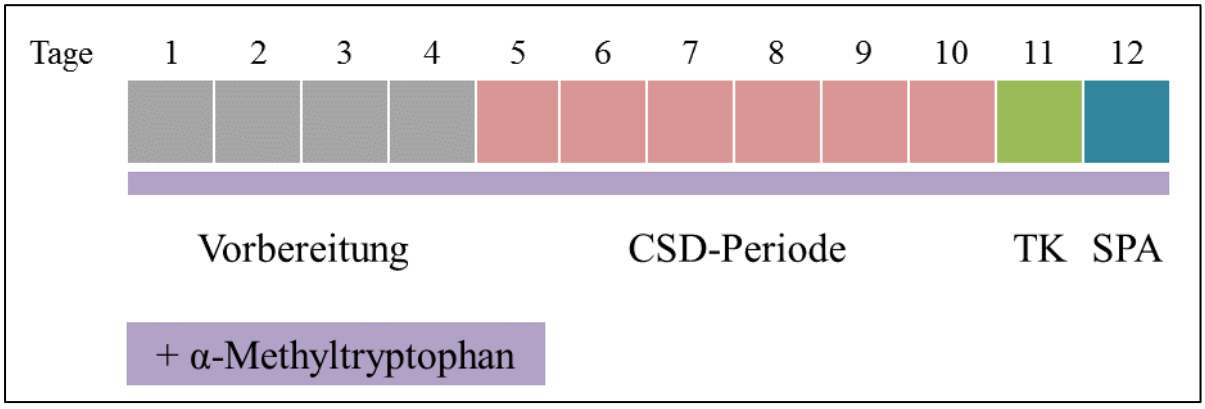


Abbildung 13: „chronic social defeat"-Protokoll mit α-MTP-Zusatz

2.6.1.2. Akute Serotonin-Suppression mittels *TpHxShi^{ts1}*

Die Ergebnisse aus der α-MTP-Versuchsreihe veranlassten uns dazu, die Rolle des Schlüsselenzyms Tryptophan-Hydroxylase (TpH) bei der Entstehung des „chronischer Verlierer"-Phänotyps eingehender zu untersuchen. Anstatt einer globalen enzymatischen Hemmung, wie sie durch diätetische Zugabe von α-MTP bewirkt wurde, wollten wir das GAL4/UAS-System nutzen, um die globale Serotonintransmission akut und kurzfristig zu modulieren.

2.6.1.2.1. Genetische Grundlagen

Für diesen Versuch verwendeten wir die genetische Kreuzung *TpHxShi^{ts1}* (*TpH*: *Tryptophan-Hydroxylase*; *Shi^{ts1}=Shibire-temperature sensitive 1*) deren Aufbau, Struktur und Funktionsweise nun detailliert dargestellt werden soll. Diese Kreuzung wurde erstmals 2010 generiert, wobei der GAL4-driver zunächst noch als *TRH-GAL4* bezeichnet wurde (Alekseyenko et al. 2010). Da jedoch die gängige Abkürzung für die Tryptophan-Hydroxylase TpH ist, soll in der hier vorliegenden Arbeit die adaptierte Schreibweise *TpH-GAL4* verwendet werden. *TpHxShi^{ts1}* entsteht durch Kreuzung der beiden Linien *TpH-GAL4* und *UAS-Shi^{ts1}*. Wie bereits im Methodenteil ausgeführt, spezifiziert die GAL4-Linie den Zelltypus, der genetisch dahingehend manipuliert werden soll, dass er das GAL4-Genprodukt exprimiert. Für den Fall der *TpH-GAL4*-Linie bedeutet dies also, dass das GAL4-Protein nur in Zellen exprimiert wird, die Serotonin produzieren und über das Enzym TpH bzw. über das TpH-Gen verfügen.

Die *UAS-Shi^{ts1}*-Linie ist dadurch gekennzeichnet, dass sie in sämtlichen Zellen das *UAS-Shi^{ts1}*-Transgen trägt. Ohne Aktivierung durch das GAL4-Produkt bleibt dieses jedoch inaktiv und das *Shi^{ts1}*-Genprodukt wird nicht gebildet. Das *Shi^{ts1}*-Gen kodiert für eine Variante des Proteins Dynamin, das als *shi^{ts1}*-Protein bezeichnet wird. Das *shi^{ts1}*-Protein ist wie auch das Dynamin für das Recycling von synaptischen Vesikeln zuständig und stellt somit einen elementaren Baustein in der interneuronalen Transmission dar. Insbesondere ist das *shi^{ts1}*-Protein unter anderem daran beteiligt, alte und entleerte Vesikel wiederaufzubereiten und neue Vesikel mit Transmittern zu befüllen. Die Besonderheit des *Shi^{ts1}*-Gens lässt sich bereits an seinem Namen (*Shibire-temperature sensitive 1*) erkennen und besteht darin, dass die *Shi^{ts1}*-Allele temperatursensitiv sind. Bei der permissiven Temperatur von 19°C produzieren sie regelrechtes *shi^{ts1}*-Protein und bei der restriktiven Temperatur von 30° C bilden sie fehlerhaftes, funktionsloses *shi^{ts1}*-Protein. Dies hat wiederum zur Folge, dass bei 30° C die synaptische Transmission in *Shi^{ts1}*-haltigen Zellen aufgrund des fehlerhaften Vesikelrecyclings

unterbrochen wird. Nach der Temperaturerhöhung auf 30°C kommt es mit einer Latenz von ungefähr einer Minute zur Unterbrechung der synaptischen Transmission (Alekseyenko et al. 2010; Kitamoto 2001).

Die exakten molekularen Zusammenhänge sind vereinfacht in Abbildung 14 dargestellt. Erhöht man die Umgebungstemperatur von Fliegen der *TpHxShi*^{ts1}-Kreuzung auf 30°C, so wird in den Serotonin-produzierenden Zellen der Fliegen durch das Fehlen funktionsfähigen *shi*^{ts1}-Proteins die serotonerge Transmission im ZNS der betroffenen Fliege akut unterbrochen. Hält man die Raumtemperatur konstant auf 19°C, so besitzen die serotonergen Zellen reguläres *shi*^{ts1}-Protein und die serotonerge Transmission funktioniert problemlos (Praefcke and McMahon 2004).

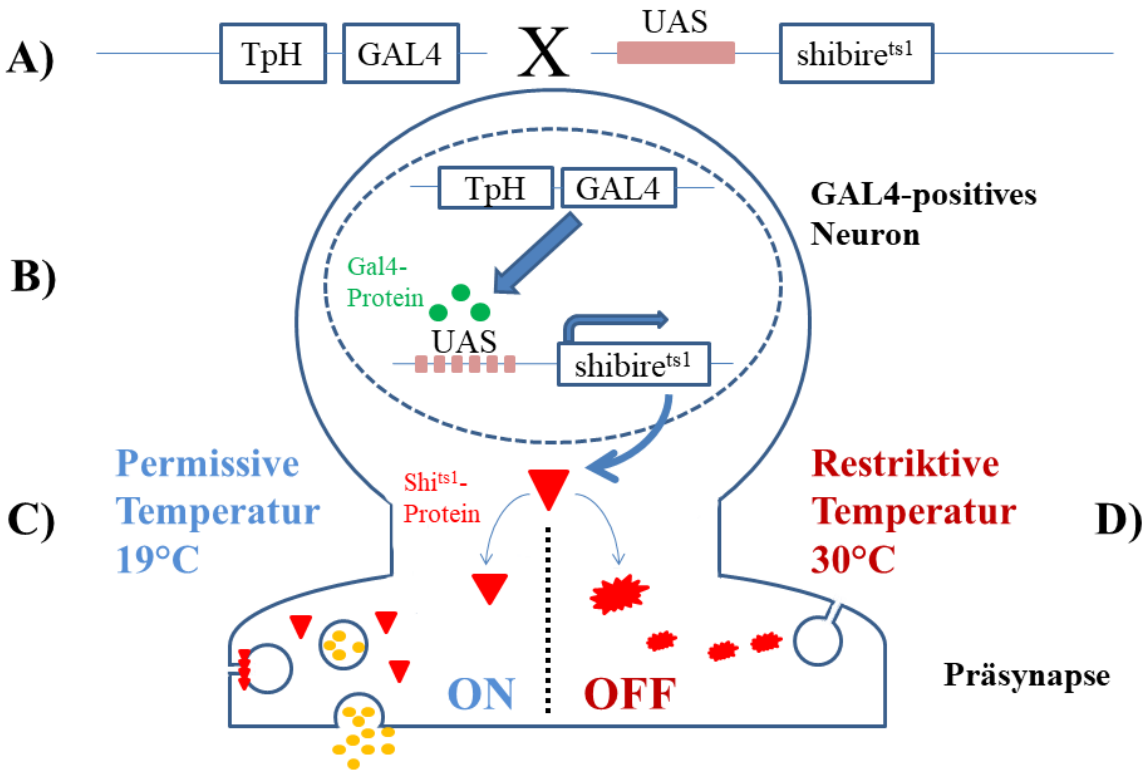


Abbildung 14: Darstellung der Temperaturwirkung auf ein Neuron der *TpHxShi*^{ts1}-Kreuzung.
A) Zunächst paart man die beiden F_0-Generationen *TpH-GAL4* und *UAS-Shi*^{ts1} miteinander. B) In den Serotonin-produzierenden Zellen der F_1-Generation liegt gleichzeitig das GAL4-Allel und auch die UAS-Sequenz vor. Somit kann über Bindung von GAL4 an die UAS-Sequenz die Expression des *Shi*^{ts1}-Proteins reguliert werden. C) Bei der permissiven Temperatur von 19°C wird funktionsfähiges *Shi*^{ts1}-Protein gebildet, das Vesikelrecycling ist intakt und die serotonerge Transmission läuft problemlos ab. D) Bei der restriktiven Temperatur von 30°C wird fehlerhaftes, funktionsloses *Shi*^{ts1}-Protein gebildet, sodass es zu einem gestörten Vesikelrecycling kommt und die serotonerge Transmission unterbrochen wird (modifiziert nach Kasuya et al. 2009).

2.6.1.2.2. Temperaturabhängiges „chronic social defeat“-Protokoll

Um diese schnell wirksame, temperaturkontrollierte Manipulation sinnvoll nutzen zu können, führten wir einige Modifikationen am „chronic social defeat“-Protokoll durch. Das Ziel bestand darin, das serotonerge System nicht über die gesamte Dauer der acht Tage zu supprimieren, sondern die Serotonintransmission nur während der sechs Kämpfe gegen die „bullies“ akut zu inhibieren. Dadurch sollte eine selektive Blockade des Serotoninsystems während der sozialen Niederlagen erzielt werden. Dahinter stand die Fragestellung nach dem genauen Zeitpunkt und der Art der Einflussnahme der „chronic social defeat“-Erfahrung auf das serotonerge System. Aufbauend auf der Annahme, dass der „chronische Verlierer“-Phänotyp entscheidend durch Veränderungen des serotonergen Systems erzeugt wird, versuchten wir festzustellen zu welchem Zeitpunkt innerhalb des „chronic social defeat“-Versuches Veränderungen des Serotoninsystems und damit des Phänotyps ausgelöst werden. Generell boten sich hierfür drei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten an. Zum einen könnte direkt während der Trainingskämpfe das Serotoninsystem moduliert worden sein. Zum anderen könnten sich Veränderungen der Serotonintransmission auch erst in den Phasen nach bzw. zwischen den Kämpfen im Sinne einer Konsolidierung ergeben haben. Ebenso könnten beide Mechanismen nebeneinander existieren, sodass die Alterationen des serotonergen Systems sowohl während als auch nach bzw. zwischen den Kämpfen herbeigeführt werden. Die *TpHxShi*^{ts1}-Kreuzung gab uns die Möglichkeit diese Annahmen zu testen und zu spezifischen Zeitpunkten während des Versuchsablaufes die serotonerge Transmission mithilfe von Temperaturänderungen zu supprimieren. Die Überlegung hierbei war, dass man somit durch zeitlich abgestimmte Suppression der serotonergen Transmission synaptische Veränderungen und dadurch entstehende Modulationen bzw. Adaptionsvorgänge des Serotoninsystems unterbinden könnte. Im besten Fall ließe sich damit der Zeitpunkt des Einflusses der „chronic social defeat“-Erfahrung auf das serotonerge System und damit auf das Verhalten der Fliege ermitteln. Zunächst testeten wir die Hypothese, dass bereits während der Trainingskämpfe gegen die „bullies“ Alterationen erzeugt werden und passten dementsprechend unser „chronic social defeat“-Protokoll an (Abbildung 15). Die Versuchstiere wurden zunächst bei der permissiven Temperatur von 19°C vom Puppenstadium bis in das adulte Alter gehalten. Aufgrund des verlangsamten Wachstums bei dieser niedrigen Temperatur erreichen die Fliegen das Erwachsenenstadium erst nach ungefähr der doppelten Zeitspanne verglichen mit der herkömmlichen Umgebungstemperatur von 25 °C. Dementsprechend wurden die Fliegen erst nach 7 Lebenstagen in das „chronic social defeat“-Protokoll eingeführt. Jeder der sechs

Kämpfe gegen die „bullies“ wurde bei 30°C durchgeführt, wobei die *TpHxShi*^{ts1}-Fliegen zunächst für 10-15 Minuten in ihren Standardgefäßen bei 30 °C akklimatisiert wurden. Diese Zeitspanne wird benötigt, damit das funktionsfähige *Shi*^{ts1}-Protein aufgebraucht ist und nur noch das defekte, funktionslose *Shi*^{ts1}-Protein vorliegt, sodass der Effekt des *TpHxShi*^{ts1}-Systems vollständig zum Tragen kommt. In den Phasen zwischen den Kämpfen wurden die *TpHxShi*^{ts1}-Fliegen weiterhin bei 19°C gehalten. Ebenso fand sowohl der Testkampf als auch die SPA bei 19°C statt, da für diese Versuche eine intakte Serotonintransmission benötigt wurde.

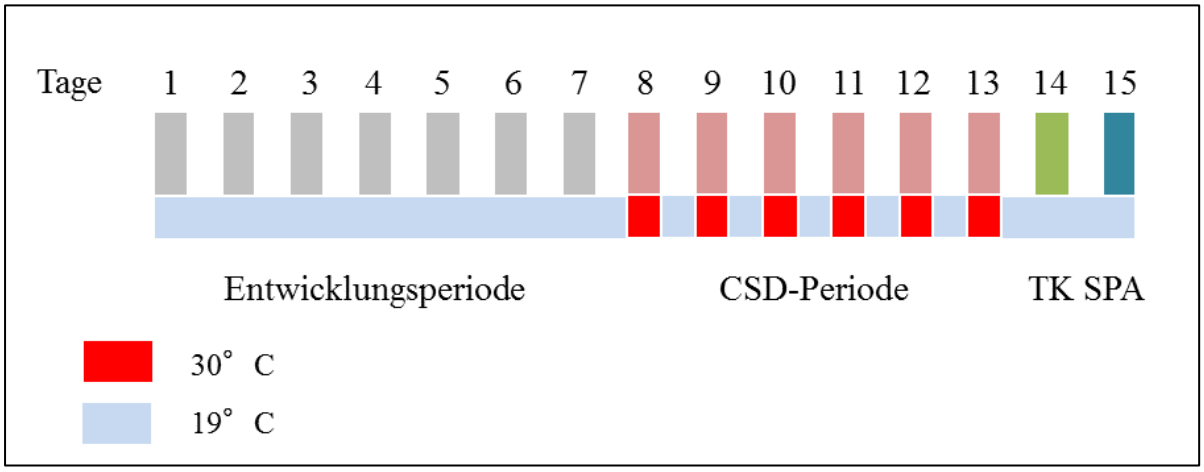


Abbildung 15: Temperaturmodifizierter Ablauf bei Verwendung von *TpHxShi*^{ts1}.
In der Abbildung ist eine siebentägige Entwicklungsperiode bei 19°C dargestellt, gefolgt von einer sechstägigen „chronic social defeat“-Periode (CSD-Periode), sowie dem Testkampf (TK) und der Saccharosepräferenzanalyse (SPA).

2.6.2. Spezifische Serotoninmodulation mittels *d5-HT$_{1B}$xRNAi*

Der Einfluss serotonerger Mechanismen wurde anschließend über spezifischere GAL4/UAS-Mutanten untersucht, bei denen mittels RNA-Interferenz der d5-HT$_{1B}$-Rezeptor der Drosophila melanogaster in seiner Expression supprimiert wurde.

2.6.2.1. Klinische Relevanz von 5-HT$_{1A}$-Rezeptoren

Der d5-HT$_{1B}$-Rezeptor ist der 5-HT$_{1B}$-Rezeptor im ZNS der Drosophila und stellt das Ortholog zum menschlichen 5-HT$_{1A}$-Rezeptor dar. Von den insgesamt 15 verschiedenen menschlichen Serotoninrezeptoren (Hoyer et al. 1994), wurde der 5-HT$_{1A}$-Rezeptor aufgrund seiner elementaren Beteiligung an so unterschiedlichen Krankheiten wie der posttraumatischen Belastungsstörung (Sullivan et al. 2013), der autistischen Störung (Egawa et al. 2012), der Schizophrenie (Crisafulli et al. 2012) und auch der bipolaren Störung (Nugent et al. 2013) mit am eingehendsten erforscht. Für unser „chronic social defeat“-Modell ist jedoch von besonderer Relevanz, dass dieser Rezeptor zum einen als Modulator der menschlichen Stressantwort in Erscheinung tritt und darüber hinaus in verschiedenster Weise mit depressiven Störungen assoziiert (Kishi et al. 2009; Wu et al. 2008). Es sind bereits mehrere Polymorphismen bekannt, die mit einem erhöhtes Risiko verbunden sind, an einer depressiven Störung zu erkranken bzw. mit depressiver Symptomatik auf Stressoren zu reagieren (Armbruster et al. 2011; Kim et al. 2011; Kishi et al. 2013). Ebenso konnte gezeigt werden, dass 5-HT$_{1A}$-Autorezeptoren die serotonerge Transmission hemmen und eine Überaktivität dieser Rezeptoren mit depressiven Störungen assoziiert ist (Albert et al. 2011). Des Weiteren ist der Rezeptor Gegenstand aktueller psychopharmakologischer Forschung, da vermutet wird, dass die derzeit gängigen Antidepressiva, wie beispielsweise SSRI, als bisher nur wenig bekannte Nebenwirkung eine Downregulation von 5-HT$_{1A}$-Rezeptoren bewirken (Noro et al. 2010). Unterstützt wurde dieser Zusammenhang zwischen 5-HT$_{1A}$-Suppression und antidepressiver Wirkung durch erfolgreiche Augmentationsversuche mittels Pindolol. Pindolol ist ein nicht-selektiver β-Blocker, der gleichzeitig ein schwacher 5-HT$_{1A}$-Antagonist ist. In systematischen klinischen Studien erbrachte die zusätzliche Gabe von Pindolol zu einer bereits bestehenden SSRI-Therapie einen signifikant höheren Therapieerfolg (Whale et al. 2010). Jedoch soll nicht unerwähnt bleiben, dass es sich hierbei um einen sehr kontrovers diskutierten Rezeptor handelt. Es gibt mittlerweile einige Studien, darunter auch Meta-Analysen, die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen 5-HT$_{1A}$-Polymorphismen und depressiven Störungen, Suizid und stressbedingten Reaktionen gefunden haben (Angles et al. 2012; Hettema et al. 2008). Dennoch waren für uns die Argumente für eine Untersuchung dieses Rezeptors im

Zusammenhang mit dem hier vorliegenden „chronic social defeat“-Modell mehr als ausreichend, sodass wir dessen mögliche Beteiligung am „chronischen Verlierer“-Phänotyp testen wollten. In Anbetracht der Datenlage, die einerseits eine Überaktivität von 5-HT_{1A}-Autorezeptoren bei depressiven Patienten und andererseits einen antidepressiven Effekt des 5-HT_{1A}-Antagonisten Pindolol beschreibt, entschlossen wir uns das *Drosophila*-Ortholog dieses Rezeptors – der d5-HT_{1B}-Rezeptor – mittels RNA-Interferenz zu supprimieren und die dadurch entstehenden Verhaltensänderungen der „chronischen Verlierer“ zu bestimmen. Bevor auf die Ergebnisse dieser Versuchsreihe eingegangen wird, soll zunächst der d5-HT_{1B}-Rezeptor genauer beschrieben werden.

2.6.2.2. d5-HT_{1B}-Rezeptoren in *Drosophila melanogaster*

Das *Drosophila*-Ortholog zum menschlichen 5-HT_{1A}-Rezeptor ist der d5-HT_{1B}-Rezeptor (in der Originalpublikation von Saudou et al. noch als „5-HT-dro2B“ bezeichnet), dessen Gensequenz dem menschlichen 5-HT_{1A}-Rezeptor mit einer Übereinstimmungsrate von 43% stärker als alle anderen Serotoninrezeptoren der *Drosophila melanogaster* ähnelt (http://www.sdbonline.org/sites/fly/hjmuller/serotr1aandb1.htm, abgerufen am 28.08.2016, ebenfalls: Johnson et al. 2009; Saudou et al. 1992). Über den d5-HT_{1B}-Rezeptor ist deutlich weniger bekannt als über sein menschliches Äquivalent. Die zentralnervöse Expression von d5-HT_{1B} findet in allen Entwicklungsstadien der *Drosophila* statt, mit Ausnahme der Embryonalphase. Der d5-HT_{1B}-Rezeptor wird sowohl prä- als auch postsynaptisch exprimiert und tritt gehäuft in den sogenannten „mushroom bodies“ auf. Hierbei handelt es sich um Hirnregionen, die bei der *Drosophila* mit sozialem Lernverhalten und Gedächtnisbildung assoziiert sind und als das Äquivalent zum menschlichen Hippocampus angesehen werden (Johnson et al. 2011). Darüber hinaus wird für die „mushroom bodies“ eine Beteiligung an der Ausbildung von Hierarchien diskutiert (Berry et al. 2008; Davis 2005; Heisenberg 2003; Schwärzel and Müller 2006). Analog zum menschlichen Äquivalent konnte für die d5-HT_{1B}-Rezeptoren eine elementare Bedeutung für das Schlafverhalten der Drosophila gefunden werden (Yuan et al. 2006). Bevor noch näher auf das d5-HT_{1B}-Experiment eingegangen wird, sollen zunächst einige grundlegende Überlegungen dargestellt werden, auf denen die Entscheidung für den d5-HT_{1B}-Rezeptor als Versuchsgegenstand fußte. Hierzu sollte man sich zuerst die Struktur des „chronic social defeat“-Modells vor Augen führen. Dieses Modell wurde von uns anhand von CS-Fliegen etabliert, die gegen die „bullies“ kämpften und die große Mehrheit dieser Kämpfe verloren. Damit erhielten wir eine Gruppe von „chronischen Verlierern“, die im Laufe von sechs Tagen sechs Niederlagen erfahren hatten. Anschließend

führten wir den Testkampf gegen genetisch identische und gleich große, sowie gleich alte Fliegen durch und untersuchten jeweils die Effekte der vorherigen „chronic social defeat"-Erfahrungen. Das Ziel bestand also darin, dass mithilfe einer „chronic social defeat"-Erfahrung Veränderungen des Kampf- und Essverhaltens der CS-Fliegen im Sinne eines potentiellen „chronischen Verlierer"-Phänotyps erzeugt werden sollten. Für alle weiteren Versuche war es deshalb eminent wichtig, dass die Erfahrung des „chronic social defeat" möglichst intakt und über die verschiedenen experimentellen Ansätze hinweg vergleichbar bleibt. Um die Integrität der „chronic social defeat"-Erfahrung zu wahren, sollten alle weiteren Versuchssubjekte in ihrem Kampfverhalten den herkömmlichen CS-Fliegen möglichst stark ähneln und in vergleichbarer Weise gegen die „bullies" kämpfen und verlieren. Ist man also in der Lage die Versuchssubjekte in einer Weise genetisch bzw. zentralnervös zu verändern, ohne dass dabei ihr Kampfverhalten bzw. die „chronic social defeat"-Erfahrung verändert wird, so kann man dann etwaige entstehende Alterationen des „chronischen Verlierer"-Phänotyps auf die jeweiligen genetischen Veränderungen der Fliegen zurückführen. Wichtig ist somit, dass die beobachtbaren Veränderungen des „chronischen Verlierer"-Phänotyps in den einzelnen Versuchsreihen nicht auf ein verändertes Kampfverhalten der untersuchten Fliegen und folglich auf eine veränderte „chronic social defeat"-Erfahrung zurückzuführen sind. Vielmehr sollten mithilfe einer möglichst uniformen „chronic social defeat"-Erfahrung basierend auf den jeweiligen Manipulationen an den Versuchssubjekten Prozesse aufgedeckt werden, die durch die Erfahrung der Niederlagen ausgelöst werden und den „chronischen Verlierer"-Phänotyp bewirken. Hierunter fallen Vorgänge wie beispielsweise soziales Lernverhalten, Gedächtnisbildung, Angstverhalten und ähnliche Verhaltensweisen, die mit „chronic social defeat" bzw. im weiteren Sinne mit erlernter Hilflosigkeit assoziiert sind. Der d5-HT_{1B}-Rezeptor war für uns dementsprechend ein besonders gutes Versuchsobjekt, da bereits bekannt war, dass eine diätetische Manipulation der d5-HT_{1B}-Rezeptor-Aktivität mittels zugeführten Agonisten oder auch Antagonisten (8-OH-DPAT bzw. WAY100635) keine signifikante Änderung des Kampfverhaltens herbeiführte. Es konnten ausschließlich selten verwendete Aktionen niedriger Intensität wie der „wing threat" oder das „low-level fencing" beeinflusst werden, während die „lunges" als wichtigster Parameter für die Auswertung eines Kampfes und die Einteilung in Gewinner/Verlierer-Paare unbeeinflusst blieben (Johnson et al. 2009). Zusammenfassend kann man festhalten, dass der Vorteil der von uns angestrebten d5-HT_{1B}-Rezeptor-Manipulation darin bestand, dass man untersuchen konnte inwiefern ein Rezeptor, der im humanen Organismus eine hohe klinische Relevanz hat, die Entstehung des „chronischen Verlierer"-Phänotyps und damit auch insgesamt die Stressantwort der

Drosophila melanogaster beeinflusst, ohne dabei das Kampfverhalten der Fliegen maßgeblich zu verändern und somit die Integrität der „chronic social defeat"-Erfahrung zu gefährden.

2.6.2.3. RNA-Interferenz

Der von uns gewählte Ansatz bestand darin, die d5-HT_{1B}-Rezeptoren mithilfe von RNA-Interferenz chronisch über den gesamten Verlauf des CSD-Experimentes zu supprimieren (Abbildung 16). RNA-Interferenz bezeichnet das Phänomen der mRNA-Degradation durch einen Komplex aus kurzen RNA-Fragmenten und spezifischen Proteinen (Fire et al. 1998). Die Induktion dieses Vorgangs findet durch „dicer" statt, eine RNAse, die doppelsträngige RNA (dsRNA) erkennt und unter ATP-Verbrauch in doppelsträngige „small interfering RNA (siRNA) prozessiert (Hammond 2005). Anschließend lagert sich ein „RISC" genannter Proteinkomplex (RNA-induced silencing protein complex) an die siRNA. Unter ATP-Verbrauch entwindet RISC die doppelsträngige siRNA und stößt einen der beiden Stränge ab, sodass am Komplex nur noch einzelsträngige siRNA verbleibt (Nykänen et al. 2001). Diese nutzt RISC nun um an komplementäre mRNA zu binden und diese mittig in der komplementären Sequenz zu spalten (Elbashir et al. 2001). Danach löst sich der „RISC"/siRNA-Komplex von der gespaltenen mRNA ab, die anschließend durch zytoplasmatische Exonukleasen weiter abgebaut wird. Der „RISC"/siRNA-Komplex ist in der Lage noch zahlreiche weitere mRNA-Moleküle zu spalten. Dieser katalytische Mechanismus, bei dem ein „RISC"/siRNA-Komplex große Mengen an mRNA spalten kann, ist dafür verantwortlich, dass bereits kleine Mengen an siRNA in der Lage sind eine nahezu vollständige Expressionssuppression herbeizuführen. Diese Suppression der Genexpression wird auch als knock-down bezeichnet.

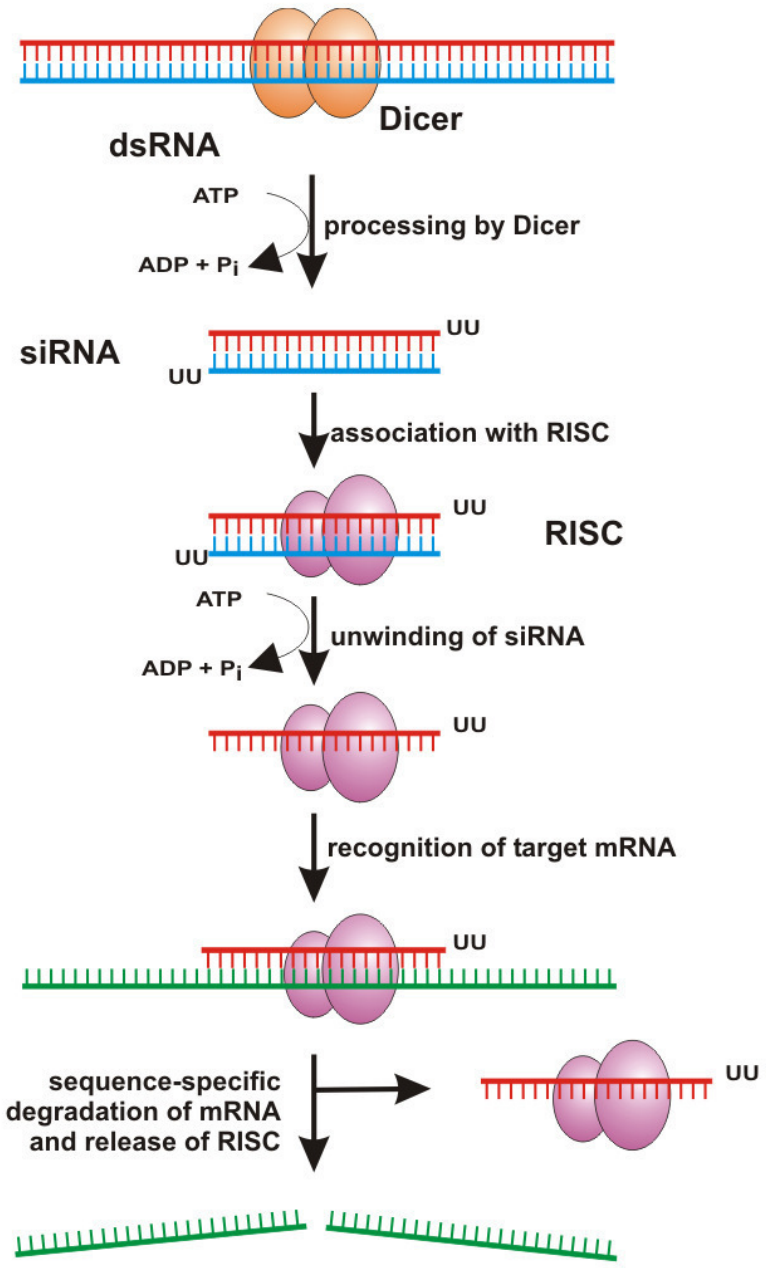


Abbildung 16: Schematische Darstellung des RNA-Interferenzvorgangs.
Erläuterungen siehe Text (Rutz and Scheffold 2004).

2.6.2.4. Zucht des *d5-HT$_{1B}$*-Fliegenstammes

Die RNAi-d5-HT$_{1B}$-Suppression erfolgte mithilfe des bereits vorgestellten GAL4/UAS-Systems. Die Vatergeneration besaß hierbei den Genotyp *UAS-dicer2;d5-HT$_{1B}$-GAL4*. Somit handelte es sich hierbei um einen speziellen Stamm, da die Vatergeneration sowohl einen GAL4-driver für d5-HT$_{1B}$-Rezeptor-positive Neuronen, als auch eine UAS-Sequenz enthielt. In der Vatergeneration wird somit in d5-HT$_{1B}$-Rezeptor-positiven Neuronen GAL4-Protein exprimiert, das an die ebenfalls enthaltene UAS-Sequenz bindet. Diese UAS-Sequenz ist ein „enhancer“ und aktiviert die Expression der RNAse „dicer2“. Die Expression von „dicer2“

bleibt jedoch in der Vatergeneration folgenlos, da für den Vorgang der RNA-Interferenz zusätzlich zur RNAse eine dsRNA benötigt wird. Diese ist in der Muttergeneration enthalten, die das Transgen *UAS-d5-HT$_{1B}$-RNAi* besitzt. Hierbei fungiert die UAS-Sequenz als „enhancer" für ein d5-HT$_{1B}$-RNAi-Konstrukt, das zur Expression von dsRNA führt, die spezifisch an die mRNA des d5-HT$_{1B}$-Rezeptors bindet und diese abbaut. Da in der Muttergeneration kein GAL4-Protein vorliegt, wird die d5-HT$_{1B}$-Rezeptor-dsRNA nicht exprimiert und es kommt zu keiner Expressionsveränderung des Rezeptors. In der Tochtergeneration liegen jedoch beide Transgene gleichzeitig vor, sodass es zu einer Kaskade kommt, die zur Expressionsverminderung des d5-HT$_{1B}$-Rezeptors führt. Über das Transgen des Vaters wird „dicer2" in d5-HT$_{1B}$-Rezeptor-positiven Zellen exprimiert. Da die Tochtergeneration in jeder Zelle das *UAS-d5-HT$_{1B}$-RNAi*-Transgen besitzt, kommt es somit in den Zellen, die den d5-HT$_{1B}$-Rezeptor exprimieren, zur Aktivierung des mütterlichen Transgens durch das Vorliegen des exprimierten GAL4-Proteins aus dem väterlichen Transgen. In den d5-HT$_{1B}$-Rezeptor-positiven Zellen bindet somit das GAL4-Protein einerseits an die väterliche *UAS-dicer2*-Sequenz, die zur Expression der RNAse „dicer2" führt, und andererseits an die mütterliche *UAS-d5-HT$_{1B}$-RNAi*-Sequenz, die zur Expression der d5-HT$_{1B}$-Rezeptor-dsRNA führt. Damit liegen in den d5-HT$_{1B}$-Rezeptor-positiven Zellen „dicer2" und die d5-HT$_{1B}$-Rezeptor-dsRNA gleichzeitig vor, sodass es zur RNA-Interferenz kommt. Die mRNA des d5-HT$_{1B}$-Rezeptors wird von „dicer2" und der dsRNA entsprechend dem oben beschriebenen Mechanismus abgebaut und damit die Expression des d5-HT$_{1B}$-Rezeptors supprimiert. Es soll angemerkt werden, dass *Drosophila melanogaster* für die RNA-Interferenz die RNAsen „dicer1" und „dicer2" besitzen. Wir verwendeten für unseren Versuch eine *UAS-dicer2*-Sequenz, da „dicer2" im Gegensatz zu „dicer1" deutlich effizienter siRNA produziert und somit eine stärkere Expressionssuppression bewirkt (Cenik et al. 2011). Die exakten Suppressionswerte wurden von uns nicht bestimmt, jedoch zeigt ein vergleichbares dicer2-Konstrukt eine Reduktion der d5-HT$_{1B}$-Expression um ca. 70% (Yuan et al. 2005). Im Sinne einer vereinfachten Schreibweise wird der Genotyp im weiteren Verlauf der Arbeit als *d5-HT$_{1B}$xRNAi* abgekürzt.

2.7. Statistische Methoden

Die Daten der Verhaltensexperimente wurden in Microsoft Excel 2016 gesammelt und statistisch mithilfe von Graphpad Prism 6 und 7 für Macintosh und Windows analysiert. Die Berechnung der SPR-Funktion aus Abschnitt 4.3 wurde mittels MATLAB R2015a durchgeführt. Deskriptive Statistiken einschließlich Mittelwert (MW), Median und Interquartilsabstand (IQA) wurden zuerst berechnet. Für den Vergleich zweier Gruppen von Fliegen wurde der parameterfreie Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Fliegengruppen wurde der parameterfreie Kruskal-Wallis-Test gewählt. Als Post-Test für den Kruskal-Wallis-Test wurde „Dunn's Multiple Comparison Test" verwendet. Als Homogenitätstest wurde der parameterfreie χ^2-Test verwendet. Korrelationen wurden mithilfe von Spearmans Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Das allgemeine Signifikanzniveau wurde auf einen zweiseitigen p-Wert $< 0{,}05$ festgelegt.

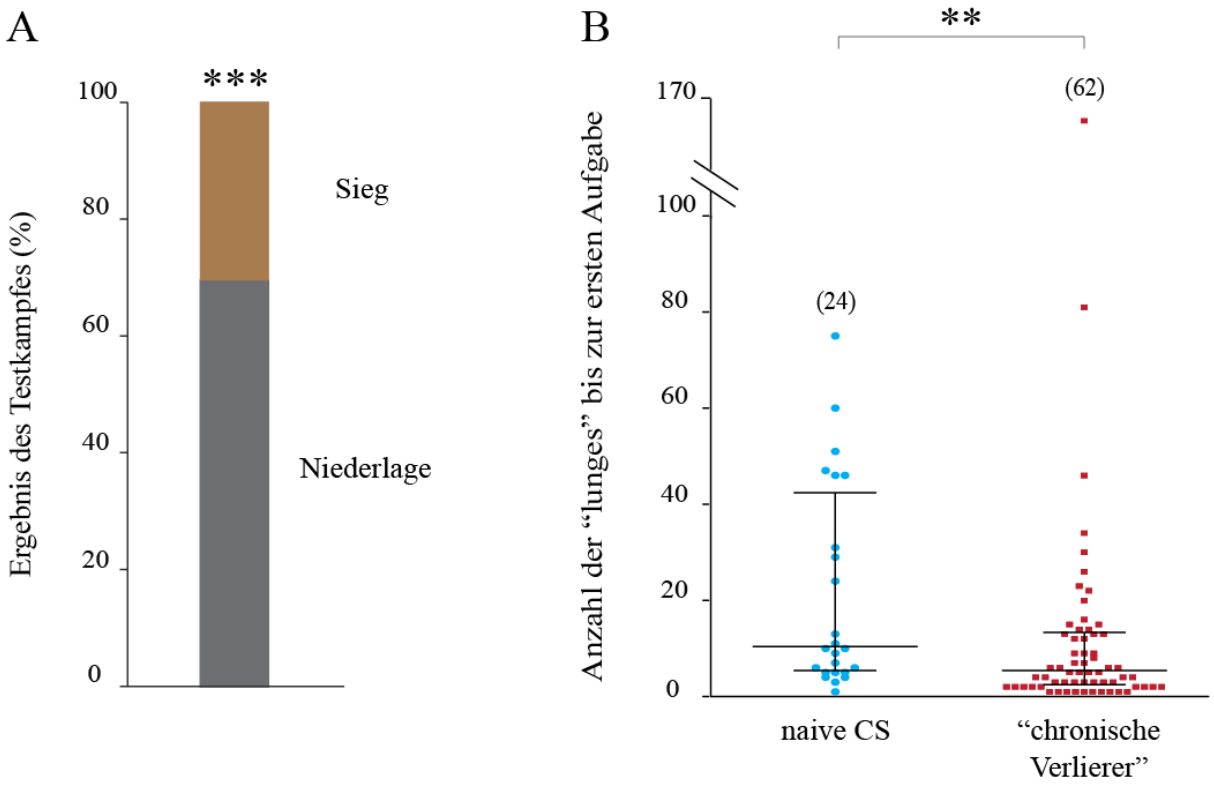
3. Ergebnisse

3.1. Phänotypische Effekte nach „chronic social defeat“

3.1.1. Verringerung der Aggressivität

Nach Ablauf der sechstägigen „chronic social defeat“-Periode fand zunächst der sogenannte Testkampf statt. In diesem Kampf musste die „chronische Verlierer“-Fliege gegen eine naive CS-Fliege antreten, die gleich groß, gleich alt und genetisch identisch war, jedoch keinerlei Kontakt oder Kampferfahrung mit anderen Fliegen hatte. In der ersten Phase der Auswertung dieses Testkampfes wurde nur analysiert, welche der beiden Fliegen den Kampf für sich entschieden hatte. Hierbei stellte sich heraus, dass die „chronischen Verlierer“ ca. 70% (119/171) dieser Testkämpfe gegen die naiven CS-Fliegen verloren hatten (Figur 1A; n=171; $p<0{,}0001$; χ^2-Test).

Abgesehen vom Ergebnis des Testkampfes wollten wir ein Maß für die Ausdauer und Belastungsfähigkeit einer Fliege während eines Kampfes als weiteren Parameter heranziehen. Hierfür analysierten wir die Anzahl an „lunges“ (für eine Übersicht der Kampfmuster siehe Tabelle 2), die eine Fliege in der Lage war zu ertragen, bevor sie das erste Mal den „food cup“ verließ. Mit Ausnahme der oben besprochenen seltenen „hierarchy switches“, stellte sich die Fliege, die als erste den „food cup“ verlassen hatte, auch über die Dauer der gesamten Kampfzeit von 90 Minuten als Verlierer heraus. In Kämpfen zwischen naiven CS-Fliegen ertragen die unterlegenen CS-Fliegen eine mittlere Anzahl von 21 „lunges“ (MW=21,2; Median=10,0; IQA=41,0) bevor sie den „food cup“ verlassen und den Kampf dadurch verlieren. In den durchgeführten Testkämpfen zwischen den „chronischen Verlierern“ und den naiven CS-Fliegen zeigte sich, dass die „chronischen Verlierer“ bereits nach einer mittleren Anzahl von 12 „lunges“ (MW=11,6; Median=5,0; IQA=11,0) aufgaben und vom „food cup“ flüchteten (Figur 1B; p=0,005; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

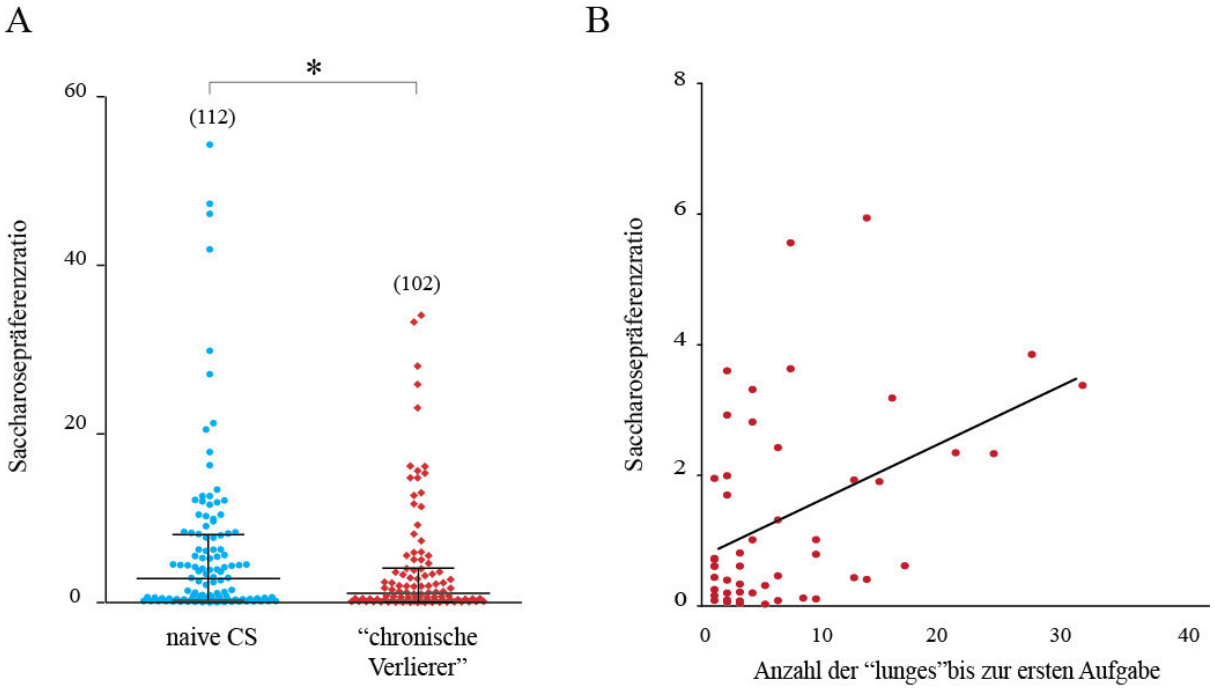


Figur 1: Phänotypische Effekte von „chronic social defeat" auf das Kampfverhalten.
(A) „chronische Verlierer" verlieren ca. 70% (119/171 = 69,59%) ihrer Testkämpfe gegen naive CS-Fliegen (n=171; p<0,0001; χ^2-Test). (B) „chronische Verlierer" geben ihren Kampf gegen naive CS-Fliegen nach ca. 12 „lunges" (MW=11,6; Median=5,0; IQA=11,0) auf, während naive CS durchschnittlich ca. 21 „lunges" (MW=21,2; Median=10,0; IQA=41,0) bis zur ersten Aufgabe ertragen (p=0,005; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Die Skalierung oberhalb von 100 „lunges" wurde zur besseren Übersichtlichkeit verkürzt dargestellt (einmaliger Spitzenwert: 167 „lunges").
Die Werte sind in Form eines Streudiagramms dargestellt, das neben dem Median als mittlerem Balken jeweils auch das 25%- und das 75%-Quartil als jeweils unteren und oberen Balken enthält. Der Abstand zwischen dem 25%- und dem 75%-Quartil enthält die mittleren 50% der Werte und wird als Interquartilsabstand (IQA) bezeichnet. Der Mittelwert ist nicht dargestellt und wird nur im Text der hier vorliegenden Arbeit zur Veranschaulichung der Daten erwähnt. Diese grafische Darstellung wird auch in den folgenden Streudiagrammen verwendet.

3.1.2. Verringerung der Saccharosepräferenz

Am Tag nach dem Testkampf fand die Saccharosepräferenzanalyse (SPA) statt, bei der zunächst der Vergleich der Saccharosepräferenzratio (SPR) zwischen naiven CS-Fliegen und den „chronischen Verlierern" im Vordergrund stand. Hierbei zeigte sich, dass die „chronischen Verlierer" eine SPR von ca. 4,2 aufwiesen, also in etwa viermal mehr süße Nahrung als normale Nahrung während des Untersuchungszeitraumes zu sich nahmen (MW=4,2; Median=1,2; IQA=3,9). Für naive CS-Fliegen wurde eine SPR von ca. 6,2 gemessen (MW=6,2; Median=3,0; IQA=7,8), sodass im Vergleich eine signifikant gesenkte SPR bei „chronischen Verlierern" erkennbar wurde (Figur 2A; p=0,0217, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

Der nächste Punkt bestand nun in der Evaluation eines möglichen Zusammenhangs zwischen der verringerten Aggression der „chronischen Verlierer“ im Testkampf und der gesenkten Saccharosepräferenz in der SPA. Zu diesem Zweck wurde ein XY-Scatterplot angelegt, basierend auf den Daten derjenigen „chronischen Verlierer“, die ihren Testkampf verloren hatten. Es wurde die Anzahl an „lunges“, die diese Fliegen während ihres Testkampfes bis zur ersten Aufgabe ertragen hatten gegen ihre SPR vom darauf folgenden Versuchstag geplottet. Hierbei zeigte sich eine signifikante lineare Korrelation zwischen den beiden Größen (Figur 2B; n=62; Spearman’s r= 0,314; p=0,0112). Je weniger „lunges“ der „chronische Verlierer“ im Testkampf noch ertragen konnte, desto geringer war auch seine SPR am darauffolgenden Tag.

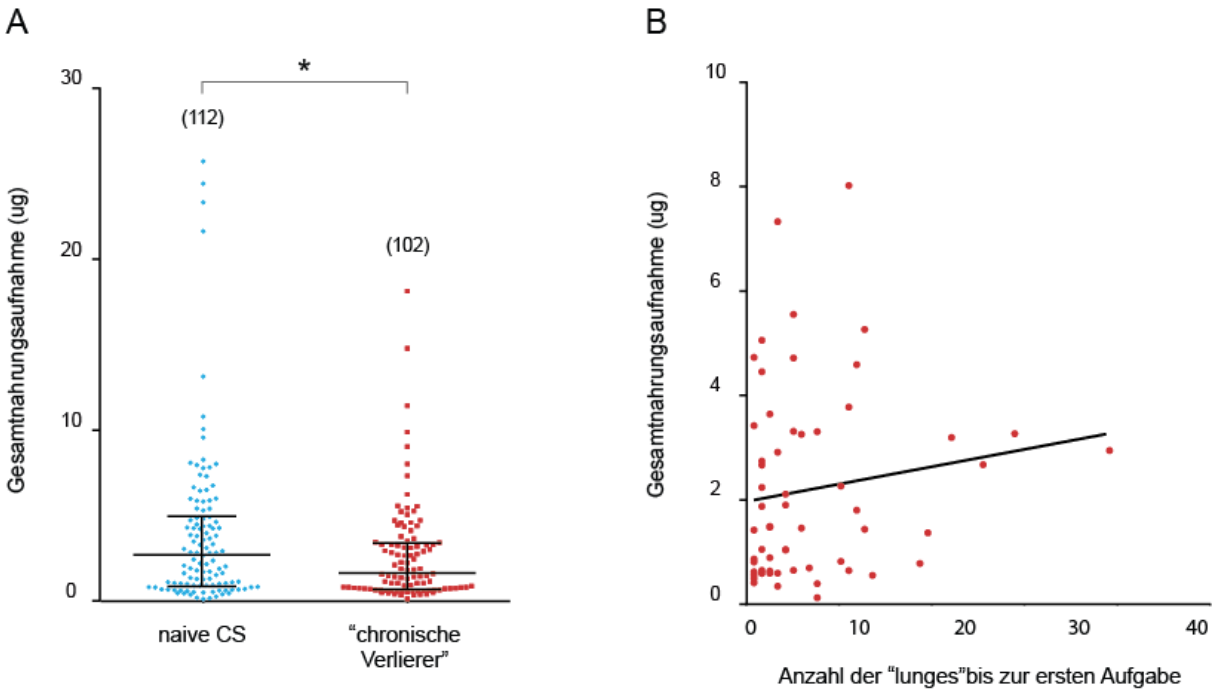


Figur 2: Verringerung der SPR bei „chronischen Verlierern“.
A) „chronische Verlierer“ (MW=4,2; Median=1,2; IQA=3,9) zeigen im Vergleich zu naiven CS-Fliegen (MW=6,2; Median=3,0; IQA=7,8) eine signifikant verringerte SPR (p=0,0217; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). B) Es besteht eine signifikante lineare Korrelation zwischen der Anzahl an „lunges“, die die „chronischen Verlierer“ während ihres Testkampfes ertragen, und ihrer SPR (n=62; Spearman’s r= 0,314; p=0,0112).

3.1.3. Verringerung der gesamten Nahrungsaufnahme

Darüber hinaus wurde die absolute Menge an aufgenommener süßer und normaler Nahrung berechnet und damit die gesamte Nahrungsaufnahme (GNA) ermittelt. Während naive CS-Fliegen insgesamt 3,9 µg Nahrung (MW=3,9µg; Median=2,7µg; IQA=4,1µg) zu sich nahmen, zeigten die „chronischen Verlierer“ mit 2,7 µg (MW=2,7µg; Median=1,7µg; IQA=2,7µg) eine signifikante Verringerung der GNA (Figur 3A; p=0,0418; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

Analog zur SPR wurde ebenfalls ein XY-Scatterplot der „lunges“ bis zur ersten Aufgabe im Testkampf gegen die GNA in der SPR durchgeführt. Hierbei zeigte sich jedoch keine signifikante lineare Korrelation zwischen den beiden Parametern (Figur 3B; n=62; Spearman’s r=0,194; p=0,145).



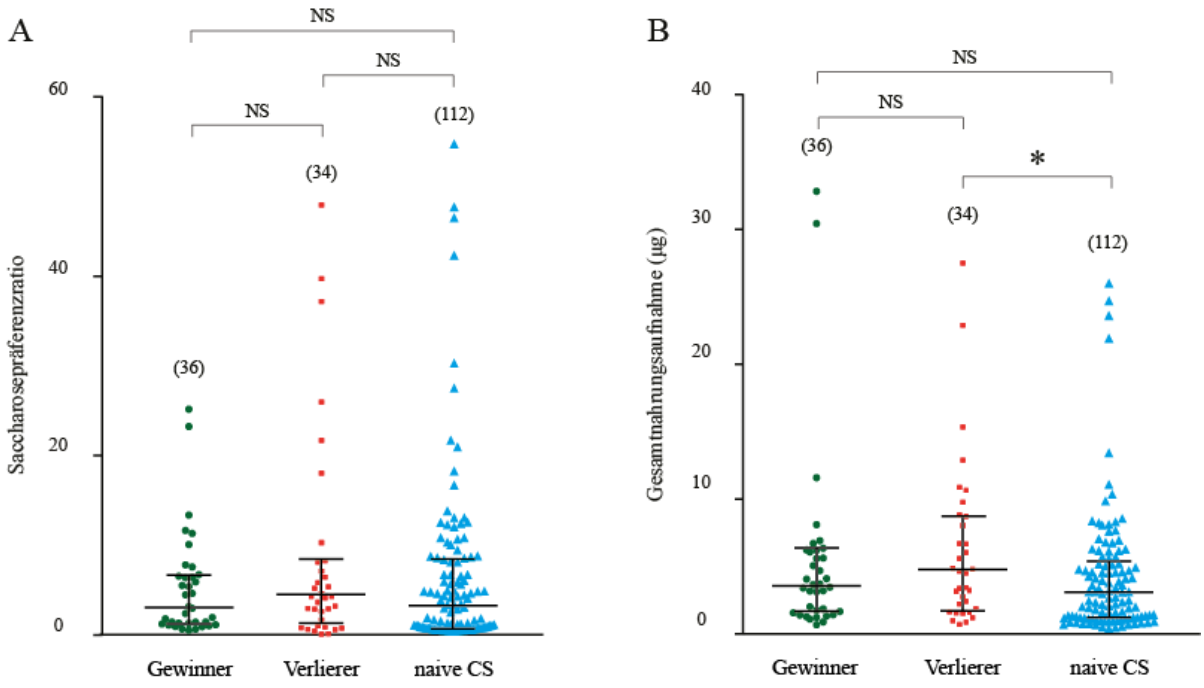
Figur 3: Verringerung der GNA bei „chronischen Verlierern“
A) „chronische Verlierer“ (MW=2,7µg; Median=1,7µg; IQA=2,7µg) zeigen im Vergleich zu naiven CS-Fliegen (MW=3,9 µg; Median= 2,7 µg; IQA= 4,1 µg) eine verringerte GNA (p=0,0418; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). B) Es besteht keine signifikante lineare Korrelation zwischen der Anzahl an „lunges“, den die „chronischen Verlierer“ während ihres Testkampfes ertragen und ihrer GNA (n=62; Spearman’s r=0,194; p=0,145).

3.1.4. Zusätzliche Untersuchungen zu Kampfverhalten und SPR

Bevor wir mit der detaillierteren Analyse des Zusammenhanges von Kampf- und Essverhalten der „chronischen Verlierer“ fortfahren konnten, mussten wir zunächst einige Kritikpunkte adressieren. Unsere Hypothese besagte zu diesem Zeitpunkt, dass sich aufgrund der Erfahrung von „chronic social defeat“ das Verhalten der „chronischen Verlierer“ dahingehend verändert hatte, dass sie einerseits eine Aggressionsminderung und andererseits eine Reduktion ihrer Saccharosepräferenz zeigten. Jedoch galt zu beachten, dass diese Symptome, die im Testkampf und in der SPA detektiert wurden, bereits vor Studienbeginn bestehende intrinsische Eigenschaften der Fliegen gewesen sein könnten. Demzufolge wäre es möglich, dass es bereits vor Beginn der Versuchsperiode Fliegen gab, die schwächere Kämpfer waren und eine geringere SPR besaßen. Unser „chronic social defeat“-Experiment hätte dementsprechend

nicht das Verhalten der Fliegen geändert, sondern lediglich eine Subpopulation an Fliegen mit niedrigem Aggressionsniveau und einer geringen SPR herausgefiltert. Deren bereits vorher angelegte Verhaltensweisen würden dann fälschlicherweise als „chronischer Verlierer“-Effekt bezeichnet werden. Um diese alternative Hypothese zu testen, führten wir eine zusätzliche, zweitägige Versuchsreihe durch. Am erstem Tag setzten wir Kämpfe zwischen naiven CS-Fliegen an und am zweiten Tag führten wir an ihnen eine SPA durch.

Anschließend teilten wir die CS-Fliegen mit einmaliger Kampferfahrung je nach ihrem Resultat in Gewinner und Verlierer auf und verglichen diese beiden Gruppen mit naiven CS-Fliegen. Hierbei zeigten sich in Bezug auf die Saccharosepräferenz keine signifikanten Unterschiede (Figur 4A). Bezogen auf die gesamte Nahrungsaufnahme zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Gewinnern und Verlierern, sowie Gewinnern und naiven CS-Fliegen. Interessanterweise, besaßen Verlierer eine erhöhte GNA im Vergleich zu naiven CS-Fliegen (Figur 4B).



Figur 4: Auswirkungen von Gewinn und Verlust eines einmaligen Kampfes auf SPR und GNA
A) Im Gruppenvergleich von Gewinnern (MW=5,1; Median=2,7; IQA=5,4), Verlierern (MW=8,4; Median=4,2; IQA=7,2) und naiven CS-Fliegen (MW=6,2; Median=3,0; IQA=7,8) ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der SPR finden (p=0,2784, Kruskal-Wallis-Test, alle Gruppenvergleiche nicht signifikant in Dunn’s Multiple Comparison Test). B) Im Gruppenvergleich von Gewinnern (MW=5,2µg; Median=3,6µg; IQA=4,6µg), Verlierern (MW=6,1µg; Median=4,6 µg; IQA=7,0µg) und naiven CS-Fliegen (MW=3,9µg; Median=2,7µg; IQA=4,1µg) zeigte sich ein insgesamt hochsignifikantes Ergebnis (p=0,0086, Kruskal-Wallis-Test). Die Einzelvergleiche zwischen Gewinnern und naiven CS-Fliegen, sowie Gewinnern und Verlierern waren nicht signifikant. Verlierer hatten jedoch gegenüber naiven CS-Fliegen eine signifikant erhöhte GNA (Dunn’s Multiple Comparison Test).

Die Ergebnisse dieser zweitägigen Versuchsreihe lieferten uns gleich zwei wichtige Erkenntnisse. Erstens wurde ersichtlich, dass eine einmalige Kampferfahrung nicht in der Lage war die Saccharosepräferenz nachhaltig zu beeinflussen. Wenn man die CS-Fliegen in Gewinner und Verlierer des einmaligen Kampfes aufteilte und gemeinsam mit naiven CS-Fliegen verglich, so fanden sich keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Es ließ sich also feststellen, dass eine einmalige Kampferfahrung keinen Einfluss auf die Saccharosepräferenz hat. Weder der Verlust noch der Gewinn eines Kampfes hatte Auswirkungen auf die Saccharosepräferenz, die in beiden Fällen auf dem gleichen Niveau wie bei naiven CS-Fliegen blieb. Bezüglich der gesamten Nahrungsaufnahme erhielten wir ein sehr ähnliches Bild. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen Gewinnern und Verlierern sowie zwischen Gewinnern und naiven CS-Fliegen. Einzig die Tatsache, dass Verlierer eine signifikant erhöhte GNA gegenüber naiven CS-Fliegen aufwiesen, ließ sich nicht unmittelbar erklären und sollte in Folgeversuchen genauer untersucht werden.

Die zweite wichtige Erkenntnis aus dieser Versuchsreihe bestand darin, dass das Aggressionsverhalten und die Saccharosepräferenz in naiven CS-Fliegen höchstwahrscheinlich keine endogen gekoppelten Eigenschaften sind. Wir konnten feststellen, dass ein einmaliger Sieg oder eine einmalige Niederlage die Saccharosepräferenz nicht beeinflusst. Die Tatsache, dass sich die Saccharosepräferenz der Gewinner und Verlierer durch den Kampf kaum verändert hatte und weiterhin auf dem gleichen Niveau wie bei naiven CS-Fliegen war, ließ darauf schließen, dass sie vor dem Kampf auch ungefähr vergleichbare Saccharosepräferenzen aufwiesen. Trotz der ähnlichen Saccharosepräferenzen gab es scheinbar stärkere und schwächere Fliegen, die ihre Kämpfe gewonnen bzw. verloren hatten. Die Saccharosepräferenz schien also initial auf die Kampfkraft der Fliegen keinen größeren Einfluss zu haben.

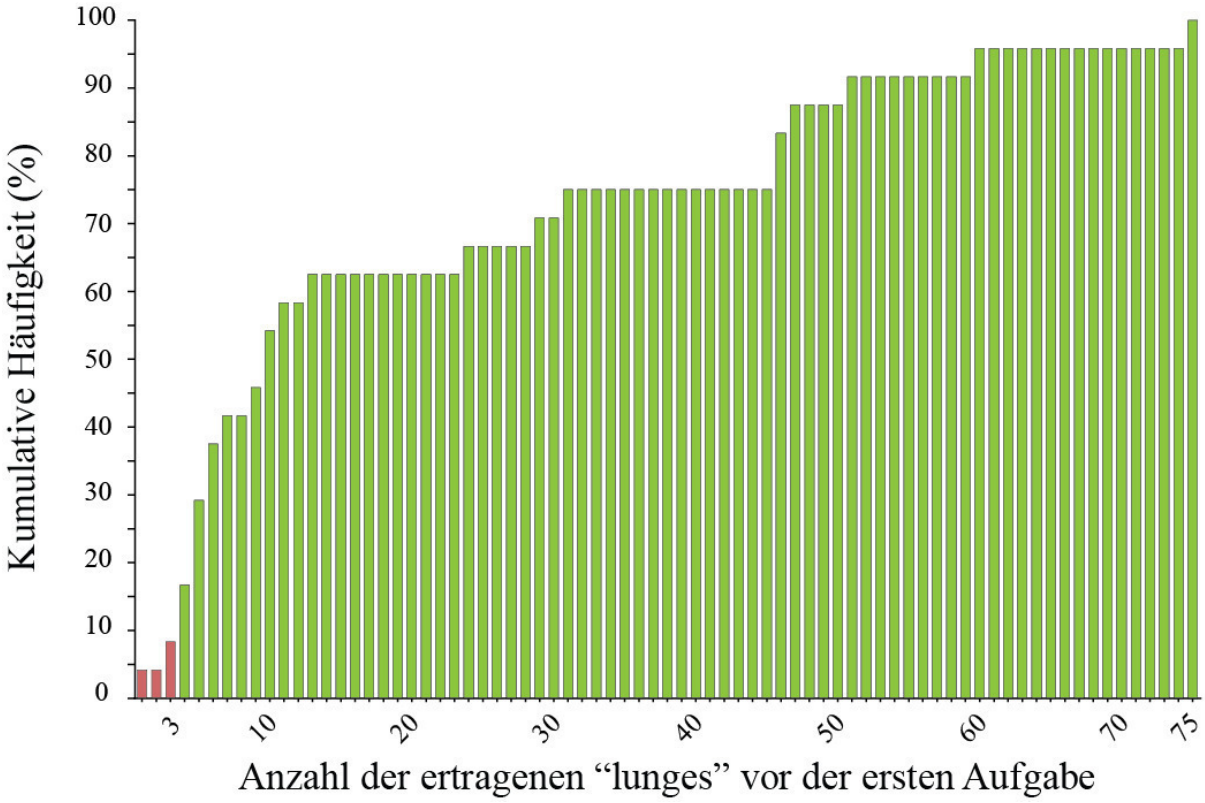
Die Kopplung der Aggressionsminderung mit herabgesetzter Saccharosepräferenz, wie wir sie beim „chronischen Verlierer“-Phänotyp detektieren konnten, schien demzufolge höchstwahrscheinlich eine direkte Folge der „chronic social defeat“-Erfahrung zu sein. Diese Erfahrung hatte scheinbar die beiden Charakteristika, die ursprünglich keine Verbindung miteinander hatten, gekoppelt und gleichsam gesenkt. Nachdem wir diesen Kritikpunkten mit einem zusätzlichen Experiment begegnet waren, konnten wir eine detailliertere Analyse unseres erhobenen Datensatzes vorantreiben.

3.2. Die „chronischen Verlierer“ bestehen aus zwei Subpopulationen

Bis zu diesem Zeitpunkt hatten wir die „chronischen Verlierer“-Fliegen, die alle sechs Trainingskämpfe gegen die „bullies“ verloren hatten, stets als homogene Gruppe betrachtet und dementsprechend statistisch als eine Einheit verwendet. Die genauere Analyse der Testkämpfe am siebten Tag zeigte jedoch, dass es möglich ist, diese Gruppe weiter zu unterteilen. Während ungefähr 70% (119/171) der „chronischen Verlierer“ auch den Testkampf verloren, gelang es 30% (52/171) von ihnen den Testkampf zu gewinnen. Trotz der sechstägigen „chronic social defeat“-Periode und insgesamt sechs verlorenen Kämpfen gegen die „bullies“ gelang es also einer bestimmten Subpopulation der „chronischen Verlierer“ am siebten Tag eine gleich große und gleich alte naive CS-Fliege zu besiegen. Diese Form der Resilienz veranlasste uns, die Gruppe der „chronischen Verlierer“ nochmals genauer zu unterteilen. Die „chronischen Verlierer“, die in der Lage waren den Testkampf zu gewinnen, wurden von uns als „resistente“ Fliegen bezeichnet. Diese „resistenten“ Fliegen zeigten im Testkampf keine herabgesetzte Aggression und waren in der Lage, sich ungeachtet ihrer vorherigen Erfahrung mit den „bullies“ gegen naive CS-Fliegen durchzusetzen.

Im Gegensatz zu den Gewinnern des Testkampfes war es für die Gruppe der Verlierer der Testkämpfe deutlich komplexer eine adäquate Bezeichnung zu finden. In diesem Zusammenhang muss man sich verdeutlichen, was das Wort „resistent“ exakt bedeutet. Modellhaft kann man sich eine „resistente“ Fliege als ein Individuum vorstellen, das nach der sechstägigen „chronic social defeat“-Periode keine wesentlichen Verhaltensänderungen aufweist und sich dementsprechend immer noch sehr ähnlich wie eine naive CS-Fliege verhält. Setzt man dies nun voraus, so würden die Testkämpfe zwischen „resistenten“ Fliegen und naiven CS-Fliegen am siebten Tag in etwa normalen Kämpfen zwischen CS-Fliegen gleichen. Statistisch gesehen würden in diesem Fall die „resistenten“ Fliegen ungefähr 50% ihrer Kämpfe gewinnen, aber auch 50% dieser Kämpfe verlieren. Somit wäre es ein Fehler, alle „chronischen Verlierer“, die ihre Testkämpfe verloren haben, als „empfänglich“ für „chronic social defeat“ zu bezeichnen. Unter ihnen befindet sich nämlich eine maskierte Subpopulation an „resistenten“ Fliegen, die ein intaktes, den CS-Fliegen ähnliches, Kampfverhalten zeigen und schlichtweg ihren Testkampf gegen einen gleichstarken Gegner verloren haben. Um diese zweite Gruppe der „resistenten“ Fliegen innerhalb der Verlierer des Testkampfes ausfindig zu machen, analysierten wir die Anzahl an „lunges“ als Parameter für Ausdauer und Widerstandsfähigkeit während eines Kampfes. Wir wussten zu diesem Zeitpunkt, dass naive

CS-Fliegen in der Lage sind durchschnittlich 21 „lunges“ zu ertragen, bevor sie die Flucht ergreifen und aufgeben. Für diesen Datensatz der CS-Fliegen erstellten wir ein Histogramm mit der Darstellung der kumulativen Häufigkeitsverteilung der ertragenen „lunges“ vor Fluchtergreifung bei naiven CS-Fliegen (Figur 5). Da es sich hierbei um eine erste explorative Analyse von „resistenten“ und „empfänglichen“ Fliegen handelte und wir demzufolge zunächst eine möglichst hohe Sensitivität erzielen wollten, akzeptierten wir ein höheres Fehlerniveau und wählten anstatt der üblichen 5% eine Schwelle von 10% zur Unterscheidung zwischen „resistenten“ und „empfänglichen“ Fliegen. Anhand der grafischen Darstellung wurde erkennbar, dass 91,7% der CS-Fliegen in der Lage sind mindestens 4 „lunges“ ihres Gegners zu ertragen bevor sie aufgeben. Die kumulative Häufigkeit von CS-Fliegen, die nach 3 oder weniger „lunges“ bereits die Flucht ergreifen, lag bei 8,3%. Dementsprechend wählten wir die Anzahl von 3 „lunges“ als Cut-Off für die weitere Einteilung derjenigen „chronischen Verlierer“-Fliegen, die ihren Testkampf verloren hatten. Sofern die „chronischen Verlierer“-Fliegen in ihrem Testkampf noch in der Lage waren 4 oder mehr „lunges“ zu ertragen, wurden sie als „resistent“ bezeichnet, da dieses Verhalten noch in den Rahmen von erwartbarem CS-Verhalten einzustufen war. Wenn die „chronischen Verlierer“-Fliegen ihren Testkampf bereits nach 3 oder weniger „lunges“ aufgegeben hatten, so wurden sie als „empfänglich“ für „chronic social defeat“ bezeichnet, da sie ein Verhalten an den Tag legten, das mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 10% nicht mehr als erwartbares CS-Verhalten einzustufen war und somit von einer Verhaltensänderung infolge der „chronic social defeat“-Erfahrung auszugehen war.



Figur 5: Kumulatives Histogramm der „lunges“ vor der ersten Aufgabe bei CS-Fliegen
In dem Histogramm sind die kumulativen Häufigkeiten aller beobachteten „lunges“ vor der ersten Aufgabe bei naiven CS-Fliegen gezeigt (n=24). In roter Farbe wurde die kumulative Häufigkeit für 3 oder weniger „lunges“ vor der ersten Aufgabe bei CS-Fliegen markiert ($p_{kumulativ}$=8,3%). In grüner Farbe sind die restlichen „lunges“ mit ihrer jeweiligen kumulativen Häufigkeit dargestellt.

Letztendlich erhielten wir damit eine neue Aufteilung der „chronischen Verlierer“, die für den weiteren Verlauf dieser Arbeit wichtig war. Zum einen konnten wir die „empfänglichen“ Fliegen als eine Gruppe von Fliegen identifizieren, die in hohem Maße durch die Erfahrung des „chronic social defeat“ beeinflusst wurden und eine massive Alteration ihres Kampfverhaltens im Testkampf erkennbar werden ließen. Zum anderen verfügten wir über die neue Gruppe der „resistenten“ Fliegen, die sich aus denjenigen „chronischen Verlierern“ zusammensetzte, die entweder ihre Testkämpfe für sich entschieden hatten oder ihre Testkämpfe verloren hatten, ohne dabei jedoch eine maßgebliche Veränderung ihres Kampfverhaltens zu offenbaren (Abbildung 17).

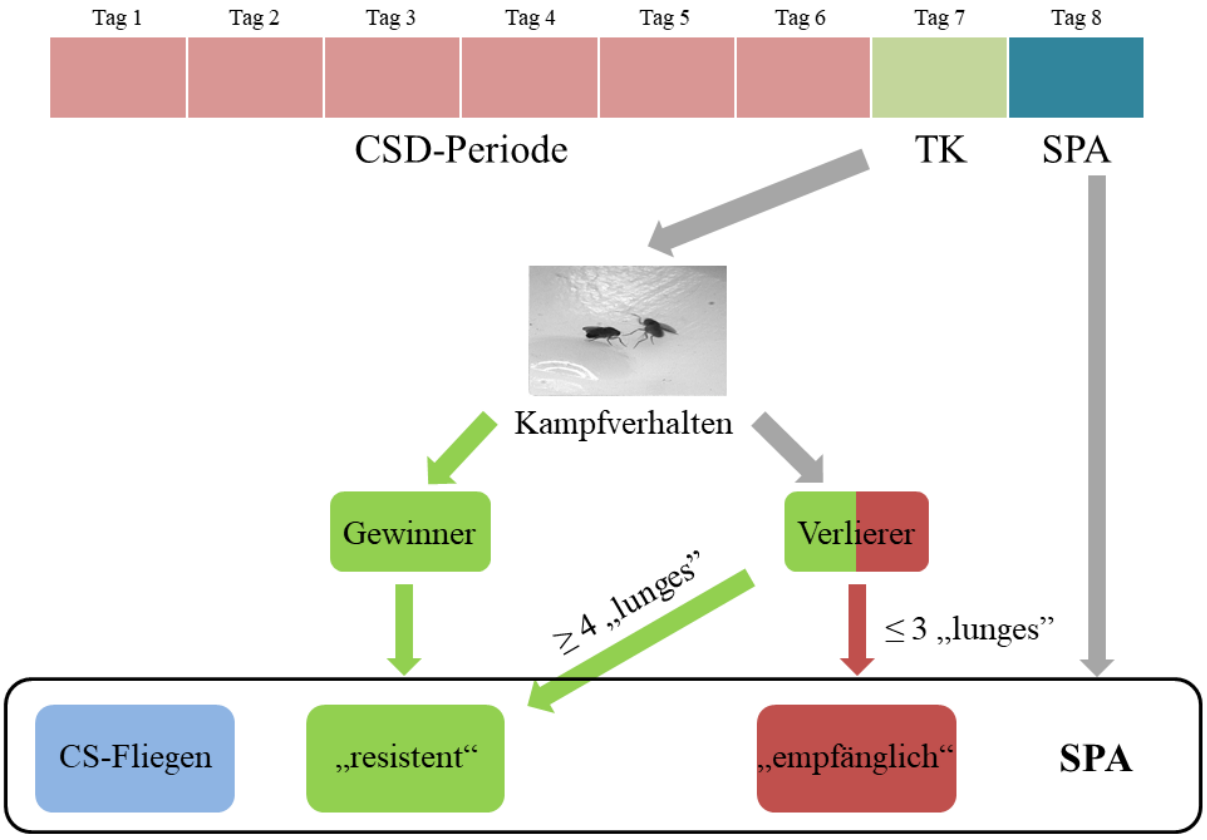
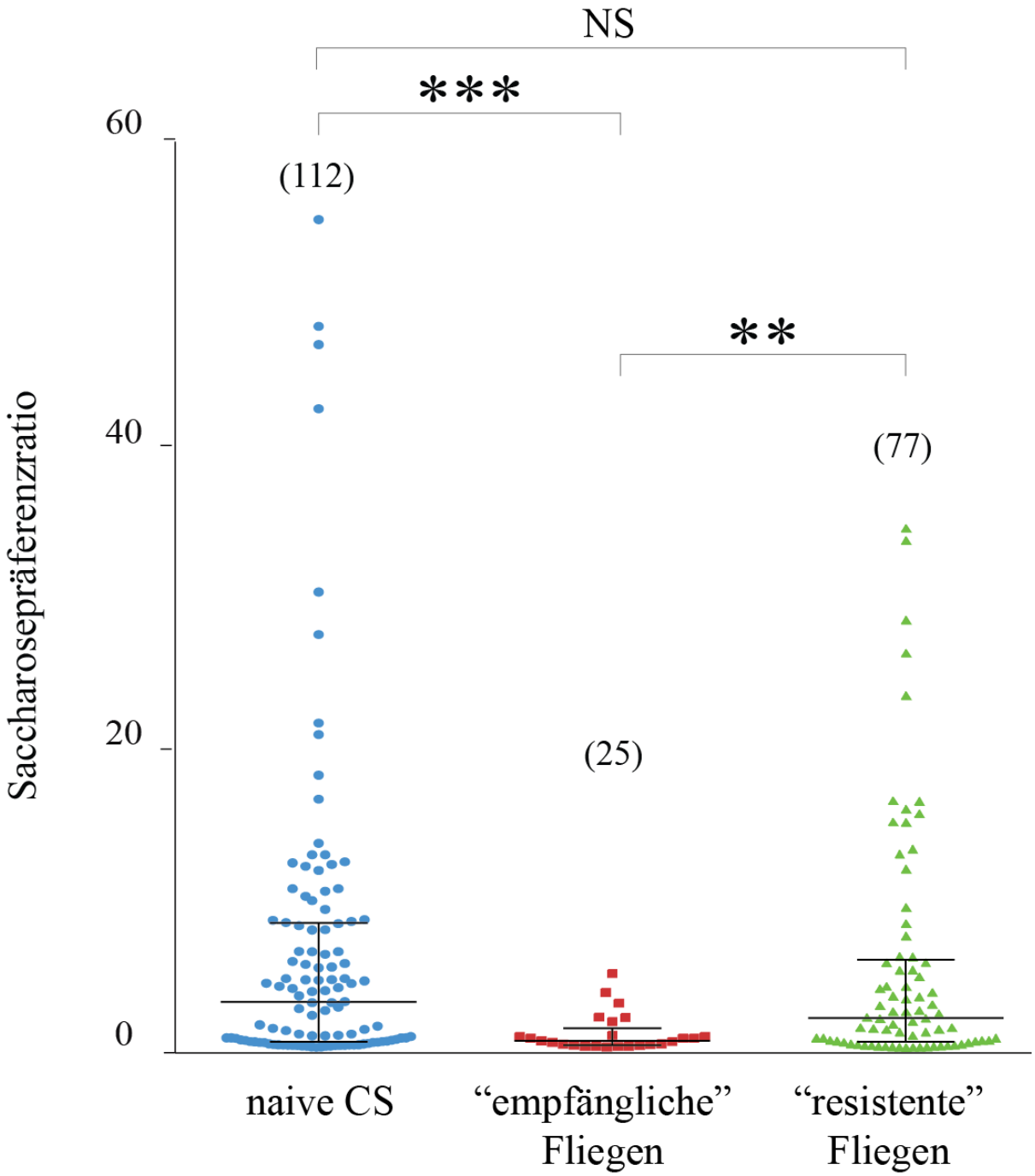


Abbildung 17: Schematischer Aufbau der Tage 7 und 8 des „chronic social defeat"-Protokolls. Anhand des Kampfverhaltens im Testkampf (TK) wurden die Fliegen zunächst in Gewinner und Verlierer eingeteilt, wobei die Gewinner direkt als „resistent" eingestuft wurden. Die Verlierer wurden anhand des Cut-Offs bei 3 „lunges" in „resistente" Fliegen oder „empfängliche" Fliegen eingestuft. Dadurch erhielten wir die Gruppen der „resistenten" und „empfänglichen" Fliegen, die an Tag 8 zusammen mit den naiven CS-Fliegen in der SPA verglichen wurden.

3.3. „Empfängliche“ und „resistente“ Fliegen besitzen unterschiedliche SPR

Als nächstes wollten wir überprüfen, ob sich die „empfänglichen“ und „resistenten“ Fliegen auch in der SPA unterscheiden ließen. Als erstes fiel hierbei auf, dass die „empfänglichen“ Fliegen eine SPR von ca. 0,94 aufwiesen (MW= 0,94; Median=0,43; IQA=1,1) und damit sowohl gegenüber den „resistenten“ Fliegen mit einer SPR von ca. 5,2 (MW= 5,2; Median= 1,9; IQA= 5,4), als auch gegenüber den naiven CS mit einer SPR von ca. 6,2 (MW=6,2; Median=3,0; IQA=7,8) eine signifikant herabgesetzte Saccharosepräferenz besaßen. Gleichzeitig ist hervorzuheben, dass die „resistenten“ Fliegen und die naiven CS-Fliegen vergleichbare Saccharosepräferenz zeigten. (Figur 6, Kruskal-Wallis-Test, p-Wert= 0,0012; Dunn’s Multiple Comparison mit $p<0,001$ bei Vergleich von naiven und „empfänglichen“ Fliegen, und mit $p<0,01$ bei Vergleich von „empfänglichen“ und „resistenten“ Fliegen). Dieses Ergebnisprofil deckte sich mit den Resultaten aus dem Testkampf und wies auf eine Korrelation der Symptome „Aggressionsminderung“ und „herabgesetzte Saccharosepräferenz“ hin, die nur bei den „empfänglichen“ Fliegen induziert wurden. Lediglich die Fliegen, die bereits im Testkampf eine starke Wesensveränderung im Sinne einer Aggressionsminderung offenbarten, zeigten also auch am nachfolgenden Tag eine signifikant verminderte Saccharosepräferenz. Ihre Beschreibung als „empfänglich“ gegenüber „chronic social defeat“ erschien dadurch weiterhin als gerechtfertigt. Andererseits zeigten die „resistenten“ Fliegen, die bereits im Testkampf unbeeinflusst von den vorhergehenden sechs Versuchstagen schienen, in der anschließenden SPA keine signifikanten Veränderungen und verhielten sich somit in beiden Experimenten in hohem Maße wie naive CS-Fliegen.



Figur 6: Vergleich der SPR der drei experimentellen Hauptgruppen.
Die „empfänglichen“ Fliegen (MW= 0,94; Median=0,43; IQA=1,1) zeigen eine signifikante Reduktion der SPR verglichen mit den naiven (MW=6,2; Median=3,0; IQA=7,8) und den „resistenten“ Fliegen (MW= 5,2; Median= 1,9; IQA= 5,4). (Dunn’s Multiple Comparison Test: $p<0,001$ bei Vergleich von naiven und „empfänglichen“ Fliegen, und $p<0,01$ bei Vergleich von „empfänglichen“ und „resistenten“ Fliegen). Zwischen den naiven und den „resistenten“ Fliegen existiert kein signifikanter Unterschied bezüglich der SPR. Der Gruppenvergleich der 3 Populationen fiel hochsignifikant aus (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert= 0,0012 für den Vergleich der drei Gruppen insgesamt).

3.4. Persistenz der Effekte von „chronic social defeat“

Nach der Etablierung dieses Verhaltensmodells sollte nun die Persistenz dieser Symptomatik überprüft werden. Zu diesem Zweck modifizierten wir den ursprünglichen Versuchsaufbau dahingehend, dass nach der sechstägigen „chronic social defeat“-Periode eine ebenfalls sechs Tage andauernde Isolationsphase geschaltet wurde. Während dieser Zeit befanden sich die „chronischen Verlierer“ permanent in ihren Standardgefäßen (Reagenzgläser mit Fliegennahrung, siehe Methodenteil) und hatten keinen Kontakt zu anderen Fliegen. Der Testkampf fand am 13. und die SPA am 14. Tag statt. Die naiven CS-Fliegen, die als Gegner für den Testkampf dienten, waren genauso alt wie die „chronischen Verlierer“ und hatten bis zum Testkampf am 13. Tag keinen Kontakt mit anderen Fliegen. Somit hatten sie zum Zeitpunkt des Testkampfes insgesamt zwölf Tage in Isolation verbracht (Abbildung 18).

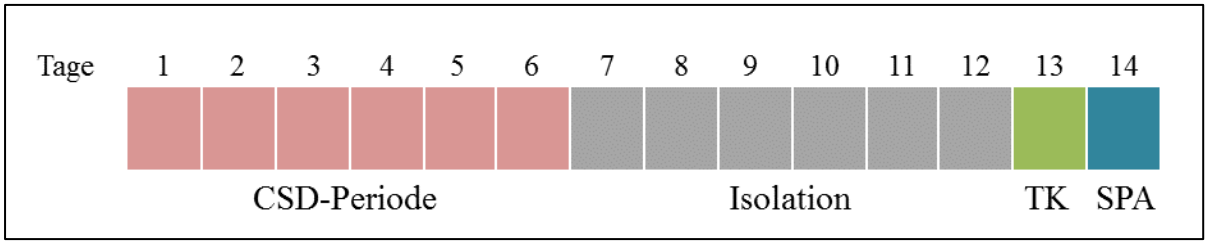
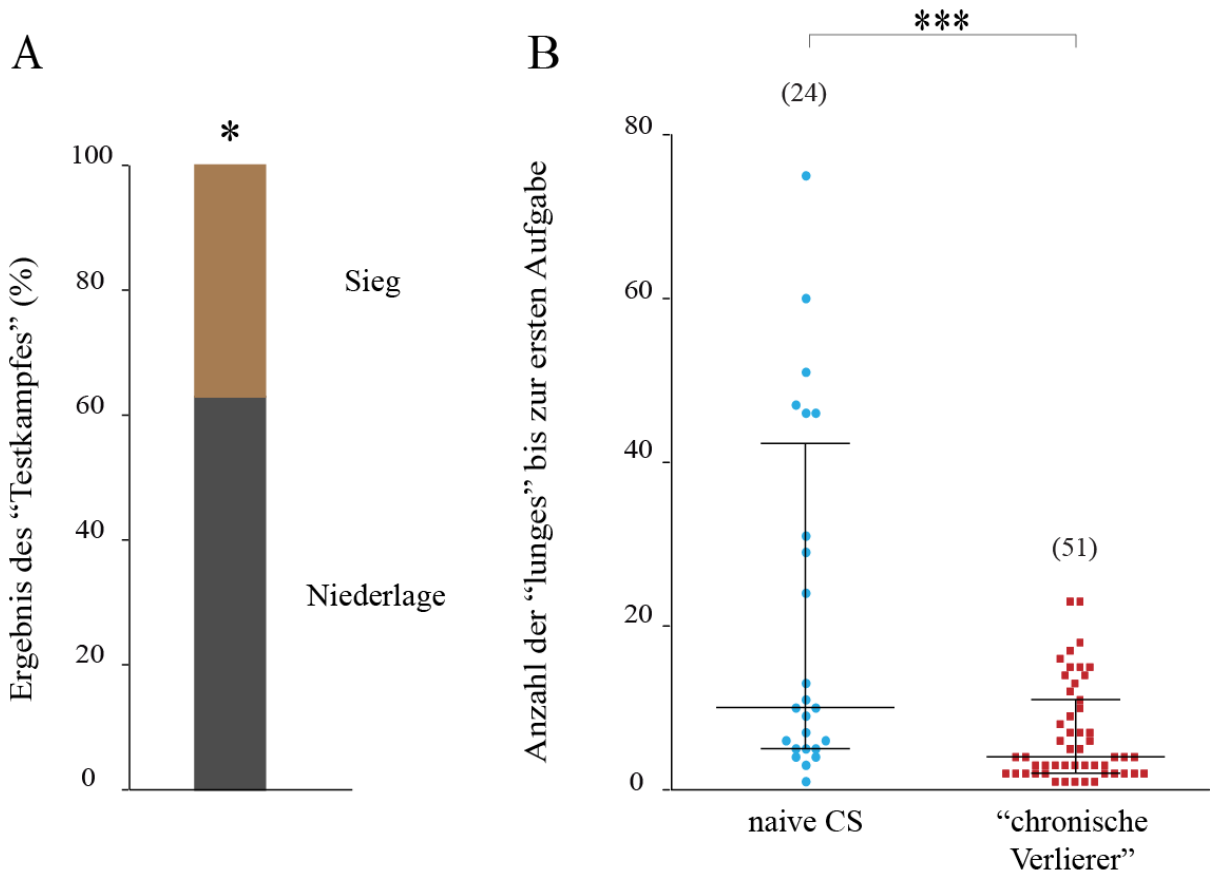


Abbildung 18: Ablauf des „chronic social defeat“-Protokolls mit Isolationsperiode.

Im Testkampf zeigte sich, dass auch nach der Isolation die „chronischen Verlierer“ den naiven CS-Fliegen unterlegen waren und ca. 63% (51/81) ihrer Kämpfe verloren (Figur 7A; χ^2-Test; p=0,0196). Darüber hinaus erschien die Widerstandsfähigkeit der „chronischen Verlierer“ nach der Isolation noch weiter abgefallen zu sein. Dies wurde daran ersichtlich, dass sie im Falle einer Niederlage im Testkampf bereits nach durchschnittlich sieben „lunges“ (MW=6,7; Median=4,0; IQA=9,0) den „food cup“ verließen und somit deutlich früher die Flucht ergriffen, als naive CS-Fliegen, die ca. 21 „lunges“ (MW=21,2; Median=10,0; IQA=37,3) bis zur Aufgabe des Kampfes ertrugen (Figur 7B; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001).

Trotz dieser signifikanten Ergebnisse aus dem Testkampf brachte die SPA keinen weiteren Aufschluss. „Resistente“ und „empfängliche“ Fliegen, sowie naive CS-Fliegen zeigten in der SPA keine signifikanten Unterschiede in ihrer Saccharosepräferenz. Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Komponenten des hier erzeugten Phänotyps eine unterschiedliche Robustheit und Persistenz besitzen. Während die Effekte von „chronic social defeat“ auf das Kampfverhalten eine Woche später immer noch deutlich nachweisbar waren, schien sich das

Essverhalten der „chronischen Verlierer“ bereits wieder normalisiert und den naiven CS-Fliegen angeglichen zu haben.



Figur 7: Auswirkungen der Isolationsperiode auf das Kampfverhalten der „chronischen Verlierer“.
(A) Die „chronischen Verlierer“ verlieren 63% (51/81) ihrer Kämpfe gegen naive CS-Fliegen (n=81; χ^2-Test; p=0,0196). (B) Die „chronischen Verlierer“ flüchteten nach durchschnittlich sieben „lunges“ (MW=6,7; Median=4,0; IQA=9,0) vom „food cup“ während naive CS im Mittel 21 „lunges“ (MW=21,2; Median=10,0; IQA=37,3) bis zur Kampfaufgabe ertragen (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001).

3.5. Effekte der serotonergen Manipulationen im Rahmen des CSD-Modells

3.5.1. Chronische Serotonin-Suppression mittels α-MTP-Nahrung

Nach der Etablierung und detaillierten Untersuchung des „chronischen Verlierer"-Phänotyps, wendeten wir uns anschließend verschiedenen serotonergen Manipulationen zu und analysierten deren Effekte im Rahmen des „chronic social defeat"-Modells. Zunächst verwendeten wir eine globale und chronische Suppression der zentralnervösen Serotoninkonzentration mittels α-MTP-Fütterung (siehe Methodenteil 2.6.1.1). Bevor wir α-MTP im Rahmen unseres „chronic social defeat"-Modell erproben konnten, mussten wir zuerst dessen Einfluss auf normale CS-Fliegen untersuchen. Als erstes fiel hierbei auf, dass CS-Fliegen, die auf α-MTP-Nahrungsmischung gehalten wurden, die Fähigkeit zu kämpfen gänzlich verloren. Diese Fliegen fanden zwar den „food cup" und zeigten auch ein reges Interesse sowohl an der Nahrung als auch an dem darauf platzierten Weibchen, jedoch kam es zu keinerlei Kampfhandlungen, die man hätte auswerten oder messen können. Diese Beobachtungen wurden in der Form von uns erwartet, da sie sich mit dem gegenwärtigen Stand der *Drosophila*-Serotoninforschung decken (Alekseyenko et al. 2010; Dierick and Greenspan 2007).

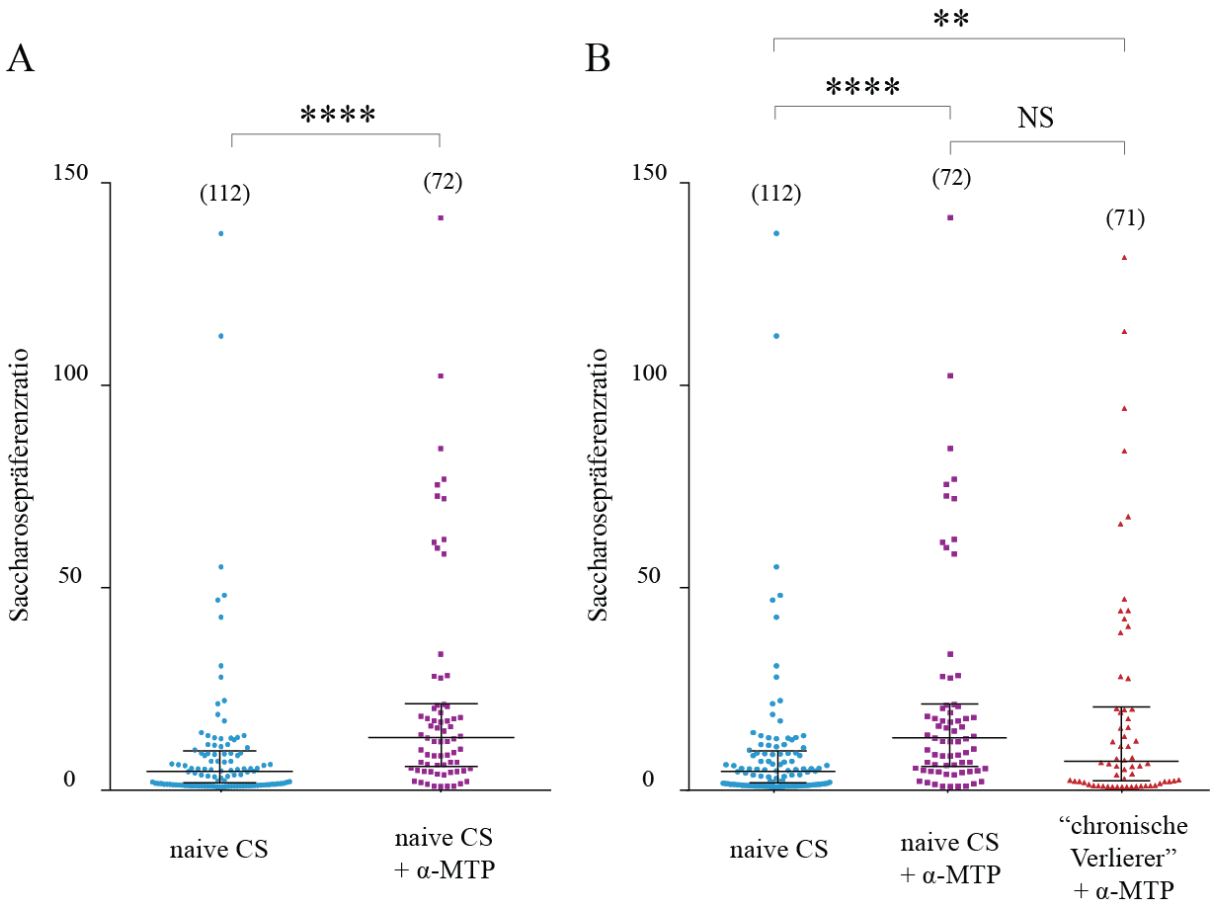
Als nächstes führten wir die SPA durch und verglichen dabei die Saccharosepräferenz von naiven CS-Fliegen mit derjenigen von gleichalten CS-Fliegen, die jedoch auf α-MTP-Nahrung gehalten worden waren (Figur 8A, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p<0{,}0001$). Hierbei zeigte sich, dass α-MTP einen äußerst starken Effekt auf das Essverhalten der *Drosophila* hat. Während CS-Fliegen mit normaler Nahrung eine SPR von ca. 6,2 (MW=6,2; Median=3,2; IQA=7,9) aufweisen, zeigten CS-Fliegen unter Zugabe von α-MTP einen massiven Anstieg ihrer SPR auf ca. 20,3 (MW=20,3; Median=11,5; IQA=15,5).

Durch die Zugabe von α-MTP zur herkömmlichen Fliegennahrung erhielten wir somit Versuchssubjekte, die in der Kampfarena zwar auf dem „food cup" landeten und sich dort die meiste Zeit aufhielten, aber gleichzeitig nicht in der Lage waren einen Gegner zu attackieren (kein einziger notierter „lunge" in den durchgeführten Testkämpfen). Aufgrund der nahezu vollständigen Abwesenheit von aggressiven Verhaltensmustern, waren diese Fliegen für die Untersuchung von „chronic social defeat"-Effekten auf das Kampfverhalten wenig geeignet. Vom Testkampf erwarteten wir uns demzufolge nur wenige neue Erkenntnisse. Die extrem hohe Saccharosepräferenz ließ jedoch auf interessante Ergebnisse in der SPA hoffen.

Dementsprechend entschlossen wir uns an den α-MTP-Fliegen eine „chronic social defeat“-Studie durchzuführen.

Die oben beschriebenen Eigenschaften der α-MTP-Fliegen (keine „lunges“, hohe Saccharosepräferenz) führten im CSD-Versuch zu einigen speziellen Verhaltensweisen. Während der „chronic social defeat“-Periode führte ihre Unfähigkeit den Gegner zu attackieren dazu, dass sie sämtliche Kämpfe gegen die ihrerseits hochaggressiven „bullies“ verloren. Damit erwiesen sich diese Fliegen zunächst als sehr passend für das CSD-Modell, da nahezu alle Fliegen, die am Anfang in den Versuch aufgenommen wurden, alle sechs Kämpfe gegen die „bullies“ verloren und man somit nur sehr wenige Fliegen während der Trainingsphase aussortieren musste. Ausgeschlossen wurden hauptsächlich Fliegen, die den „food cup“ nicht betreten hatten und es dadurch erst gar nicht zu Kampfhandlungen gekommen war. Im Testkampf zeigte sich jedoch rasch der Nachteil des α-MTP-Experiments. Da der Testkampf unser wichtigstes Instrument in der Unterscheidung von „resistenten“ und „empfänglichen“ Fliegen war, legten wir großen Wert darauf, dass die „chronischen Verlierer“ im Testkampf mit Fliegen kämpften, die ihnen bis auf die „chronic social defeat“-Erfahrung so ähnlich wie möglich waren. Im Falle unseres α-MTP-Experiments setzten wir unsere „chronischen Verlierer“ im Testkampf gegen naive CS-Fliegen an, die gleich alt und gleich groß waren und ebenfalls über die gesamte Dauer des Experiments auf α-MTP-Nahrung aufgezogen worden waren. Aufgrund des nahezu vollständigen Verlustes von aggressiven Handlungen durch die α-MTP-vermittelte Serotoninblockade, erhielten wir Testkämpfe, in denen weder die „chronischen Verlierer“, noch die naiven CS-Fliegen „lunges“ ausführten. Dies hatte zur Folge, dass nahezu alle Kämpfe in einem Unentschieden endeten (71/73; zwei Kämpfe konnten nicht gewertet werden, da in diesen Fällen die Fliegen nicht den „food cup“ erreichten). Der Testkampf lieferte uns dementsprechend keine Gewinner/Verlierer-Paare und gab uns dementsprechend nicht die Möglichkeit die „chronischen Verlierer“-Fliegen analog zu den vorherigen Versuchen weiter in „resistente“ und „empfängliche“ Fliegen einzuteilen. Dennoch konnten wir im Protokoll weiter fortfahren, da die Versuchstiere immer noch alle Kriterien zur Teilnahme an der SPA erfüllten: 1. Sie hatten in sechs Tagen sechs Kämpfe gegen Vertreter der „bully“-Linie verloren, 2. Sie waren am siebten Tag mit einer naiven, nahezu identischen Fliege in Kontakt gekommen und hatten dabei auch einen ersten Kontakt mit einer (toten) weiblichen Drosophila, 3. Sie waren in der Lage Saccharose und normale Fliegennahrung zu verzehren.

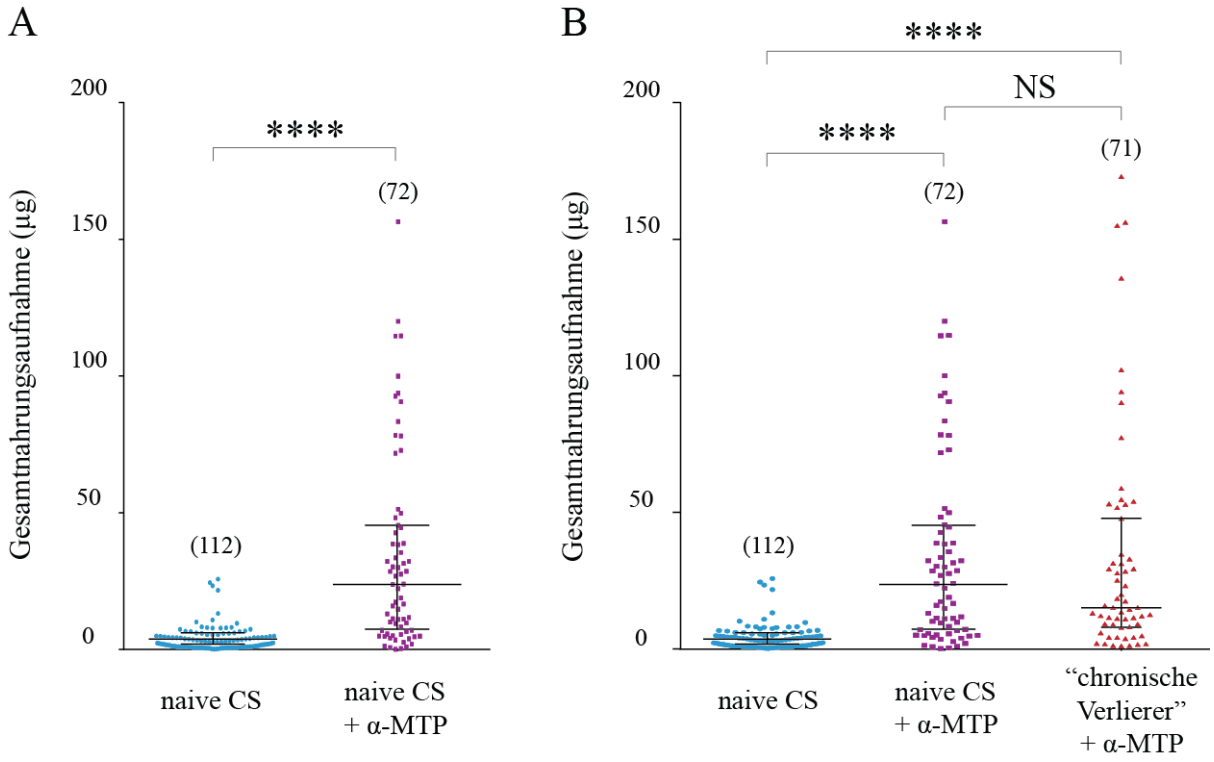
Entsprechend dem Standardprotokoll führten wir am zwölften Versuchstag eine SPA durch und verglichen dabei die SPR von naiven CS-Fliegen, die normale Fliegennahrung verzehrt hatten, mit naiven CS-Fliegen und „chronischen Verlierern“, die auf α-MTP-Nahrung gehalten worden waren. Unter Verzehr von α-MTP-Nahrung zeigte die Gruppe der „chronischen Verlierer“ eine SPR von ca. 17,4 (MW=17,4; Median=5,7; IQA=18,4) und somit keine signifikante Reduktion im Vergleich zu naiven CS-Fliegen, die ebenfalls auf α-MTP-Nahrung gehalten worden waren und dabei eine SPR von ca. 20,3 aufwiesen (MW=20,3; Median=11,5; IQA=15,5). Beide wiesen jedoch im Vergleich mit naiven CS, die auf normaler Fliegennahrung gehalten worden waren, signifikant erhöhte Saccharosepräferenzen auf (Figur 8B, Kruskal-Wallis-Test; $p<0,0001$, Dunn’s Multiple Comparison Test mit $p<0,0001$ für den Vergleich „naive CS vs. naive CS + α-MTP“ und mit $p<0,01$ für den Vergleich „naive CS vs. chronische Verlierer + α-MTP“ und nicht signifikant für den Vergleich „naive CS + α-MTP vs. chronische Verlierer + α-MTP“). Somit führte α-MTP zu einer Erhöhung der Saccharosepräferenz bei CS-Fliegen, die danach auch durch „chronic social defeat“ nicht mehr zu verringern war.



Figur 8: α-MTP-Effekte auf die SPR von CS und „chronischen Verlierern".
A) Zugabe von α-MTP führte bei naiven CS-Fliegen zu einer Erhöhung der Saccharosepräferenz (MW=20,3; Median=11,5; IQA=15,5) im Vergleich zu naiven CS-Fliegen, die auf normaler Fliegennahrung gehalten wurden (MW=6,2; Median=3,2; IQA=7,9). Die Erhöhung der SPR ließ sich nach einer viertägigen α-MTP-Fütterungsphase detektieren und war hochsignifikant (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p<0,0001$). B) Beim Vergleich von naiven CS-Fliegen, die auf normaler Nahrung gehalten wurden, mit naiven CS-Fliegen und „chronischen Verlierern", die auf α-MTP-Nahrung gehalten wurden, zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen (Kruskal-Wallis-Test; $p<0,0001$). Verglich man die Gruppen untereinander, so ergab sich zwischen naiven CS (MW=20,3; Median=11,5; IQA=15,5) und „chronischen Verlierern" (MW=17,4; Median=5,7; IQA=18,4) kein signifikanter Unterschied bezüglich der Saccharosepräferenz, sofern beide auf α-MTP-Nahrung gehalten wurden. Beide Gruppen zeigten jedoch gegenüber naiven CS (MW=6,2; Median=3,2; IQA=7,9), die auf normaler Fliegennahrung gehalten wurden eine signifikante Erhöhung ihrer Saccharosepräferenz (Dunn's Multiple Comparison Test, $p<0,0001$ für „naive CS vs. naive CS + α-MTP", $p<0,01$ für „naive CS vs. chronische Verlierer + α-MTP").

Analog zu den vorherigen Versuchen untersuchten wir zusätzlich die Wirkung von α-MTP auf die Gesamtnahrungsaufnahme (GNA) von naiven CS-Fliegen bzw. von „chronischen Verlierern". Hierbei zeigte sich ein ähnliches Bild wie bereits bei der Saccharosepräferenz). Wurden Fliegen auf α-MTP-Nahrung gehalten, so ergaben sich keine Unterschiede zwischen naiven CS (MW=33,0µg; Median=23,0µg; IQA=38,4µg) und „chronischen Verlierern"

(MW=32,7 µg; Median = 15,1 µg; IQA= 39,8 µg) in Bezug auf die GNA (Figur 9A, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001). Beide Gruppen wiesen jedoch gegenüber naiven CS (MW=3,9µg; Median=2,7µg; IQA=4,1µg), die stets normale Fliegennahrung verzehrt hatten, eine signifikant erhöhte GNA auf. α-MTP schien also zunächst eine Steigerung der GNA zu bewirken, die sich dann jedoch gegenüber der Erfahrung von „chronic social defeat“ robust zeigte und nicht verringert wurde (Figur 9B, Kruskal-Wallis-Test; p<0,0001, Dunn's Multiple Comparison Test mit p<0,0001 für die Vergleiche „naive CS vs. chronische Verlierer + α-MTP“ und „naive CS vs. naive CS + α-MTP“, nicht signifikant für den Vergleich „naive CS + α-MTP vs. chronische Verlierer + α-MTP“).



Figur 9: α-MTP-Effekte auf die GNA von CS und „chronischen Verlierern“.
A) Während naive CS-Fliegen unter normaler Fliegennahrung eine GNA von ca. 3,9 µg (MW=3,9µg; Median=2,7µg; IQA=4,1µg) aufwiesen, besaßen naive CS-Fliegen unter α-MTP-Nahrung eine GNA von ca. 33 µg (MW=33,0µg; Median=23,0µg; IQA=38,4µg) und zeigten somit eine signifikante Erhöhung der Gesamtnahrungsaufnahme (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001). B) Beim Vergleich von naiven CS-Fliegen, die auf normaler Nahrung gehalten wurden, mit naiven CS-Fliegen und „chronischen Verlierer“-Fliegen, die auf α-MTP-Nahrung gehalten wurden, zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen (Kruskal-Wallis-Test; p<0,0001). Verglich man die Gruppen untereinander, so ergab sich zwischen naiven CS (MW=33,0µg; Median=23,0µg; IQA=38,4 µg) und „chronischen Verlierern“ (MW=32,7 µg; Median = 15,1 µg; IQA= 39,8 µg) kein signifikanter Unterschied bezüglich der Saccharosepräferenz, sofern beide auf α-MTP-Nahrung gehalten wurden. Beide Gruppen zeigten jedoch gegenüber naiven CS (MW=3,9µg; Median=2,7µg; IQA=4,1µg), die auf normaler Fliegennahrung gehalten wurden eine signifikante Erhöhung ihrer Saccharosepräferenz (Dunn's Multiple Comparison Test, p<0,0001 für die Vergleiche „naive CS vs. chronische Verlierer + α-MTP“ und „naive CS vs. naive CS + α-MTP“)

Dies war für uns ein erstes Indiz dafür, dass Serotonin eine Rolle in der Entstehung der negativen Effekte von „chronic social defeat“ spielt, wobei uns die genauen Zusammenhänge noch unklar waren. Aus diesem Grund wendeten wir uns im weiteren Verlauf genetischen Methoden zu, um spezifischere Erkenntnisse über den Einfluss von Serotonin auf unsere Versuchsergebnisse zu gewinnen.

3.5.2. Akute Serotonin-Suppression mittels *TpHxShi^{ts1}*

Diese Ergebnisse veranlassten uns dazu, die Rolle des Schlüsselenzyms Tryptophan-Hydroxylase (TpH) bei der Entstehung des „chronischer Verlierer“-Phänotyps eingehender zu untersuchen. Anstatt einer globalen enzymatischen Hemmung, wie sie durch diätetische Zugabe von α-MTP bewirkt wurde, wollten wir nun das GAL4/UAS-System nutzen um die Serotonintransmission akut und kurzfristig zu modulieren. Hierfür verwendeten wir die bereits beschriebene *TpHxShi^{ts1}*-Kreuzung (siehe Methodenteil 2.6.1.2) und schleusten sie in unser „chronic social defeat“-Modell ein.

Nachdem die Trainingskämpfe der „chronic social defeat“-Periode gut durchführbar waren und die *TpHxShi^{ts1}*-Fliegen in ähnlicher Weise wie zuvor die herkömmlichen CS-Fliegen gegen die „bullies“ verloren hatten, führten wir die Testkämpfe bzw. die SPA durch. Da wir die Auswirkungen einer akuten Serotoninblockade während der Niederlagen gegen die „bullies“ auf den „chronischen Verlierer“-Phänotyp überprüfen wollten, führten wir die Trainingskämpfe bei 30°C durch. Die Testkämpfe und die SPA mussten wir jedoch bei 19°C durchführen, da wir eine intakte Serotonintransmission während dieser Versuchsphasen garantieren wollten. Hätten wir die Testkämpfe und die SPA ebenfalls wie die Trainingskämpfe bei 30°C durchgeführt, so hätten wir letztendlich nicht rückschließen können, ob etwaige phänotypische Veränderungen auf die blockierte Serotonintransmission während der Trainingskämpfe oder auf die akut blockierte Serotonintransmission während der Testkämpfe bzw. der SPA zurückzuführen sind. Jedoch ergaben sich durch die Temperatursenkung während der Testkämpfe und der SPA unüberwindbare Probleme. Durch die gesenkte Temperatur waren sowohl die „chronischen Verlierer“-*TpHxShi^{ts1}*-Fliegen als auch die naiven *TpHxShi^{ts1}*-Fliegen derartig motorisch verlangsamt, dass es während des Testkampfes nicht zu Kampfhandlungen bzw. den für die Auswertung essentiell wichtigen „lunges“ kam. Demzufolge wurden keine Gewinner/Verlierer-Paare gebildet und eine Einteilung in „resistente“ und „empfängliche“ Fliegen war nicht möglich. Das gleiche Problem kehrte am folgenden Tag bei der Durchführung der SPA wieder auf. Die Nahrungsaufnahme der Fliegen

war bei der gesenkten Temperatur so gering, dass sie spektrophotometrisch nicht mehr bestimmt werden konnte.

Ursprünglich hatten wir geplant noch zwei weitere Versuchsreihen durchzuführen, bei denen wir einerseits die Serotonintransmission selektiv zwischen den Kämpfen und andererseits über die gesamte Dauer der „chronic social defeat"-Erfahrung blockieren wollten. Da bei beiden Ansätzen jedoch der Testkampf und auch die SPA bei 19°C durchzuführen wären, verzichteten wir auf die Durchführung dieser beiden Versuchsreihen, da absehbar war, dass wir erneut kaum auswertbare Resultate erhalten würden. Aus diesem Grund entschlossen wir uns das serotonerge System mit einem anderen Ansatz zu untersuchen, der uns erfolgsversprechender erschien.

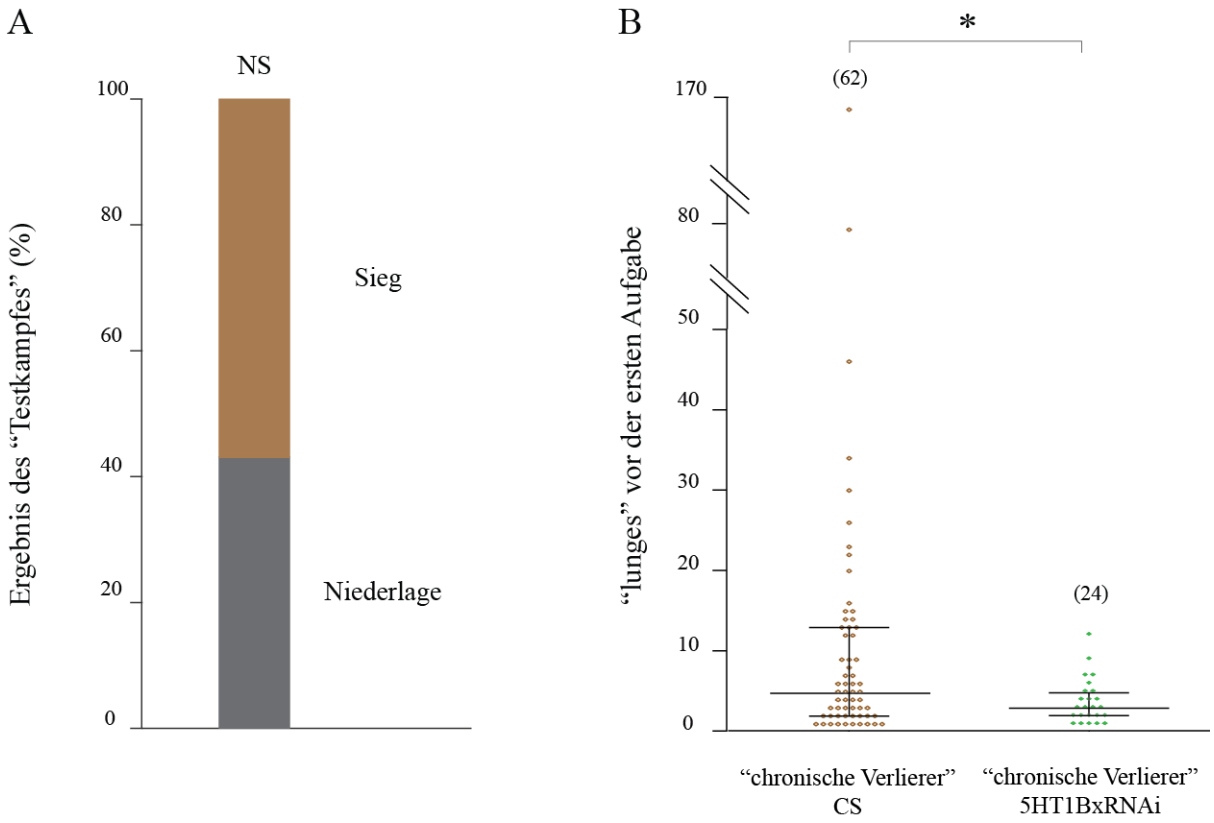
3.5.3. Spezifische Manipulation mittels *d5-HT$_{1B}$xRNAi*

Wir verwendeten die bereits beschriebenen *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (siehe Methodenteil 2.6.2.4) und schleusten sie in unser „chronic social defeat"-Modell ein. Die sechs Tage des „chronic social defeat" gegen die Fliegen der „bully"-Linie erwiesen sich erwartungsgemäß als problemlos durchführbar, da die *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen in der gleichen Art und Weise wie zuvor die CS-Fliegen gegen die „bullies" verloren.

Am siebten Tag fand der Testkampf statt, wobei hier die „chronischen Verlierer" wie im Standardprotokoll vorgesehen gegen einen naiven Gegner antraten, der den identischen genetischen Hintergrund (*d5-HT$_{1B}$xRNAi)*, die gleiche Größe und das gleiche Alter besaß. Hierbei zeigte sich, dass die „chronischen Verlierer" in der Lage waren 57% (33/58) der Testkämpfe für sich zu entscheiden (Figur 10A; n=58; χ^2.Test; p=0,294). Bei insgesamt 67 Testkämpfen ergaben sich 58 Gewinner-Verlierer-Paare, sieben Unentschieden (7/67=10,4%), zwei Testkämpfe ohne „lunges" und keine „hierarchy switches".

Hierbei stach hervor, dass die „chronischen Verlierer"-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen einerseits 57% ihrer Testkämpfe gegen naive Kontrahenten gewinnen konnten, andererseits jedoch im Falle einer Niederlage bereits nach weniger als vier „lunges" aufgegeben hatten (MW=3,6; Median=3,0; IQA=3,0). Die Erwartung, dass eine erhöhte Siegquote auch mit einer erhöhten Anzahl an ertragenen „lunges" im Falle einer Niederlage einhergeht, wurde somit nicht bestätigt. Da eine größere Vergleichspopulation an naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen fehlt und der Parameter „lunges vor der ersten Aufgabe" an naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen bisher noch nicht erhoben wurde, lässt sich keine Aussage darüber treffen inwiefern die „chronischen Verlierer"-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen eine Reduktion dieses Parameters gegenüber naiven Artgenossen

erfahren haben bzw. ob die „chronic social defeat“-Erfahrung einen Einfluss auf diesen Wert hat. Vergleicht man jedoch „chronische Verlierer“-CS-Fliegen, die ihren Testkampf verloren haben mit „chronischen Verlierer“- *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen, so ertrugen die „chronischen Verlierer“-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen eine signifikant niedrigere Anzahl an „lunges“ vor der ersten Aufgabe (Figur 10B, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p=0,0276).

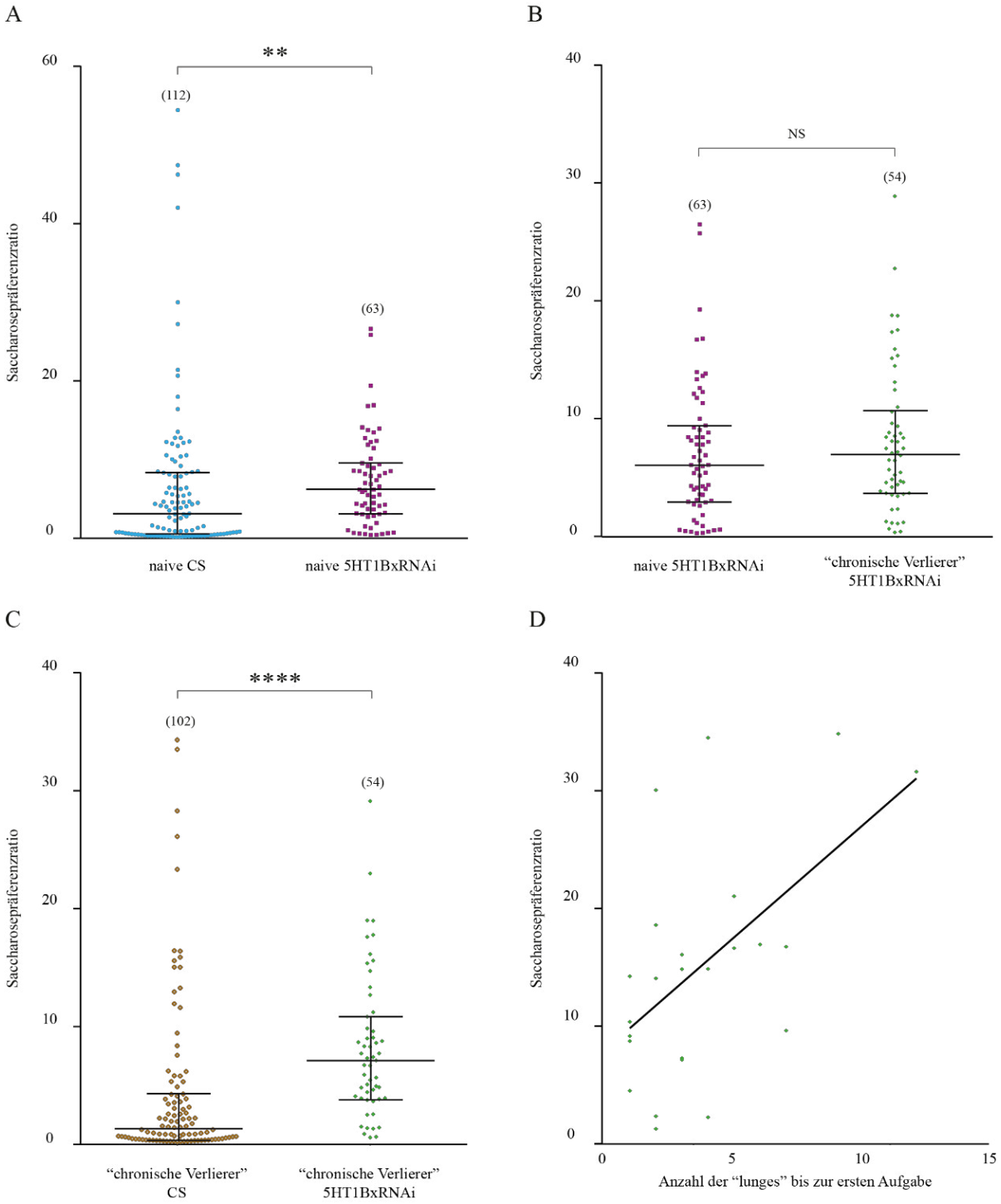


Figur 10: *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen: Testkampf zwischen naiven und „chronischen Verlierern“.
A) Die „chronischen Verlierer“- *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen gewannen 57% (33/58) ihrer Kämpfe gegen genetisch identische naive Fliegen, die gleich groß und gleich alt waren. (n=58; χ^2-Test; p=0,294). B) Verglichen mit „chronischen Verlierer“-CS-Fliegen (MW=11,6; Median=5,0; IQA=11,0) ertrugen „chronische Verlierer“- *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=3,6; Median=3,0; IQA=3,0) im Falle einer Niederlage im Testkampf eine geringere Anzahl an „lunges“ vor der ersten Aufgabe (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p=0,0276). Die Skalierung oberhalb von 50 „lunges“ wurde zur besseren Übersichtlichkeit verkürzt dargestellt (zwei Spitzenwerte: 79 und 167 „lunges“).

Da ein „chronischer Verlierer“-Effekt im Testkampf nicht sichtbar war, entschieden wir uns bei den *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen die Einteilung in „resistent“ und „empfänglich“ aufzugeben und die Fliegen anhand ihres Resultats im Testkampf in Gewinner und Verlierer einzuteilen. Zwischen Abschluss des Testkampfes und Beginn der SPA gingen vier Fliegen beim Transfer von der Kampfarena in die Isolationsgefäße verloren (drei Gewinner, ein Verlierer), sodass bei der Besprechung der SPA-Ergebnisse stets 54 statt 58 „chronische Verlierer“-Fliegen erwähnt werden.

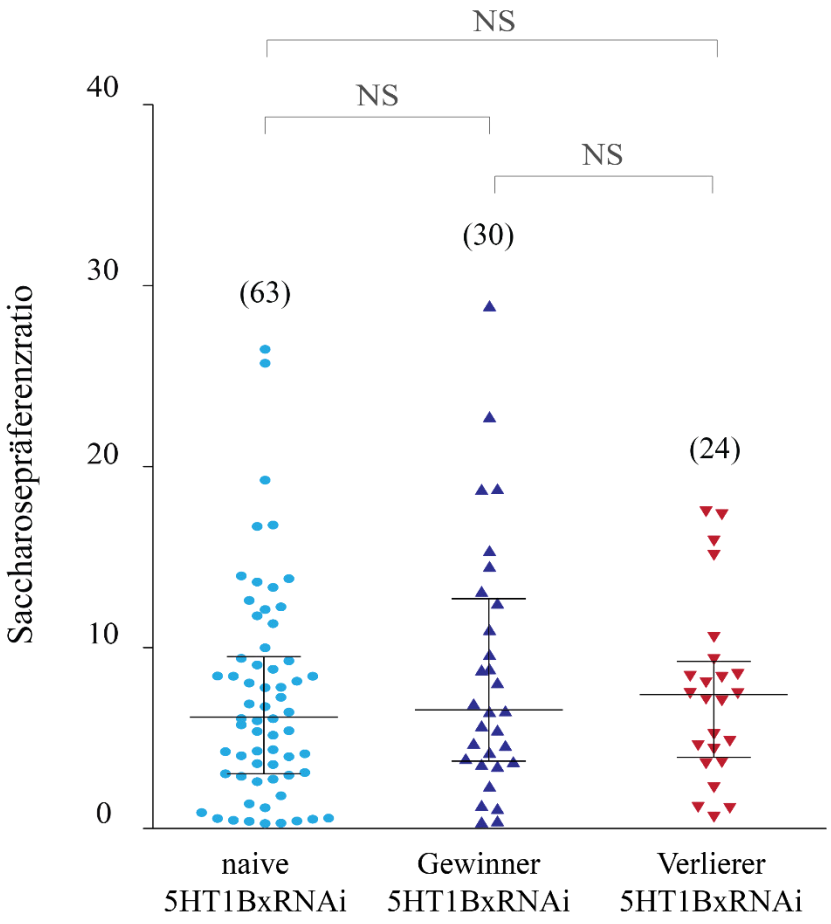
Anschließend führten wir eine SPA durch und verglichen dabei zunächst die SPR von naiven CS-Fliegen und naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (Figur 11A; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p=0,0015). Es zeigte sich, dass bereits der knock-down der d5-HT$_{1B}$-Rezeptoren eine signifikante Steigerung der Saccharosepräferenz von ca. 6,2 auf ca. 7,1 bewirkte (MW=7,1; Median=6,1, IQA=6,5). Auf dieser Grundlage wurde die Saccharosepräferenz von „chronischen Verlierer"-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen mit naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen verglichen. Hierbei zeigte sich bei den „chronischen Verlierer"-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen eine SPR von ca. 8,0 (MW=8,0; Median=7,0, IQA=7,0), die gegenüber den naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen nicht signifikant verringert war (Figur 11B; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p=0,354). Beim Vergleich von „chronischen Verlierer"-CS-Fliegen und „chronischen Verlierer"-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=8,0; Median=7,0, IQA=7,0), zeigten die „chronischen Verlierer"-CS-Fliegen mit ca. 4,2 (MW=4,2; Median=1,2; IQA=3,9) eine deutlich geringere SPR (Figur 11C, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001). Zog man die Verlierer der Testkämpfe heran, so zeigte sich wie schon bei CS-Fliegen eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an „lunges" bis zur ersten Aufgabe im Testkampf und der SPR (Figur 11D, Spearman's r= 0,519; p=0,0094)[1].

[1] Um etwaigen Verständnisproblemen vorzubeugen, soll an dieser Stelle eine kurze Anmerkung zu Figur 11 eingefügt werden. Bei Figur 11A) und B) kann man eine unterschiedliche Anordnung der Datenpunkte der naiven d5-HT1BxRNAi-Fliegen (lila markiert) erkennen. Diese entsteht durch die Skalierung der y-Achsen (SPR bis 60 bzw. bis 40). Dadurch kommt es zu Stauchungen, wobei das Statistikprogramm Prism die Punkte horizontal verschiebt, um ein symmetrisches Bild der Datenpunkte zu erzeugen. An der vertikalen Ausrichtung, die den Wert der Messpunkte angibt, ändert sich hierdurch nichts. Ähnliche horizontale Verschiebungen von Datenpunkten aufgrund unterschiedlicher Skalierung können auch in anderen Figuren dieser Arbeit auftreten.



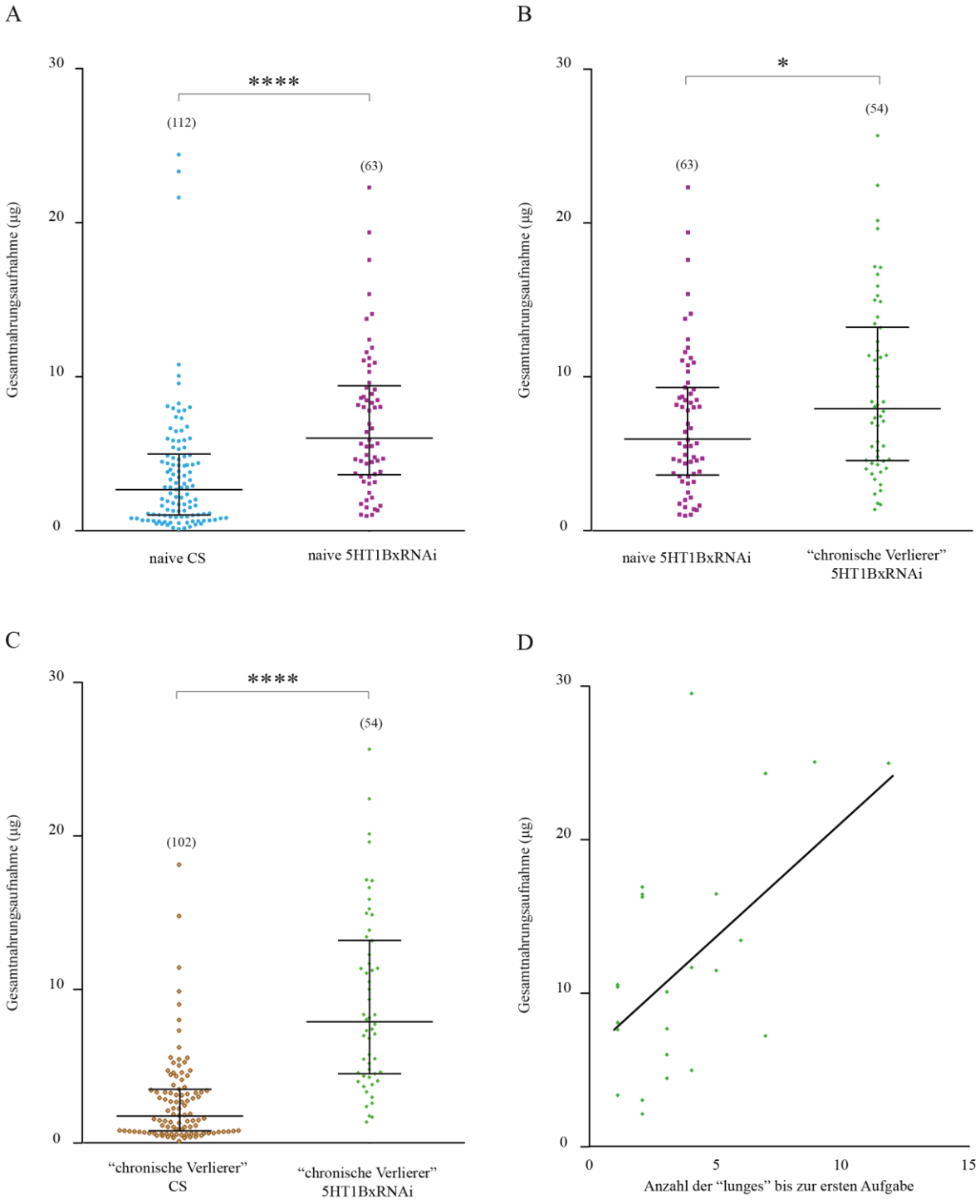
Figur 11: Einfluss der d5-HT$_{1B}$-Suppression auf die Saccharosepräferenz.
A) d5-HT$_{1B}$-Suppression mittels RNAi führte bei naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=7,1; Median=6,1, IQA=6,5) gegenüber naiven CS-Fliegen (MW=6,2; Median=3,0; IQA=7,8) zu einer signifikanten Steigerung der Saccharosepräferenz (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p=0,0015). B) Unter d5-HT$_{1B}$-Suppression bewirkte „chronic social defeat" keine signifikante Herabsetzung der Saccharosepräferenz der „chronischen Verlierer"-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=8,0; Median=7,0, IQA=7,0) (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p=0,354). C) Im Vergleich zu „chronischen Verlierer"-CS-Fliegen (MW=4,2; Median=1,2; IQA=3,9) zeigten „chronische Verlierer"- *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=8,0; Median=7,0, IQA =7,0) eine signifikant höhere SPR (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001). D) Es bestand eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl an „lunges", den die Verlierer während ihres Testkampfes ertrugen und ihrer SPR (n=24; Spearman's r= 0,519; p=0,0094).

Zuletzt unterteilten wir die „chronischen Verlierer“-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen anhand des Testkampfes in Gewinner und Verlierer und verglichen deren Saccharosepräferenz mit naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen. Die Gewinner besaßen eine SPR von ca. 8,5 (MW=8,5; Median=6,5, IQA=9,0), während die Verlierer eine SPR von ca. 7,5 (MW=7,5; Median=7,4, IQA=5,3) aufwiesen. Anhand dieser Daten zeigte sich zwischen Gewinnern, Verlierern und naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=7,1; Median=6,1, IQA=6,5) kein signifikanter Unterschied (Figur 12; Kruskal-Wallis-Test; p=0,648; Dunn’s Multiple Comparison Test nicht signifikant für alle beteiligten Gruppen).



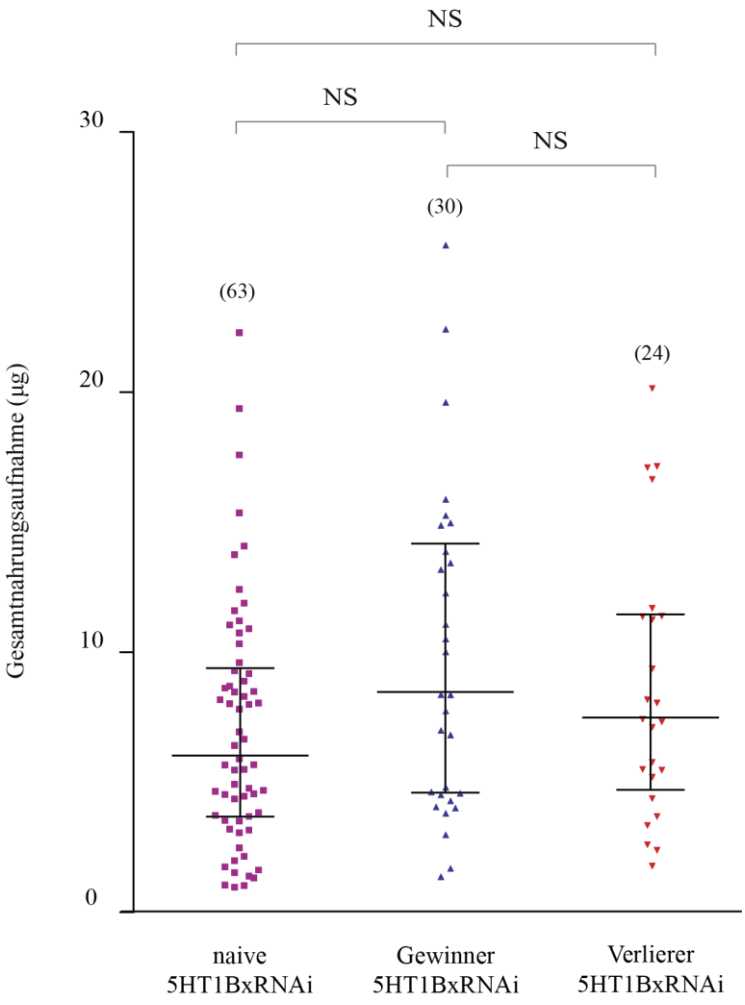
Figur 12: Vergleich der Saccharosepräferenz anhand des Resultats des Testkampfes.
Die „chronischen Verlierer“-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen wurden anhand des Testkampfes in Gewinner und Verlierer eingeteilt. Beim Vergleich von Gewinnern (MW=8,5; Median=6,5, IQA=9,0), Verlierern (MW=7,5; Median=7,4, IQA=5,3) und naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=7,1; Median=6,1, IQA=6,5), zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Saccharosepräferenz (Kruskal-Wallis-Test; p=0,648; Dunn’s Multiple Comparison Test nicht signifikant für alle beteiligten Gruppen).

In Bezug auf die gesamte Nahrungsaufnahme (GNA) zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Saccharosepräferenz. Die gesamte Nahrungsaufnahme der naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen betrug ca. 6,9 µg (MW=6,9µg; Median=5,9µg; IQA=5,8µg) und war dementsprechend signifikant höher als von naiven CS-Fliegen, die lediglich 3,9 µg (MW=3,9µg; Median=2,6µg; IQA=4,0µg) verzehrt hatten (Figur 13A; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001). „Chronische Verlierer"- *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen besaßen eine GNA von ca. 9,1 µg (MW=9,1 µg; Median = 7,9 µg; IQA = 8,8 µg), die im Vergleich zu naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=6,9µg; Median=5,9µg; IQA=5,8µg) sogar erhöht war (Figur 13B, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, p=0,0471). Darüber hinaus besaßen „chronische Verlierer"-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=9,1 µg; Median = 7,9 µg; IQA = 8,8 µg) auch gegenüber „chronischen Verlierer"-CS-Fliegen (MW=2,7 µg; Median= 1,7 µg; IQA= 2,7 µg) eine deutlich erhöhte GNA (Figur 13C; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001). Ebenso zeigte sich innerhalb der „chronischen Verlierer"-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen, die ihren Testkampf verloren hatten, erneut eine signifikante Korrelation zwischen der GNA und der Anzahl an „lunges", die diese Fliegen bis zur ihrer ersten Aufgabe ertragen hatten (Figur 13D, Spearman's r= 0,458; p=0,0243).



Figur 13: Einfluss der d5-HT$_{1B}$-Suppression auf die GNA
A) d5-HT$_{1B}$-Suppression mittels RNA-Interferenz führte bei naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=6,9µg; Median=5,9µg; IQA=5,8µg) gegenüber naiven CS-Fliegen (MW=3,9µg; Median=2,6µg; IQA=4,0µg) zu einer signifikanten Steigerung der GNA (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001). B) Unter d5-HT$_{1B}$-Suppression bewirkte „chronic social defeat" eine signifikante Steigerung (MW=9,1 µg; Median = 7,9 µg; IQA = 8,8 µg) der GNA (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p=0,0471). C) Im Vergleich zu „chronischen Verlierer"-CS-Fliegen (MW=2,7 µg; Median= 1,7 µg; IQA= 2,7 µg) zeigten „chronische Verlierer"-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=9,1 µg; Median = 7,9 µg; IQA = 8,8 µg) eine signifikant höhere GNA (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; p<0,0001). D) Es bestand abermals eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl an „lunges", die die Verlierer während ihres Testkampfes ertrugen, und ihrer GNA (n=24; Spearman's r= 0,458; p=0,0243).

Analog zur SPR unterteilten wir die Gruppe der „chronischen Verlierer“-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen anhand ihres Resultats im Testkampf in Gewinner und Verlierer und verglichen diese beiden Gruppen mit naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen. Hierbei zeigten die Gewinner eine GNA von ca. 9,7 µg (MW=9,7µg; Median=8,4µg; IQA=9,7µg), während Verlierer eine GNA von ca. 8,5 µg aufwiesen (MW=8,5µg; Median=7,4µg; IQA=6,8µg). Im Vergleich der Gewinner, Verlierer und der naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=6,9µg; Median=5,9µg; IQA=5,8µg) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die GNA (Figur 14; Kruskal-Wallis-Test; p=0,122; Dunn’s Multiple Comparison Test nicht signifikant für alle beteiligten Gruppen).



Figur 14: Vergleich der GNA anhand des Resultats des Testkampfes.
Nach einer Aufteilung der „chronischen Verlierer“-*d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen in Gewinner und Verlierer, wurden diese beiden Gruppen zusammen mit naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen verglichen. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen Gewinnern (MW=9,7µg; Median=8,4µg; IQA=9,7µg), Verlierern (MW=8,5µg; Median=7,4µg; IQA=6,8µg) und naiven *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen (MW=6,9µg; Median=5,9µg; IQA=5,8µg) bezüglich der gesamten Nahrungsaufnahme (Kruskal-Wallis-Test; p=0,122; Dunn’s Multiple Comparison Test nicht signifikant für alle beteiligten Gruppen).

4. Diskussion

Den Abschluss der hier vorliegenden Arbeit soll nun eine ausführliche, dabei gleichsam kritische Diskussion und Interpretation des experimentellen Datensatzes bilden. Zu diesem Zweck sollen die wichtigsten Erkenntnisse, die aus unserem „chronic social defeat"-Model gewonnen wurden, detailliert dargelegt werden, während sowohl Limitierungen, als auch zukünftige Entwicklungsmöglichkeiten miteinbezogen werden sollen.

4.1. Das CSD-Modell im Kontext neurobiologischer Forschung

Das hier gewählte Modell des „chronic social defeat" stellt im Organismus der *Drosophila* eine Neuheit dar, beruht aber prinzipiell auf bereits etablierten Tiermodellen. Der Versuchsablauf mit einer sechstägigen Niederlagenserie gegen überlegene „bullies" und anschließender phänotypischer Testung anhand eines Testkampfes am siebten und einer SPA am achten Tag ist vor allem an die Arbeiten von Eric J. Nestler und Mitarbeitern angelehnt. Dessen Mausmodell folgt dem gleichen Aufbau, besitzt aber insgesamt eine zehntägige „chronic social defeat"-Periode, an die sich mehrere phänotypische Testungen anschließen (Krishnan et al. 2007). Hierbei wurden unterschiedliche depressionsähnliche Symptome getestet wie beispielsweise soziales Vermeidungsverhalten, Anhedonie (definiert als Verringerung der Saccharosepräferenz), Stress-induzierte Polydipsie, Temperaturerhöhung bei Sozialkontakten und zirkadiane Veränderungen. Diese Verhaltensänderungen wurden nicht nur am elften, sondern auch größtenteils nach einer eingeschobenen vierwöchigen Pause am 39. Versuchstag detektiert, was die Nachhaltigkeit des „chronischen Verlierer"-Phänotyps bestätigte. Die beschriebenen phänotypischen Veränderungen konnten jedoch nur bei ungefähr der Hälfte der „chronischen Verlierer" beobachtet werden, während die restlichen Mäuse keinerlei Auffälligkeiten zeigten. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass es innerhalb der gesamten Population sowohl „resistente" als auch „empfängliche" Mäuse gab, die jeweils unterschiedlich auf die Erfahrung wiederholter sozialer Niederlagen reagierten. Nur die „empfänglichen" Individuen reagierten demzufolge auf die „chronic social defeat"-Erfahrung mit der Entwicklung des „chronischen Verlierer"-Symptomkomplexes. Um „resistente" von „empfänglichen" Mäusen zu unterscheiden, behalf man sich eines bereits etablierten Experimentes, mit dem man soziales Vermeidungsverhalten quantifizieren kann. Hierbei positioniert man eine Maus in einen Raum, der aus zwei separaten, miteinander verbundenen Kammern besteht. In einer Kammer befindet sich bereits eine andere Maus, während die andere Kammer vollkommen leer ist. Während naive Mäuse ungefähr gleich viel Zeit in beiden

Kammern verbringen, vermeiden Mäuse nach „chronic social defeat“ die Gegenwart einer anderen Maus und ziehen sich vermehrt alleine in die zweite Kammer zurück. Anhand der Zeiten, die die jeweiligen Mäuse nach „chronic social defeat“ in einer der beiden Kammern verbrachten, konnte nun bestimmt werden, ob sich ihr Verhalten signifikant von naiven Kontrollen unterschied. Zeigte die „chronische Verlierer“-Maus ein deutliches Vermeidungsverhalten und verbrachte signifikant mehr Zeit alleine in einer der beiden Kammern, so wurde sie als „empfänglich“ eingestuft. Zeigte die „chronische Verlierer“-Maus keine Scheu vor der anderen Maus und verhielt sich ähnlich wie naive Mäuse ohne „chronic social defeat“-Erfahrung, so wurde sie als resistent klassifiziert.

Um ein „chronic social defeat“-Modell auch in *Drosophila melanogaster* etablieren zu können, musste dieser Versuchsablauf an den Organismus angepasst werden ohne dabei jedoch die grundlegenden Prinzipien des „chronic social defeat“-Paradigmas zu verändern. Da bereits durch unser eigenes Labor Aggressionsverhalten in *Drosophila* quantifizierbar nachgewiesen werden konnte und wir zudem nicht nur über ein robustes Modell zur Ausrichtung von Fliegenkämpfen, sondern auch durch meine Betreuerin Jill Penn mit den „bully“-Fliegen über einen hochaggressiven Fliegenstamm verfügten, stellte die Durchführung der „chronic social defeat“-Periode keine größeren Probleme dar (Certel and Kravitz 2012; Chen et al. 2002; Penn et al. 2010). Nachdem wir in ersten Testläufen bereits nach sechs Tagen verlorener Trainingskämpfe gegen die „bullies“ deutliche Verhaltensänderungen beobachten konnten, entschlossen wir uns die Anzahl der Kämpfe bzw. der Tage des „chronischen Verlierens“ von ursprünglich zehn auf sechs zu reduzieren. Dadurch wurde der Versuchsablauf verkürzt, was uns wiederum die Möglichkeit gab effizienter zu arbeiten und höhere Fallzahlen zu erreichen. Da jedoch kein Versuchsaufbau zur Messung von sozialem Vermeidungsverhalten in *Drosophila* bekannt ist, mussten wir eine andere Möglichkeit finden, um eventuell bestehende Unterschiede zwischen „empfänglichen“ und „resistenten chronischen Verlierern“ zu detektieren. Da der *Drosophila*-Organismus deutlich simpler als der Maus-Organismus ist und damit auch das Spektrum phänotypischer Testungen begrenzt ist, entschlossen wir uns die „Empfänglichkeit“ gegenüber „chronic social defeat“ am siebten Tag mithilfe eines Testkampfes gegen naive Fliegen des gleichen Alters, der gleichen Größe und des gleichen Genotyps zu testen. CS-Fliegen, die nach „chronic social defeat“ immer noch in der Lage waren, ihren Testkampf gegen einen ebenbürtigen Gegner am siebten Tag zu gewinnen, wurden von uns demzufolge als „resistent“ eingestuft, da ihr Aggressions- bzw. Kampfverhalten unserer Meinung nach keinen Schaden bzw. keine Abschwächung erfahren

hatte. Die Analyse und Einteilung der Verlierer erwies sich als deutlich komplexer, dennoch konnte hier mit der Anzahl an „lunges“ bis zur ersten Aufgabe ein verlässlicher Parameter gefunden werden. Waren CS-Fliegen nach „chronic social defeat“ immer noch in der Lage mindestens vier „lunges“ zu ertragen, so wurden sie als „resistent“ eingestuft, während diejenigen, die im Testkampf bereits nach drei oder weniger „lunges“ aufgegeben hatten, als „empfänglich“ definiert wurden. Darauf aufbauend suchten wir nach einer weiteren phänotypischen Testung, die uns eine genauere Charakterisierung des „chronischen Verlierer“-Phänotyps ermöglichen und im besten Falle die Einteilung in „empfängliche“ und „resistente“ Fliegen, wie sie von uns im Testkampf vorgenommen wurde, bestätigen würde. Da die meisten Symptome, die bei Mäusen durch „chronic social defeat“ ausgelöst wurden, für den *Drosophila*-Organismus zu komplex sind (Gewichtsverlust, Temperaturerhöhung bei Sozialkontakten, soziales Vermeidungsverhalten, Stress-induzierte Polydipsie, etc.) entschieden wir uns für Anhedonie als zweites phänotypisches Merkmal für „chronische Verlierer“. Da Nestler und Kollegen Anhedonie als Abnahme der Saccharosepräferenz definierten, benötigten wir ein verlässliches Instrument zur Messung der Nahrungs- bzw. Saccharoseaufnahme unserer Fliegen. Hierfür gibt es zahlreiche Alternativen, die auf verschiedenen Prinzipien basieren (Abbildung 19). Zunächst gibt es die klassische Methode, bei der man die Nahrung mithilfe von geschmacksneutralen Lebensmittelfarben anfärbt und sie den Fliegen über einen bestimmten Zeitraum zum Verzehr anbietet. Die Auswertung kann anschließend auf zwei Arten erfolgen. Zum einen kann man die Fliegen nach der Aufnahme der angefärbten Nahrung mithilfe von CO_2-Zufuhr kurzzeitig anästhetisieren und die Färbung des Abdomens mikroskopisch auswerten. Da das Abdomen der *Drosophila* sehr transparent ist, scheint die aufgenommene Nahrung durch das Abdomen hindurch und ist von außen recht gut erkennbar. Wird der Fliege beispielsweise rot und blau gefärbte Nahrung angeboten, so kann das Abdomen der Fliege je nach der Menge der aufgenommenen Nahrung in rötlichem, bläulichem oder lila Farbton erscheinen. Dementsprechend können mit dieser Technik lediglich grobe Aussagen darüber getroffen werden, welche Farbstoffe bzw. welche damit angefärbte Nahrung mehr oder weniger stark verzehrt wurde. Eine exaktere Quantifizierung der Nahrungsaufnahme erlaubt die spektrophotometrische Analyse, welche auch in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurde (siehe 2.5.1 und Abbildung 19A). Ebenso gibt es eine Variation dieses Ansatzes, bei der die Nahrung nicht mit Lebensmittelfarbstoffen, sondern mit radioaktiven Tracern (vor allem ^{14}C-Atome) markiert wird (Abbildung 19B). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Fliegen im Gegensatz zur Farbstoff-basierten Versuchsanordnung nicht durch Anwendung eines Mörsers homogenisiert werden müssen. Sie

müssen lediglich durch Platzierung in eine Kühlkammer abgekühlt werden, um ihren Metabolismus zu stoppen, und anschließend kann mithilfe von Gamma-Kameras der Beta-Zerfall der ^{14}C-Atome und damit auch die aufgenommene Nahrungsmenge quantifiziert werden.

Des Weiteren gibt es die videogestützte Analyse der Rüsselextension der Fliege (englisch: „Proboscis Extension"=PE). Basierend auf vorher ermittelten Schätzungen wie viel Nahrung eine Fliege mit einer einzelnen Extension ihres Saugrüssels aufnehmen kann, wird über eine bestimmte Zeit die Fliege mit einer hochauflösenden Kamera seitlich gefilmt und dabei gezählt wie oft die Fliege mit ihrem Rüssel an der Nahrung saugt (Abbildung 19C). Addiert man die einzelnen Saugvorgänge zusammen, so kann man die insgesamt aufgenommene Nahrungsmenge abschätzen. Dieses Verfahren erschien uns jedoch weniger attraktiv, da es für jede einzelne Fliege einen separaten Versuchsaufbau mit Käfig und Kamera benötigt und somit für die gleichzeitige Analyse von 25-30 Fliegen, wie sie von uns praktiziert wurde, ungeeignet ist. Des Weiteren ist auch nicht eindeutig validiert, ob eine Rüsselextension stets mit Nahrungsaufnahme verbunden ist bzw. inwiefern die Nahrungsaufnahme pro Extension variiert. Eine weitere Methode wäre das sogenannte CAFE-Assay (Capillary Feeder) gewesen (Abbildung 19D). Dieses gilt aktuell als das verlässlichste und sensitivste Instrument zur genauen Messung der Nahrungsaufnahme. Hierbei werden zylinderförmige Kapillaren (5µl-Mikropipetten) mit flüssiger Nahrung gefüllt. Die Kapillaren sind am unteren Ende geöffnet, sodass die Fliegen die Möglichkeit haben dort mit ihrem Rüssel zu saugen und Nahrung aufzunehmen. Nach einer bestimmten Zeit wird dann gemessen, wieviel von der ursprünglich eingefüllten Nahrung noch verblieben ist und wieviel dementsprechend von der Fliege verzehrt wurde. Ebenso werden weitere Faktoren wie Verdunstung der Kapillarflüssigkeit in die Berechnung mit einbezogen, sodass ein durchaus komplexes, aber sehr exaktes Messverfahren entsteht. Gerne hätten wir auch dieses Verfahren für unser „chronic social defeat"-Modell verwendet, jedoch verfügte unser Labor zum damaligen Zeitpunkt nicht über die finanziellen Mittel, um die benötigten Gerätschaften zu erwerben. Selbst für den Fall, dass eine Anschaffung des CAFE-Equipments möglich gewesen wäre, hätten sich zudem neue Probleme ergeben. Allen voran ist hier zu nennen, dass man für das CAFE-Assay flüssige Nahrung benötigt – meistens bestimmte Zuckerarten, Medikamente oder spezielle Suchtstoffe wie Alkohol, die allesamt wasserlöslich sein müssen – was sich mit unserem Experiment nicht vereinbaren ließ. Wir wollten den Fliegen die Möglichkeit zwischen herkömmlicher Fliegennahrung und gesüßter Nahrung geben, wobei es sich in beiden Fällen um feste

Substanzen handelt, die sich nur unter Hitze für wenige Minuten verflüssigen und nur dann die Beimischung von zusätzlichem Zucker zulassen. Vor allem diese Einschränkung ließ das CAFE-Assay weniger attraktiv für unsere Verwendung erscheinen. Somit waren wir mit der Wahl der Spektrophotometrie-basierten SPA durchaus zufrieden und hatten einen guten Kompromiss zwischen finanziellem Aufwand und experimenteller Qualität gefunden (Vergleichende Übersicht aller erwähnten Methoden: Deshpande et al. 2014).

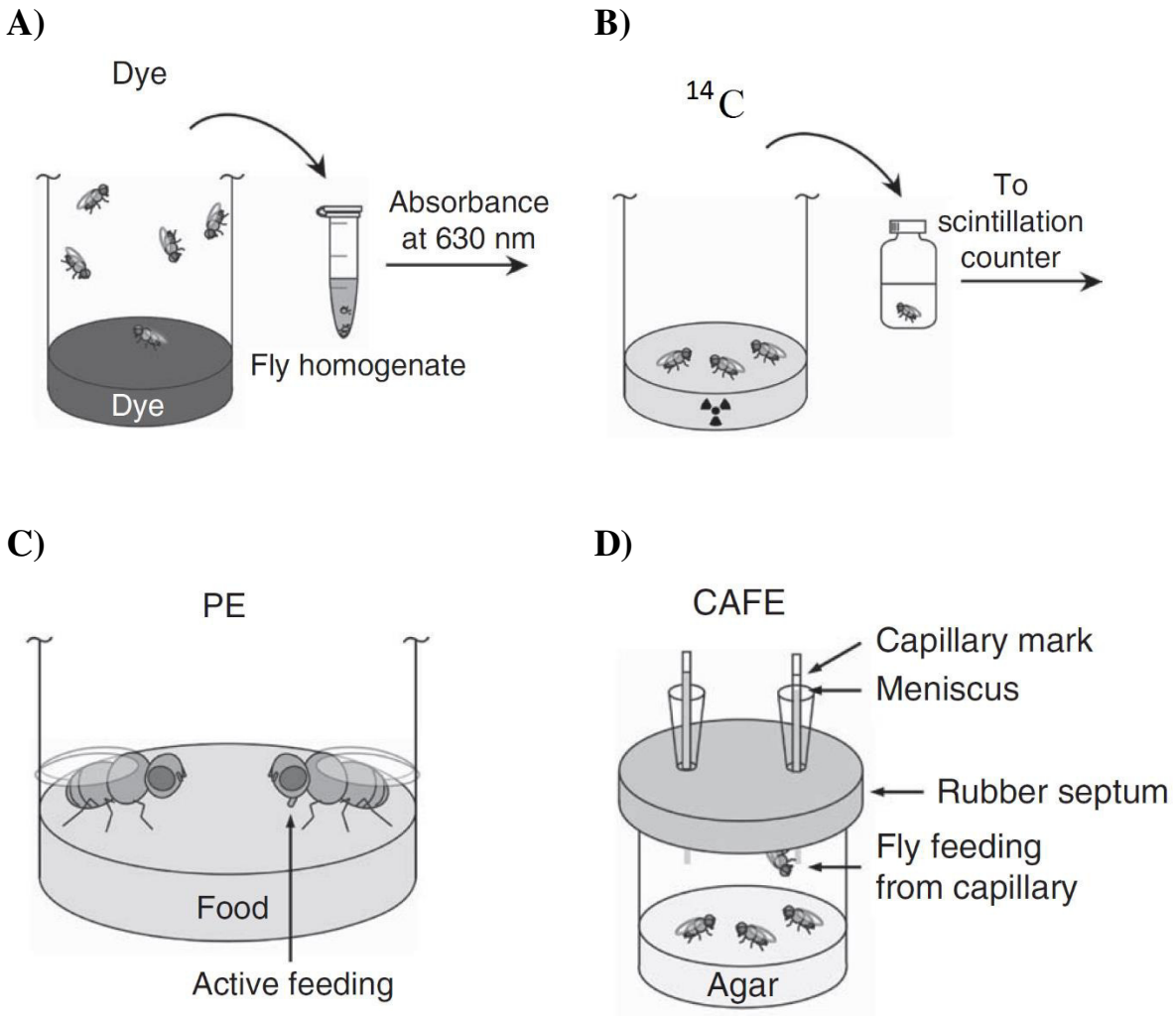


Abbildung 19: Quantifizierungsmethoden der Nahrungsaufnahme von Drosophila melanogaster
A) Messung mittels Spektrophotometrie. B) Messung mithilfe radioaktiv markierter (^{14}C) Nahrung. C) PE-Assay („Proboscis-Extension“, dt. Rüsselextension) D) CAFE-Assay. (modifiziert nach Deshpande et al. 2014)

4.2. Gibt es depressive *Drosophila*?

Die Ergebnisse, die wir mit unserem „chronic social defeat“-Experiment zu Tage fördern konnten, waren zumindest teilweise sehr überraschend. Bezüglich des Testkampfes lässt sich sagen, dass es bereits Evidenz dafür gab, dass schon eine einzelne Niederlage das Kampfverhalten von Fliegen negativ beeinflusst und eine weitere Niederlage in einem nachfolgenden Kampf wahrscheinlicher macht (Penn et al. 2010; Yurkovic et al. 2006). Jedoch wurden hierbei stets Zeitspannen von maximal 30 Minuten zwischen der ursprünglichen Niederlagenerfahrung und dem zweiten Kampf verwendet. Das hier vorgestellte „chronic social defeat“-Modell ist demnach im Hinblick auf zwei Aspekte ein Novum. Zum einen ist es der erste Ansatz, der nicht den Effekt eines einzelnen verlorenen Kampfes, sondern einer ganzen Niederlagenserie verteilt auf sechs Tage untersucht. Zum anderen übertrifft der Effekt von „chronic social defeat“ auf das Kampfverhalten in seiner Dauer die bisherigen Aggressionsmodelle in *Drosophila*, da sowohl am siebten als auch am 13. Tag des Protokolls – also ca. 24 Stunden bzw. sieben Tage nach der letzten Niederlage gegen die „bullies“ – eine signifikante Abschwächung des Kampfverhaltens beobachtet werden konnte (siehe 3.1.1).

Während in Bezug auf die Aggression vor allem die Dauer und Stabilität der ausgelösten Verhaltensänderungen hervorsticht, sind die Ergebnisse der SPA in ihrer Gesamtheit ein neues und in seiner Komplexität bisher noch nicht beobachtetes Verhalten. Dass *Drosophila* zu einem Verhalten in der Lage sind, das über simple olfaktorische oder aggressionsbezogene Modelle hinausgeht, zeigt beispielsweise die Arbeit von Ulrike Heberlein und Kollegen. Diese Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass bei männlichen *Drosophila* sexuelle Deprivation (in diesem Fall mehrfache Ablehnung durch ein Weibchen, das sich bereits vorher mit einem anderen Männchen gepaart hatte) zu einem nachfolgend erhöhten Alkoholkonsum führt (Shohat-Ophir et al. 2012). In ähnlicher Weise erstaunlich ist auch die Tatsache, dass wir mit unserem „chronic social defeat“-Modell in der Lage waren eine Verringerung der Saccharosepräferenz auszulösen (siehe 3.1.2). Dieser Phänotyp wurde von Eric Nestler ein wenig optimistisch bereits als Anhedonie bezeichnet, jedoch sollte man sich davor hüten einen solchen Begriff allzu leichtfertig zu verwenden. Indem wir beginnen ihn im Kontext von *Drosophila*-Forschung zu diskutieren, stoßen wir auf grundlegende Fragen, die wir noch nicht eindeutig beantworten können. Die erste hiervon wäre, ob man im Zusammenhang mit *Drosophila* überhaupt von Depression bzw. depressionsähnlichen Symptomen sprechen kann. Schon Eric Nestlers Depressionsmodell in Mäusen ist eine hochgradig abstrahierte Emulation

der menschlichen Depression, die nahezu die gesamte emotionale Komponente der menschlichen Depression außer Acht lässt bzw. auf simplifizierte Symptome abstrahiert (soziale Vermeidung, Gewichtsverlust, Veränderungen der zirkadianen Rhythmik). Emotionen wie Hilflosigkeit, ein überzogen negatives Bild von sich selbst, der Situation und der Zukunft, sowie weitere wichtige Gefühlszustände, die allesamt ganz elementare Bestandteile der menschlichen Depression sind, werden hierbei nicht eingeschlossen. Darüber hinaus ist das „chronic social defeat"-Modell konzeptionell eine Mischung aus der Theorie der „erlernten Hilflosigkeit" und dem alten Modell der reaktiven Depression. Das Konzept der „erlernten Hilflosigkeit" beruht auf der Annahme, dass wiederholtes Erleben von Situationen, die mit dem Gefühl von Hilf- und Machtlosigkeit verbunden sind, letztendlich zu kognitiven motivationalen und emotionalen Defiziten führen, die für die Entstehung einer Depression prädisponierend sein können. Im Tiermodell wurde die „erlernte Hilflosigkeit" bereits an zahlreichen Organismen wiederholt nachgewiesen und fand insbesondere im Mausmodell mit dem „tail suspension test" und dem „forced swim test" zwei überaus populäre und heute immer noch einflussreiche experimentelle Anwendungsmethoden. Im Menschen wird das Konzept der „erlernten Hilflosigkeit" vor allem dann als depressionsfördernder Mechanismus angesehen, wenn bestimmten aversiven Erlebnissen bzw. negativen Erfahrungen im Leben mit einem charakteristischen Attributionsstil begegnet wird. Hierbei sind vor allem jene Individuen für die Entwicklung einer Depression prädisponiert, die einen internen, globalen und stabilen Attributionsstil aufweisen. Diese Individuen sehen in sich selbst die Ursache des Problems (intern) und betrachten das Problem als allgegenwärtig (global) und als unveränderbar (stabil). Dieses Modell wurde im Tierorganismus vielfach validiert und hat sich auch als psychologisches Konstrukt zur Diagnostik und Therapie der klinischen Depression bewährt (Vollmayr and Gass 2013). Dennoch gilt zu bemerken, dass das Modell der „erlernten Hilflosigkeit" zwar ein sehr einflussreiches, aber dennoch insgesamt nur eines von zahlreichen weiteren Erklärungsmodellen der Depression ist. Dementsprechend sind auch alle Tiermodelle, die auf diesem Konzept basieren, in ihrer Aussagekraft dahingehend eingeschränkt, da sie sich recht spezifisch auf die ätiologische Prämisse der wiederholten, negativen Erfahrungen als Ursachen depressiver Syndrome stützen. Andererseits handelt es sich bei dem „chronic social defeat"-Modell ebenfalls um eine abstrahierte Form der sogenannten reaktiven Depression. Dies ist eine mittlerweile veraltete Diagnose aus dem ICD-9, die eine Depression nach nosologischen Kriterien definierte. Hierbei handelte es sich um Menschen, die aufgrund eines klar definierbaren äußeren Auslösers, eines ganz bestimmten niederschmetternden Lebensereignisses oder einer überaus negativen Lebenserfahrung eine depressive Störung

entwickelt hatten. Dem gegenüber standen die sogenannten endogenen Depressionen, für die zunächst keine klare biographische Ursache gefunden werden konnte und deren Ursprung dementsprechend in der Psyche des Menschen selbst vermutet wurde. Diese Einteilung wurde im ICD-10 bzw. im DSM-V aufgegeben, sodass man nur noch von depressiven Episoden bzw. rezidivierenden depressiven Störungen spricht. Somit erfolgt die Diagnose nicht mehr in erster Linie nach ätiologischen Kriterien, sondern vielmehr im Sinne einer zeitlichen Einordnung ohne dabei jedoch die genauen Ursachen mit einzubeziehen. Dies spiegelt den aktuellen Wissensstand der Depressionsforschung wieder, da die depressive Störung heutzutage als multifaktorieller Prozess angesehen wird, der sowohl auf bestimmten genetischen und biochemischen Vorprägungen und Prädispositionen des jeweiligen Menschen beruht als auch maßgeblich vom psychosozialen Umfeld und von der Biographie des Individuums abhängt (Härter 2012). Somit wird ersichtlich, dass es sich bei den sogenannten „chronic social defeat"-Modellen um Konstrukte handelt, die theoretisch sehr spezifisch auf einer bestimmten Theorie fußen („erlernte Hilflosigkeit") und die im Sinne der Emulation einer reaktiven Depression nur einen kleinen Ausschnitt der menschlichen Depression abbilden. Sie sind somit nicht in der Lage die multifaktorielle Natur der menschlichen Depression zu erfassen. Darüber hinaus gilt auch noch zu bemerken, dass sich die überwiegende Mehrheit aller „chronic social defeat"-Modelle ebenso wie die hier vorgelegte Arbeit auf männliche Versuchssubjekte beschränkt (bspw. Krishnan et al. 2007; Morrison et al. 2013; Perez-Tejada et al. 2013; Venzala et al. 2012). Da jedoch gerade die depressive Störung des Menschen bei Frauen in etwa doppelt so häufig vorkommt wie bei Männern (siehe 1.2), erscheint es als ein ganz wesentlicher Makel, dass es bis auf wenige Ausnahmen keine weiblichen Tiermodelle dieser Erkrankung gibt (thematisiert in: Jacobson-Pick et al. 2013). Der Mangel an weiblichen Versuchssubjekten wirft dementsprechend ein weiteres Mal die Frage nach der Aussagekraft dieser Modelle im Kontext der menschlichen Depression auf, da man Ergebnisse, die fast ausschließlich an männlichen Tieren generiert wurden, auf ein Patientenkontingent zu übertragen versucht, das prädominant weiblich ist. Natürlich ist dies den jeweiligen Arbeitsgruppen vollkommen bewusst, denn die Entscheidung sich auf die erlernte Hilflosigkeit und die damit verbundenen experimentellen Paradigmen sowie auf vornehmlich männliche Versuchssubjekte zu beschränken, hat in erster Linie pragmatische Gründe. Zum einen ist die kognitive Leistungsfähigkeit der verwendeten Laborорganismen deutlich geringer als die des Menschen. Zum anderen lässt sich Aggression und Kampfverhalten in Bezug auf Territorien oder anderweitige Anreize (Weibchen, Nahrung) meistens nur bei männlichen Individuen auslösen und evaluieren. Nichtsdestotrotz liefern diese Modelle vor allem im Bereich der biochemischen und physiologischen Mechanismen der

depressiven Störung hilfreiche Erkenntnisse und sind deshalb für die heutige psychiatrische Grundlagenforschung von enormer Relevanz. Gerade im Kontext der aktuellen Forschung, die sich zunehmend mit der neurobiologischen und genetischen Komponente der depressiven Störung befasst, entwickeln die abstrahierten Tiermodelle eine neue Bedeutung. Im Vordergrund stehen nun weniger die auslösenden Faktoren, sondern vielmehr die physiologischen, neurobiologischen und auch genetischen Adaptierungsvorgänge, die man bei den jeweiligen Tieren nach negativen sozialen Erfahrungen beobachten kann. Akzeptiert man also die Tatsache, dass die komplexe Ätiologie und auch die emotionale Komponente der menschlichen Depression in Tiermodellen nicht zufriedenstellend abgebildet werden kann und fokussiert sich hingegen auf die neurophysiologische, biochemische und genetische Aussagekraft des Tiermodells, so wird ersichtlich, dass Tiermodelle auch in der Zukunft ein valides Modell zur Erforschung depressiver Störungen sein werden.

4.3. Kritische Betrachtung der Methodik

Die von uns verwendete Form eines solchen „chronic social defeat“-Modells stellt in seiner Art eine Neuheit in der *Drosophila*-Forschung dar und soll deshalb an dieser Stelle eingehender kritisch betrachtet werden. Wie bereits geschildert, müssen in unserem Versuchsaufbau Canton S-Fliegen eine sechstägige Niederlagenserie gegen hochaggressive „bully“-Fliegen durchlaufen, die in ihrer Dauer und in ihrer Intensität bisher bekannte Aggressionsexperimente deutlich übertrifft. Darin liegt einerseits die Chance das erste stabile und robuste „erlernte Hilflosigkeit“-Modell in *Drosophila* zu etablieren. Andererseits besteht auch die Gefahr, etwaige Verhaltensänderungen auszulösen, die über unsere phänotypischen Testungen hinausgehen und eventuell nicht detektiert werden können. Somit steht durchaus die Möglichkeit eines Confounding im Raum, die kritisch berücksichtigt werden muss.

Zunächst sollen die verwendeten „bully“-Fliegen, sowie die damit verbundene große Anzahl an Kämpfen in der „chronic social defeat“-Phase näher betrachtet werden. Die Kämpfe gegen die „bullies“ wurden von uns in Abgrenzung zum Testkampf am siebten Tag als sogenannte Trainingskämpfe bezeichnet. Die CS-Fliegen wurden zu Beginn des Experimentes ausgewählt und als „chronische Verlierer“ über den gesamten Verlauf des „chronic social defeat“-Versuches verwendet, sofern sie alle sechs Kämpfe gegen die „bullies“ verloren hatten. Für die einzelnen Trainingskämpfe trat eine CS-Fliege jeden Tag gegen eine andere „bully“-Fliege an, um einem eventuellen Gewöhnungs- oder Wiedererkennungseffekt an den „bully“ vorzubeugen, der bei Fliegen durchaus bekannt ist (Yurkovic et al. 2006). Der „bully“-Stamm ist ein, von meiner Betreuerin Jill Penn gezüchteter, hochaggressiver Fliegenstamm, der durchschnittlich ca. 94% seiner Kämpfe gegen CS-Fliegen gewinnt (Penn et al. 2010). Jedoch lässt sich nicht ausschließen, dass es auch innerhalb des „bully“-Stammes phänotypische Unterschiede gibt und bestimmte Fliegen möglicherweise bessere oder schlechtere Kämpfer sind. Außerdem handelt es sich hierbei um einen noch sehr neuen Fliegenstamm, der erst 2010 veröffentlicht und bis jetzt auch nur in der Publikation von Jill Penn verwendet wurde. Dementsprechend ist es durchaus möglich, dass die CS-Fliege, die gegen sechs solcher „bullies“ kämpfen muss, nicht immer auf gleichermaßen überlegene Gegner trifft. Der Spielraum für interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen „bullies“ ist durchaus gegeben, sodass man eine konstant gleichbleibende Überlegenheit der „bullies“ gegenüber den CS-Fliegen und damit sechs Kämpfe bzw. Niederlagen mit gleicher Intensität nicht vollends garantieren kann. Jedoch waren die „bullies“ für uns das beste verfügbare Mittel, um den CS-

Fliegen effizient Niederlagen zuzufügen und die daraus entstehenden Verhaltensänderungen zu quantifizieren. Wir sortierten CS-Fliegen bereits nach dem ersten Sieg bzw. der ersten nicht eindeutigen Niederlage gegen einen „bully“ aus, sodass zumindest diejenigen „bullies“, die anscheinend doch nicht aggressiv genug waren und die gegnerische CS-Fliege nicht besiegen konnten, keinen relevanten Einfluss auf unser „chronic social defeat“-Experiment hatten.

Betrachtet man nun die CS-Fliegen, so erkennt man auch hier im Verlauf des Experimentes einige potentielle Schwachstellen, die diskutiert werden müssen. Wiederum steht hier die hohe Anzahl an durchgeführten Kämpfen im Vordergrund. Ein einzelner Kampf zwischen zwei männlichen Fliegen ist in seiner Methodik bereits in zahlreichen Publikationen verwendet worden und dementsprechend als häufig durchgeführtes Experiment in der D*rosophila*-Forschung etabliert (Zwarts et al. 2012). Dahingegen nimmt die Variabilität des Kampfverhaltens mit zunehmender Anzahl der Kämpfe zu. Wir kontrollierten während der „chronic social defeat“-Phase stets ob die CS-Fliegen ihre Kämpfe gegen die „bullies“ eindeutig verloren hatten. Jedoch führten wir keine genauere Analyse der Kämpfe gegen die „bullies“ im Sinne Messung der Anzahl an „lunges“ vor der ersten Aufgabe durch. Es könnte also durchaus sein, dass im Laufe der Trainingskämpfe bereits Veränderungen des Kampfverhaltens der CS-Fliegen stattfinden, die eine stetig sinkende Kampfbereitschaft der CS-Fliegen zur Folge haben. Dementsprechend würde auch die Intensität der Kämpfe gegen die „bullies“ abnehmen und letztendlich wären aufgrund dessen die sechs Kämpfe gegen die „bullies“ bzw. die sechs Niederlagen nicht von gleichbleibender Intensität. Solange dies jedoch bei allen CS-Fliegen in gewissem Maße konsistent verläuft, würde dies kein weiteres Problem darstellen. Komplizierter wird die Situation, wenn die interindividuellen Unterschiede im Kampfverhalten im Laufe der sechs Trainingstage zu groß werden. Denkbar wäre beispielsweise, dass eine CS-Fliege bereits durch die erste Niederlage gegen einen „bully“ massiv beeinflusst wird und in den folgenden fünf Tagen nur noch mit sehr geringer Intensität gegen die „bullies“ kämpft, stets extrem früh aufgibt und somit keine allzu intensiven Niederlagen mehr erfährt. Somit hätte sie prinzipiell nur eine „große“ Niederlage am ersten Tage erlebt und dann die nächsten fünf Kämpfe äußerst passiv und ohne größere Kampfbereitschaft geführt. Eine andere Fliege wiederum könnte nach der ersten Niederlage nur eine geringe Aggressionsreduktion erfahren haben und somit in den folgenden Kämpfen mit einer nur langsam sinkenden Intensität gegen die „bullies“ angetreten sein. Somit wäre es vorstellbar, dass ihr Kampf- bzw. Aggressionsverhalten graduell im Laufe der sechs Trainingstage abnimmt und sie am siebten Tag im Testkampf gegen eine naive CS-Fliege ein

ähnlich schwaches Kampfverhalten wie die vorher beschriebene Fliege zeigt, obwohl beide eine vollkommen andere Entwicklung in den sechs Trainingstagen durchlaufen haben. Nach unserem Versuchsaufbau unterteilten wir die „chronischen Verlierer"-Fliegen allein aufgrund des Ausganges des Testkampfes und der dabei ertragenen Anzahl an „lunges" in „resistente" und „empfängliche" Fliegen. Aufgrund des ansonsten zu hohen Arbeitsaufwandes beschränkten wir uns darauf, Gewinner und Verlierer der Trainingskämpfe zu erfassen, ohne dabei jedoch mögliche Veränderungen im Kampfverhalten der beteiligten Fliegen zu quantifizieren. Dies könnte in dem angeführten Beispiel dazu führen, dass beispielsweise beide genannten Fliegen als „empfänglich" bezeichnet werden, obwohl sie während der Niederlagenserie gegen die „bullies" vollkommen unterschiedliche Entwicklungen durchlaufen haben. Die Fliege mit der graduellen Aggressionsminderung erscheint „resistenter" gegenüber sozialen Niederlagen als die Fliege, die bereits nach der ersten Niederlage den Großteil ihrer Kampffähigkeit bzw. -bereitschaft eingebüßt hat, jedoch ist unser gegenwärtiges Protokoll nicht sensitiv genug, um diese Unterschiede zu erfassen. Um für diese Variabilität zu kontrollieren bleibt keine andere Möglichkeit als die Fliegen schon während der Trainingskämpfe gegen die „bullies" genau zu beobachten und die einzelnen Kämpfe in gleicher Weise bezüglich Ausgang und Anzahl der „lunges" zu analysieren wie den Testkampf. Da dies von uns jedoch nicht durchgeführt wurde, lassen sich lediglich einige Überlegungen bezüglich des Verhaltens der Fliegen während der Trainingstage anstellen. Man weiß, dass bereits eine einzelne Niederlage das Kampfverhalten von CS-Fliegen, aber auch von „bully"-Fliegen massiv verändern kann und die Fliegen nachfolgende Kämpfe mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit verlieren als vorher (Penn et al. 2010; Yurkovic et al. 2006). Hierbei wurden jedoch, wie bereits erwähnt, die nachfolgenden Kämpfe stets 30 Minuten nach der initialen Niederlage durchgeführt und nicht wie in unserem Fall 24 Stunden danach. Somit bleibt es offen, ob eine Niederlage gegen einen „bully" den Kampf am darauffolgenden Tag gegen einen weiteren „bully" beeinflusst. Durch diese Überlegungen ergeben sich direkt mehrere Fragen zur „chronic social defeat"-Erfahrung. Löst eventuell bereits die erste Niederlage gegen einen „bully" eine Verhaltensänderung aus, die sich auf den zweiten Trainingskampf auswirkt und somit die Fliege in eine Art „Teufelskreis" führt, bei der jeder verlorene Trainingskampf eine weitere Niederlage wahrscheinlicher macht und der „chronische Verlierer" die Trainingskämpfe immer früher verliert? Führt bereits die erste Niederlage gegen einen „bully" zu einer solchen Aggressionsminderung, dass die nächsten Trainingskämpfe in ihrer Intensität so drastisch gesenkt sind, dass sie mit dem ersten verlorenen Kampf gar nicht mehr vergleichbar sind? Oder liefern die CS-Fliegen konstant über

die sechs Tage hinweg ungefähr gleichbleibende bzw. nur langsam abfallende Kampfleistungen gegen die „bullies“ ab, die in ihrer Summe und Dauer eine Änderung des Kampfverhaltens bewirken, die sich in ihrer vollen Ausprägung erst am siebten Tag gegen einen vermeintlich gleichstarken Gegner (naive CS, gleiches Alter, gleiche Größe) bemerkbar macht? Daraus ergibt sich wiederum die Frage, ob es für alle Fliegen jeweils nur einen der beiden Verläufe gibt oder ob interindividuelle Unterschiede zwischen den Fliegen bestehen. Letztendlich könnte dies dazu führen, dass die Fliegen schon während der „chronic social defeat“-Phase sehr unterschiedliche Erfahrungen machen und eine komplett unterschiedliche Entwicklung durchlaufen. Dies würden wir gerne in nachfolgenden Experimenten adressieren, bei denen wir nicht nur die Resultate der Testkämpfe, sondern auch schon das Kampfverhalten gegen die „bullies“ als Grundlage für eine detailliertere Unterscheidung in „resistente“ und „empfängliche“ Fliegen nutzen möchten. Vorteilhaft wäre hierbei die zusätzlich gewonnene zeitliche Dimension, da man durch insgesamt sieben ausgewertete Kämpfe pro Fliege (sechs Trainingskämpfe, ein Testkampf) einen klareren Überblick über den zeitlichen Verlauf der Aggressionsminderung gewinnen könnte. Ebenfalls könnte man eventuelle kritische Zeitpunkte ausfindig machen an denen sich die „resistenten“ von den „empfänglichen“ Individuen anfangen zu unterscheiden und in unterschiedliche Richtungen entwickeln.

Darüber hinaus muss auch die Einteilung in „resistente“ und „empfängliche“ Fliegen kritisch betrachtet werden. Wie bereits in Abschnitt 3.2 dargestellt, nutzen wir eine kumulative Häufigkeitsverteilung von ertragenen „lunges“ vor der ersten Aufgabe von CS-Fliegen zur Erstellung eines Cut-Offs für die Einteilung der „chronischen Verlierer“, die ihren Testkampf verloren hatten. Da es sich um eine erste explorative Analyse von möglicherweise vorhandenen „empfänglichen“ und „resistenten“ Subpopulationen handelte und wir somit den Fokus vor allem auf eine hohe Sensitivität legen wollten, legten wir das Fehlerniveau auf 10% fest. Somit gelangten wir zu einem Entscheidungsalgorithmus, der alle „chronischen Verlierer“-Fliegen, die ihren Testkampf nach 3 oder weniger „lunges“ aufgegeben hatten, als „empfänglich“ und alle anderen als „resistent“ klassifizierte. Das Fehlerniveau auf 10% zu legen ist in diesem Falle als durchaus legitim anzusehen, jedoch sollte im weiteren Verlauf und vor allem bei nachfolgenden Untersuchungen versucht werden einen strengeren Unterscheidungsalgorithmus mit einem Fehlerniveau von maximal 5% zu etablieren. Ein wichtiger Grund dieses recht hohe Fehlerniveau zu verwenden war die geringe Stichprobenzahl der CS-Fliegen, anhand derer wir die Anzahl an „lunges“ vor der ersten Aufgabe berechneten. Mit einer Stichprobenzahl von lediglich 24 gelangten wir in unserer kumulativen Darstellung

der Häufigkeitsverteilung von „lunges“ vor der ersten Aufgabe zu einer recht geringen Auflösung wie sich anhand von Figur 5 zeigen lässt. Es gab lediglich eine CS-Fliege, die bereits nach einem „lunges“, die Flucht ergriffen hatte, keine CS-Fliege, die nach zwei „lunges“ aufgegeben hatte und wiederum nur eine CS-Fliege, die nach 3 „lunges“ geflüchtet war. Aufgrund dieser geringen Auflösung betrug bereits für einen ertragenen „lunge“ ebenso wie für zwei ertragene „lunges“ vor der ersten Aufgabe die kumulative Häufigkeit 4,2%. Ein Fehlerniveau von 5% auf diese Werteverteilung anzusetzen wäre also zu konservativ für die vorhandenen Daten der CS-Fliegen gewesen, da man hierbei von der Grundgesamtheit der CS-Fliegen letztlich den Wert einer einzigen Fliege als Grundlage für den Entscheidungsalgorithmus verwendet hätte. Somit wählten wir mit 10% ein etwas höheres Fehlerniveau, um uns in gewisser Weise an die vorhandenen Daten anzupassen und zumindest die Werte von zwei Fliegen als untere Grenze für unseren Entscheidungsalgorithmus zu verwenden. Letztlich muss aber konstatiert werden, dass es für die Qualität der Experimente und die Robustheit des Entscheidungsalgorithmus sehr förderlich gewesen wäre, wenn man die Stichprobenanzahl der CS-Fliegen erhöht hätte und dann eine kumulative Häufigkeitsverteilung der beobachteten „lunges“ vor der ersten Aufgabe zur Berechnung des Entscheidungsalgorithmus verwendet hätte. Dies konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, sollte jedoch bei Folgeprojekten dringend eingeplant werden. Dass trotz dieses durchaus kritikwürdigen Entscheidungsalgorithmus dennoch in sich schlüssige Resultate beim Vergleich der „empfänglichen“ und „resistenten“ Fliegen zu Vorschein traten, wobei insbesondere auch die bereits vorher festgestellte Kopplung von Kampf- und Essverhalten der Fliegen bestehen blieb, kann als Hinweis für die Robustheit der ermittelten Daten angesehen werden.

Ebenso wie die vorausgegangene „chronic social defeat“-Phase und der Testkampf, muss auch die Saccharosepräferenzanalyse (SPA) kritisch betrachtet werden. Wie bereits in Abschnitt 4.1 erwähnt, haben wir uns für eine Spektrophotometrie-basierte Analyse der Nahrungsmittelaufnahme der Fliegen entschieden. Diese ist bereits ausreichend etabliert und wird häufig verwendet (Dus et al. 2011; Vermehren-Schmaedick et al. 2011; Wong et al. 2009). Jedoch ist hierbei zu bemerken, dass wir den Versuchsaufbau an einigen wichtigen Stellen verändert haben, die durchaus diskussionswürdig sind. Generell handelt es sich bei unserer SPA um ein sogenannten „two-choice“-Experiment, das den Fliegen die Wahl zwischen zwei Nahrungsmischungen gibt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Publikationen haben wir jedoch nicht Agarose als Basis für die Nahrungsmischungen verwendet, sondern

herkömmliche Fliegennahrung. Zu dieser haben wir anschließend den jeweiligen Farbstoff und je nach Versuchsanordnung zusätzliche Saccharose hinzugegeben. Der Grund hierfür lag darin, dass wir im Gegensatz zu anderen Versuchsgruppen den Fliegen nicht die Wahl zwischen verschiedenen Arten von Zuckern geben wollten, sondern ihnen im Sinne des Anhedonie-Ansatzes von Eric Nestler normale Nahrung und gesüßte Nahrung anbieten wollten. Zunächst führten wir auch Experimente auf Agarosebasis durch (Agarose + Farbstoff vs. Agarose + Farbstoff + Saccharose), jedoch zeigte sich bei naiven CS-Fliegen, dass diese ausnahmslos die saccharosehaltige Agarosemischung verzehrten und die Agarose ohne Zucker gänzlich mieden. Wir wollten jedoch eine Anhedonie-Symptomatik in dem Sinne simulieren, dass wir der Fliege neben der Nahrung, die sie bereits tagtäglich in ihren Standardgefäßen zu sich nimmt, eine süßere Variante präsentieren. Dahinter stand die Absicht, die Präferenz der Fliege für die süße Nahrung gegenüber der normalen Nahrung mithilfe eines Quotienten – in diesem Falle die Saccharosepräferenzratio (SPR) – zu quantifizieren. Da die naiven CS-Fliegen Agarose im Reinzustand vollkommen meiden und in Mengen zu sich nehmen, die so gering sind, dass sie spektrophotometrisch nicht mehr detektierbar sind, wäre uns die Möglichkeit der Berechnung eines solchen Quotienten bei Verwendung von Agarose nicht mehr gegeben. Damit würde uns ein wichtiger Parameter fehlen und wir würden uns auch von unserem ursprünglichen Paradigma aus Eric Nestlers Arbeit entfernen. Dementsprechend fassten wir den Entschluss anstatt der Agarose herkömmliche Fliegennahrung als Basis für unsere Versuche zu verwenden. Da die Fliegennahrung bereits über einen recht hohen Zuckeranteil verfügt (siehe Zusammensetzung der Fliegennahrung in 2.1.1), ist diese Mischung an sich schon sehr attraktiv für *Drosophila* und wird von ihnen gerne verzehrt. Als Alternative gaben wir ihnen zusätzlich eine noch süßere Mischung, die über den doppelten Zuckergehalt verfügte und bestimmten anschließend die Präferenz der naiven Fliegen für die süßere Nahrung. Hierbei zeigte sich, dass unsere Adaption des Versuches sinnvoll war, da die Fliegen beide Nahrungsmischungen verzehrten, jedoch die süße Nahrung klar bevorzugten. Dies steht im Einklang mit einer bereits beschriebenen starken Präferenz von Fruchtfliegen für süße Stoffe bzw. verschiedene Zuckerarten (Hodoniczky et al. 2010). Folglich erhielten wir in der spektrophotometrischen Auswertung ausreichend hohe Signalstärken für beide verwendeten Farbstoffe und waren in der Lage das Essverhalten der Fliegen mithilfe der SPR mit hoher Genauigkeit zu quantifizieren.

Darüber hinaus nahmen wir aus praktischen Gründen weitere Änderungen bezüglich der Dauer der SPA sowie der Farbstoffkonzentration vor. Die Dauer, über die man Fliegen mit einer

angefärbten Nahrung füttert, kann weitestgehend willkürlich bestimmt werden. Man muss jedoch in Betracht ziehen, dass die Fliegen nach einer bestimmten Zeit beginnen den Farbstoff wieder auszuscheiden. So findet man in der Literatur Fütterungsperioden von 15 Minuten bis hin zu 24 oder sogar 72 Stunden (Deshpande et al. 2014; Edgecomb et al. 1994). Um unser „chronic social defeat"-Experiment kompakt zu gestalten und die schon recht lange Versuchsdauer von insgesamt acht Tagen nicht noch weiter zu erhöhen, suchten wir nach einer Möglichkeit die Fütterungsperiode vergleichsweise kurz zu halten ohne dabei jedoch an Signalstärke (abhängig von der Aufnahme des Farbstoffes) zu verlieren. Dementsprechend entschieden wir uns für eine zweistündige Periode, stellten dabei jedoch fest, dass wir mit den herkömmlichen Farbstoffkonzentrationen keine ausreichende Aufnahme des Farbstoffes in den Organismus der Fliege erreichten. Durch die zu geringe Aufnahme erhielten wir in der Spektrophotometrie nur äußerst schwache Signale, sodass an diesem Punkt ein klarer Optimierungsbedarf bestand. Die herkömmliche Konzentration des Farbstoffes im jeweiligen Medium (meist Agarose) befindet sich normalerweise bei ungefähr einem Prozent. Da wir unseren Farbstoff jedoch nicht zu Agarose, sondern zu Fliegennahrung (Inhalt: Maismehl, Saccharose, Hefe, etc., siehe 2.1.1) beimischten, benötigten wir zahlreiche Reinigungs- und Zentrifugationsschritte (siehe 2.5.1), um zu einer klaren Probe zu gelangen, die man für die spektrophotometrische Analyse verwenden konnte. Diese Schritte hatten jedoch zur Folge, dass ein relevanter Anteil des Farbstoffes, den die Fliege ursprünglich aufgenommen hatte, im Überstand bzw. während Waschvorgänge verloren ging und wir somit ein deutlich schwächeres Signal erhielten als bei vergleichbaren Experimenten auf Agarosebasis. Dementsprechend entschieden wir uns dafür, die Farbstoffkonzentration drastisch zu erhöhen und zu jeweils 1 ml Fliegennahrung 800 µl Farbstoff zu geben. Solch hohe Farbstoffkonzentrationen wurden in der Literatur bisher noch nicht verwendet und bergen verständlicherweise das Risiko, dass der eigentlich zu messende Inhaltsstoff (in diesem Fall Saccharose) zu sehr durch den Farbstoff verdünnt bzw. das Ergebnis letztendlich verfälscht wird. Diesen Vorwurf kann man nicht vollkommen entkräften, jedoch kann man ihm zwei Argumente gegenüberstellen. Zum einen verwendeten wir mit Fliegennahrung als Basis für unsere Nahrungsmischungen eine deutlich reizvollere Nahrungsgrundlage für unsere *Drosophila*, die aufgrund ihrer Zusammenstellung verglichen mit Agarose in ungleich höherem Maße geschmacksintensiver und demzufolge attraktiver für die Fliegen ist. Somit erscheint es durchaus vertretbar die Farbstoffkonzentration zu erhöhen, solange man weiterhin beobachten kann, dass die Fliegen die Nahrung in großen Mengen aufnehmen und verzehren. Dies war in unserem Fall gegeben und führt uns zu unserem zweiten Punkt. Denn

ausschlaggebend ist letztendlich die Saccharosepräferenzratio, die ausdrückt wie stark eine einzelne Fliege die süßere Nahrung der normalen vorzieht. Solange also unsere Fliegen die Nahrung zu sich nehmen, die in der Literatur bereits beschriebene starke Präferenz für süße und zuckerhaltige Nahrung aufweisen und wir dies mithilfe spektrophotometrischer Auswertung reproduzierbar und akkurat feststellen können, erachten wir unser Vorgehen zwar nicht für perfekt und fehlerfrei, aber für pragmatisch und legitim.

Ein weiterer Kritikpunkt in Bezug auf die SPA betrifft die Auswertung der spektrophotometrisch ermittelten Farbstoffkonzentrationen. Unser Protokoll sah vor, dass der Farbstoff der jeweiligen Nahrungsmischung (normal vs. süß) beigemischt, den Fliegen für zwei Stunden präsentiert und anschließend über das bereits beschriebene Zentrifugations- und Waschverfahren wieder aus den Fliegen gewonnen wird. Die dabei für jede einzelne Fliege entstehende Probe ist eine Mischung aus PBS (Phosphate Buffered Saline), Farbstoff und nicht zu vermeidenden, aber so minimal wie möglich gehaltenen, Verunreinigungen, die der Nahrungsmischung bzw. dem Fliegenkörper entstammen. Diese Probe wurde anschließend gegen PBS als Leerprobe mit Fokus auf die Absorptionsmaxima von Allura Red (504 nm) und Brilliant Blue (630 nm) spektrophotometrisch analysiert. Um ausgehend von den dabei ermittelten Absorptionswerten die zugehörigen Konzentrationen der Farbstoffe zu berechnen, benötigt man Verdünnungskurven für beide Farbstoffe. Mithilfe dieser Kurven erhält man eine lineare Funktion, die Konzentration und Absorption eines Farbstoffes in Beziehung zueinander setzt und das Umrechnen beider Parameter ineinander ermöglicht. Wir haben unsere Verdünnungskurven für Allura Red und Brilliant Blue mithilfe einer seriellen Verdünnung des Farbstoffes in PBS durchgeführt und die resultierenden Verdünnungskurven für unsere Saccharosepräferenzanalyse verwendet. Daraus ergibt sich ein gerechtfertigter Kritikpunkt, denn die serielle Verdünnung sollte im gleichen Medium stattfinden, in dem auch der Farbstoff in der zu untersuchenden Probe gelöst ist. In unseren Proben war der Farbstoff durchaus in PBS gelöst, jedoch mit Verunreinigungen aus dem Körper der Fliegen und aus der Nahrungsmischung. Eine exaktere Methode wäre es gewesen, den Farbstoff zunächst in gleichem Verhältnis zur Fliegennahrung hinzuzugeben wie in der SPA (800 µl Farbstoff zu 1 ml Nahrung) und die dabei entstehende Nahrungsmischung nach den exakt gleichen Wasch- und Zentrifugationsschritten aufzureinigen und anschließend seriell zu verdünnen. Dieser Punkt stellt mit Sicherheit einen verbesserungswürdigen Aspekt unseres experimentellen Ansatzes dar, sodass wir für unsere nächsten Experimente neue Verdünnungskurven nach dem oben beschriebenen Prinzip diskutieren sollten. Dennoch lieferte uns auch dieses Verfahren

akzeptable Resultate, da wir die berechneten Parameter (SPR, GNA) nie isoliert für einzelne Fliegen oder Fliegengruppen betrachteten, sondern stets Gruppen untereinander bezüglich dieser Parameter verglichen. Die aufwändigeren Verdünnungskurven hätten uns sicherlich akkuratere Konzentrationswerte für die verzehrte Farbstoffmenge geliefert, jedoch wären dadurch die Werte weitestgehend proportional verschoben worden. Letztendlich hätte sich dadurch höchstwahrscheinlich recht wenig an unseren Untersuchungsergebnissen geändert.

Der letzte zu nennende Kritikpunkt an der SPA bestand an der mathematischen Formulierung und Berechnung der SPR. Wie bereits in 2.5.2 ausgeführt, wird die SPR wie folgt berechnet:

$$SPR = \frac{M(AR)}{M(BB)} = \frac{C(AR) \times 100\mu l}{C(BB) \times 100\mu l} = \frac{C(AR)}{C(BB)} = \frac{SN}{NN}$$

Hierbei wurde kritisiert, dass es sich um einen einfachen Quotienten aus aufgenommener süßer und aufgenommener normaler Nahrung handelte. Für den Fall, dass mehr normale als süße Nahrung aufgenommen werde (SN<NN), ergebe sich eine auffällige Stauchung der Werte der Quotienten zwischen 0 und 1. Für den Fall, dass mehr süße als normale Nahrung aufgenommen werde (SN>NN), könne der Quotient jedoch unbegrenzt groß werden. Es könne folglich nicht ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Ergebnisse in der SPA durch diese ungleiche Verteilung der Punktwerte unter und über einem Wert von 1 im Sinne eines damit zusammenhängenden mathematischen Artefaktes beeinflusst worden seien. Es wurde vorgeschlagen, dass die folgende Berechnung eine solche ungleiche Verteilung der Punktewerte vermeiden würde: $SPR = \frac{SN}{SN+NN}$. Bei dieser Formulierung würde sich die gesamte Punktemenge von 0 bis 1 befinden, unabhängig davon, ob mehr süße oder normale Nahrung aufgenommen wurde.

Diesem Kritikpunkt konnte jedoch ebenfalls mit einigen mathematischen Berechnungen adäquat begegnet werden. Hierzu muss man sich zunächst vergegenwärtigen, dass in der hier vorliegenden Arbeit ausschließlich parameterfreie Tests (χ^2-Test, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test, Spearmans Korrelationskoeffizient) verwendet wurden, da man bei den erhobenen Daten nicht von einer Normalverteilung ausgehen konnte. Diese parameterfreien Tests berechnen ihre Teststatistik und die damit verbundenen p-Werte nicht mit den eigentlich erhobenen absoluten Werten, sondern lediglich mithilfe von Rängen. Allen erhobenen Werten werden je nach ihrer Größe bestimmte Ränge innerhalb der Wertemenge zugeordnet und anschließend wird die Teststatistik mithilfe der Ränge berechnet.

Dementsprechend ist für die Integrität dieser Tests wichtig, dass die Rangfolge der Werte erhalten bleibt, ungeachtet der eigentlichen absoluten Werte. Um nun also zu prüfen, ob die mathematische Formulierung $SPR = \frac{SN}{NN}$ die Teststatistik und die Resultate der verwendeten statistischen Methoden beeinflussen konnte, muss geprüft werden, ob die Verwendung unserer SPR-Berechnung ($SPR_{Original} = \frac{SN}{NN}$) zu anderen Rängen führt als die vorgeschlagene alternative SPR-Berechnung ($SPR_{alternativ} = \frac{SN}{SN+NN}$). Sollten sich die Ränge verändern, so wäre der Kritikpunkt berechtigt und die statistischen Tests wären durch dieses mathematische Artefakt beeinflusst worden. Verändern sich die Ränge jedoch nicht, so handelt es sich hierbei um eine rein optische Korrektur, die keine Auswirkung auf die Teststatistik hat.

Es soll nun eine Reihe an Berechnungen angestellt werden, die zeigen, dass die beiden SPR-Formulierungen problemlos ineinander überführt werden können[2]:

$$SPR_{alternativ} = \frac{SN}{SN + NN} = \frac{1}{\frac{SN + NN}{SN}} = \frac{1}{1 + \frac{NN}{SN}} = \frac{1 \times (\frac{SN}{NN})}{\left(1 + \frac{NN}{SN}\right) \times (\frac{SN}{NN})} = \frac{\frac{SN}{NN}}{\frac{SN}{NN} + 1}$$

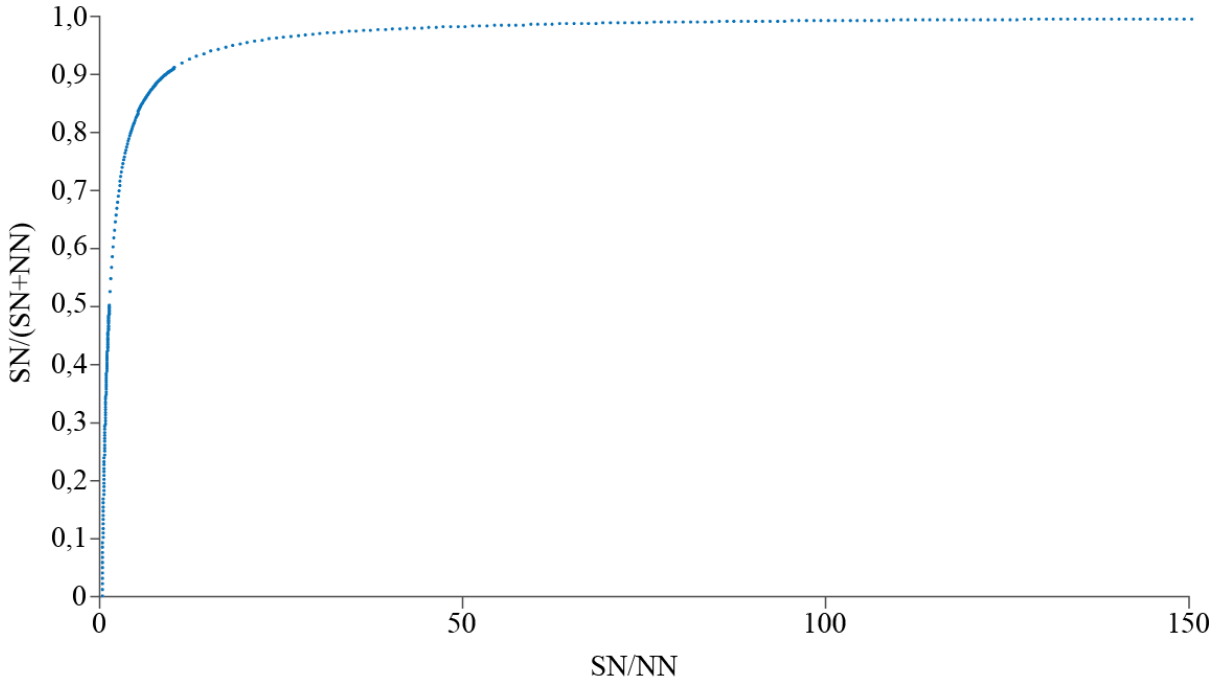
$$= \frac{SPR_{Original}}{SPR_{Original} + 1}$$

Somit zeigt sich, dass die alternative SPR-Berechnung lediglich eine Transformation der ursprünglich verwendeten SPR-Berechnung ist und man die alternative SPR-Berechnung als Funktion der ursprünglichen SPR-Berechnung wie folgt ausdrücken kann:

$$SPR_{alternativ} = \frac{SPR_{Original}}{SPR_{Original} + 1}$$

Trägt man nun die alternative SPR-Berechnung als Funktion der ursprünglichen SPR-Berechnung in einem XY-Diagramm auf, so zeigt sich ein monoton ansteigender Zusammenhang der beiden Variablen (Figur 15).

[2] Die mathematischen Formulierungen lassen sich nur durchführen, sofern $SN \neq 0$ und $NN \neq 0$, da ansonsten an mehreren Stellen eine unzulässige Division durch den Wert 0 bzw. eine Multiplikation eines Bruches mit 0 stattfinden würde. Da jedoch bei keiner beobachteten Fliege SN = 0 oder NN = 0 war, ist dies ein formales Kriterium, dass im hier vorliegenden Fall keine weiteren Konsequenzen nach sich zieht.



Figur 15: X/Y-Diagramm der ursprünglichen SPR-Berechnung und einer alternativen Variante
In diesem Diagramm ist die ursprüngliche SPR-Berechnung SN/NN auf der X-Achse als unabhängige Variable und die alternativ vorgeschlagene SPR-Berechnung SN/(SN+NN) als abhängige Variable aufgetragen. Hierbei zeigt sich ein positiver monotoner Zusammenhang zwischen den beiden Variablen.

Die Tatsache, dass beide SPR-Berechnungen gemeinsam monoton ansteigen, führt auch zu der Erkenntnis, dass die Ränge der jeweiligen Werte unverändert bleiben, ungeachtet der Tatsache welche Berechnungsmethode man verwendet. Es handelt sich somit nur um eine Transformation der Werte, wobei die Anordnung der Werte, ihre Ränge innerhalb der gesamten Punktemenge und damit auch die durchgeführten parameterfreien und rangbasierten statistischen Berechnungen nicht betroffen sind. Dementsprechend konnten wir ausschließen, dass die gefundenen Ergebnisse in der SPA durch den verwendeten SPR-Quotienten im Sinne stauchungsbedingter Artefakte beeinflusst wurden. Das hierfür erstellte Matlab-Script ist im Anhang unter 7.5 zu finden.

In diesem Sinne sollen nun nach der Methodik auch die präsentierten Ergebnisse kritischer betrachtet werden.

4.4. Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Zu Beginn der Diskussion der Ergebnisse sollte man sich zunächst verdeutlichen an welchen Fliegen die Daten erhoben wurden, um die erste potentielle Schwachstelle des Modells aufzudecken. Es wurde stets mit einer Gruppe an naiven CS-Fliegen begonnen, die anschließend ein sechstägiges „chronic social defeat"-Programm gegen Vertreter des „bully"-Stammes durchliefen und nachfolgend im Testkampf sowie in der SPA auf Verhaltensänderungen überprüft wurden. Um eine möglichst konsistente „chronic social defeat"-Erfahrung zu erzeugen wurden täglich diejenigen CS-Fliegen aussortiert, die nicht eindeutig gegen ihren „bully"-Gegner verloren bzw. ihren Kampf sogar gewonnen hatten. Dahinter stand die Absicht nach Abschluss der sechs Trainingstage eine Gruppe an „chronischen Verlierer"-Fliegen zu erhalten, die alle nachweislich sechs Kämpfe in sechs Tagen verloren hatten. Wir hatten diesen Versuchsablauf bereits dahingehend optimiert, dass wir die CS-Fliegen gegen hochaggressive „bullies" antreten ließen und somit Niederlagen der CS deutlich wahrscheinlicher machten. Dennoch kam es auch immer wieder vor, dass eine CS-Fliege ihren Kampf gewann bzw. nicht eindeutig verlor und folglich aussortiert werden musste. Wir haben hierzu keine systematischen Daten erhoben, jedoch mussten wir schätzungsweise 30% von der anfänglichen CS-Population im Laufe der sechs Tage auf diese Weise ausschließen. Meistens starteten wir ein „chronic social defeat"-Experiment mit ungefähr 35-45 Fliegen und hatten nach der „chronic social defeat"-Phase in etwa 25-35 Fliegen für den Testkampf und die SPA zur Verfügung. Diese Selektion war in unseren Augen dringend notwendig, um sicherzugehen, dass alle „chronischen Verlierer" definitiv sechs Kämpfe verloren und somit in möglichst hohem Maße die gleiche „chronic social defeat"-Erfahrung gemacht hatten. Doch genau diese Selektion stellt mit Sicherheit einen gewissen Schwachpunkt unseres Modells dar. Die Gruppe an aussortierten Fliegen ist ein genauso relevanter Bestandteil der gesamten CS-Population wie die „chronischen Verlierer", sodass eine Analyse, die nur die „chronischen Verlierer" einbezieht, lediglich bedingt repräsentativ für die CS-Population ist. Will man nun über „resistente" und „empfängliche" CS-Fliegen diskutieren, so muss man hierbei beachten, dass es sich bei der untersuchten Gruppe der „chronischen Verlierer" um eine Subpopulation an CS-Fliegen handelt, die im Kampf gegen die „bullies" schwächer abgeschnitten und alle Kämpfe verloren haben. Somit könnte man argumentieren, dass diese „chronische Verlierer"-Gruppe eine schwächere Subpopulation innerhalb der Gesamtheit der CS-Fliegen darstellt. Folglich wird hierbei durch das „chronic social defeat"-Modell möglicherweise keine Gruppe an „chronischen Verlierern" generiert, sondern eine bereits

anfällige und kampfschwache Subpopulation an Fliegen selektiert. Dementsprechend ergibt sich die Frage, inwiefern die Ergebnisse im Testkampf bzw. in der SPA tatsächlich mit der „chronic social defeat“-Erfahrung zusammenhängen und inwiefern schlichtweg schwächere Fliegen aus einer größeren Population herausselektiert wurden. Eine angemessene Strategie, um Ergebnisse zu generieren, die Aussagen über den gesamten CS-Stamm zulassen, wäre ein kompletter Verzicht auf Selektion. Dementsprechend müsste man alle CS-Fliegen konsequent weiterverfolgen, und dabei notieren ob und wie oft sie im Laufe der „chronic social defeat“-Periode gegen einen „bully“ gewonnen haben. Somit hätte man neben der Gruppe der „chronischen Verlierer“ auch eine weitere Mischpopulation an Fliegen, die sowohl Niederlagen als auch Siege gegen die „bullies“ zu verzeichnen haben. Diese Mischpopulation an Fliegen wäre ein interessanter Vergleich für die „chronischen Verlierer“, jedoch würden sich über die Gruppe selbst nur wenig Aussagen treffen lassen. Da nicht mehr eindeutig klar wäre, welche Kämpfe einen Einfluss auf das Verhalten der Fliegen gehabt hatten, würden sich einige Fragen ergeben. Welche Schlüsse könnte man aus CS-Fliegen ziehen, die beispielsweise fünf Kämpfe gegen „bullies“ verloren und einen davon gewonnen haben? Kann man hier noch von „chronic social defeat“ sprechen? Und wenn ja, wo sind die Unterschiede in der Gewinn- und Verlusterfahrung zwischen vier Niederlagen und zwei Siegen bzw. drei Niederlagen und drei Siegen? Nicht nur, dass diese Gruppen untereinander kaum vergleichbar sind, sondern allein ein einziger Sieg gefährdet die Integrität des gesamten „chronic social defeat“-Ansatzes und lässt kaum Schlüsse über die dadurch entstehenden Subpopulationen zu. Denn bei fünf Siegen und einer Niederlage kann man sich nicht sicher sein, inwieweit der eine Sieg die eventuell davor und/oder danach erfahrenen Niederlagen aufwiegt oder anderweitig beeinflusst. Demzufolge würde die Mischpopulation an Fliegen, die im Laufe der sechs Tage mindestens einen Kampf gewonnen haben eine durchaus interessante Vergleichspopulation zu den „chronischen Verlierern“ darstellen, jedoch erscheint es äußerst heikel darüber hinaus definitive Aussagen über diese Population zu treffen. Da der „chronic social defeat“-Ansatz unsere höchste Priorität darstellte, war es deshalb für uns eine der absoluten Grundvoraussetzungen nur Fliegen in die Gruppe der „chronischen Verlierer“ einzubeziehen, die jeden der sechs Trainingskämpfe eindeutig verloren hatten, auch wenn die dabei entstehenden Ergebnisse in gewissem Maße an Aussagekraft für die gesamte CS-Population einbüßten. Eine denkbare Alternative wäre es, eine Trainingsphase zu entwerfen, die Niederlagen für die CS-Fliegen garantiert und dadurch eine Gruppe an „chronischen Verlierer“-Fliegen generiert, die repräsentativ für die gesamte CS-Population ist. Man müsste bewerkstelligen können, dass die Fliegen den Kampf annehmen, diesen aber stets verlieren.

Weniger geeignet wären Ansätze, die zu ähnlichen Verhaltensänderungen wie unsere Experimente mit α-Methyltryptophan führen (siehe 3.5.1). Hierbei verloren die Fliegen konstant alle Kämpfe gegen die „bullies“, jedoch nur aufgrund der Tatsache, dass sie nicht mehr in der Lage waren den Gegner mit „lunges“ anzugreifen. Somit war der Testkampf gegen naive Fliegen, die ebenfalls auf α-Methyltryptophan gehalten wurden, nicht mehr auszuwerten, da keiner der beiden Kontrahenten „lunges“ ausführte. Eine Möglichkeit wäre es, den „bully“-Stamm eventuell durch weitere Inzuchtphasen zu optimieren und ihm einen noch größeren Kampfvorteil gegenüber den CS-Fliegen zu verschaffen. Alternativ könnte man sogar überlegen eine gänzlich andere *Drosophila*-Art als Gegner zu verwenden, die der *Drosophila melanogaster* körperlich überlegen ist. Hierzu müsste jedoch zunächst überprüft werden, inwieweit man Aggressionen zwischen zwei verschiedenen *Drosophila*-Arten auslösen kann, ob die Kampfarena auch für andere *Drosophila*-Arten passend ist und welche Art von Weibchen man zur Auslösung des Kampfverhaltens in den „food cup“ gibt. Dies alles sind Fragen, die man klären müsste, bevor man mit der Umsetzung einer solchen Idee beginnen könnte.

Ob nun eine weitere Optimierung des „chronic social defeat“-Ansatzes im Sinne der Vermeidung jeglicher Selektion wirklich notwendig ist, lässt sich durchaus diskutieren. Die Überlegung, dass man mit den sechs Trainingskämpfen schlichtweg eine schwächere Subpopulation aus der größeren CS-Population herausfiltert erscheint auf den ersten Blick durchaus logisch. Jedoch sollte man sich hierbei auch in Erinnerung rufen, dass wir innerhalb der „chronischen Verlierer“ „resistente“ und „empfängliche“ Fliegen anhand ihres Verhaltens (Testkampf, SPA) unterscheiden konnten (siehe 3.2 und 3.3). Somit erhielten wir nach „chronic social defeat“ sowohl Fliegen, die scheinbar unbeeinflusst durch die zahlreichen Niederlagen waren als auch solche, die ganz massive Verhaltensänderungen nach dieser negativen Erfahrung präsentierten. Somit handelt es sich bei der Aussortierung der CS-Fliegen, die einen Kampf gegen die „bullies“ gewinnen konnten, womöglich weniger um eine Selektion als um eine Methode Ereignisse mit bestimmter statistischer Wahrscheinlichkeit anzuhäufen. Da CS-Fliegen den „bullies“ in ihrem Kampfverhalten deutlich unterlegen sind, ist eine einzelne Niederlage sehr wahrscheinlich. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine CS-Fliege sechs solcher Kämpfe in Folge verliert ist demnach immer noch recht hoch, jedoch steigt nach dem Bernoulli-Gesetz durch die höhere Anzahl an Kämpfen auch die Wahrscheinlichkeit, dass die CS-Fliege eine dieser Auseinandersetzungen für sich entscheidet. Da bereits ein einzelner gewonnener Kampf gegen einen „bully“ zum Ausschluss aus dem Experiment führt, erscheint

es durchaus logisch, dass im Laufe von sechs Tagen einige CS-Fliegen aussortiert werden müssen. Führt man diesen Gedanken fort, so handelt es sich hierbei in erster Linie um ein statistisches Problem und weniger darum, dass sich die aussortierten Fliegen phänotypisch von den verbliebenen „chronischen Verlierer“-Fliegen unterscheiden. Der Vorgang des Aussortierens ist demnach auch keine Selektion, sondern schlichtweg eine Auftrennung der ursprünglichen CS-Population auf der Grundlage einer entstehenden statistischen Verteilung durch die hohe Anzahl an durchgeführten Trainingskämpfen zwischen CS- und „bully“-Fliegen.

4.5. Bedeutung von Serotonin im Kontext depressiver Störungen

Nach der Vorstellung unseres „chronic social defeat“-Modelles und dessen experimenteller Etablierung strebten wir eine genauere biochemische Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen an. Insbesondere die Zusammenhänge von Resistenz und „Empfänglichkeit“ gegenüber „chronic social defeat“ wollten wir entschlüsseln und im besten Falle Rezeptoren bzw. Transmitter ausfindig machen, die diese beiden Phänotypen maßgeblich beeinflussen. Da das Feld der Neurotransmitter ein sehr weites ist, wollten wir eine zielgerichtete Analyse betreiben und uns am klinischen Wissen über die menschliche Depression orientieren.

Im menschlichen Organismus ist weniger der Neurotransmitter Serotonin als vielmehr seine verschiedenen Rezeptoren entscheidend für dessen Wirkung im Kontext depressiver Störungen. Es gibt insgesamt sieben verschiedene Rezeptoren (5-HT_{1-7}), die sich wiederum teilweise in weitere Subtypen unterteilen lassen. Bis auf den 5-HT_3-Rezeptor handelt es sich bei Serotoninrezeptoren um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Der 5-HT_1-Rezeptor wird hauptsächlich im ZNS exprimiert und besitzt fünf Subtypen (A, B, D, E, F), wobei vor allem die 5-HT_{1A}-Rezeptoren eine zunehmend wichtigere Rolle in Bezug auf die depressive Störung einnehmen. Aufgrund der vielfältigen Einbindung des 5-HT_{1A}-Rezeptors in das Krankheitsbild der menschlichen Depression (siehe 2.6.2.1) wurde dessen *Drosophila*-Ortholog, der d5-HT_{1B}-Rezeptor, zur genaueren Analyse mithilfe des GAL4/UAS-Systems herangezogen. Die Funktion der anderen Serotoninrezeptoren soll nun ebenfalls kurz erläutert werden. Die 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren sind im Hinblick auf psychiatrische Erkrankungen weniger relevant, sondern stellen unter anderem eine Schlüsselstelle in der Behandlung der Migräne dar (Speck and Maihofner 2013). Die wichtigsten Medikamente zur Behandlung und Prophylaxe der Migräne (z.B. Ergotamin-Derivate und Triptane) sind Agonisten an den 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1D}- und 5-HT_{1F}-Rezeptoren. Sie unterdrücken zum einen die neuroinflammatorische Komponente der Migräne und bewirken andererseits eine Vasokonstriktion zerebraler Arterien. Gerade die 5-HT_{1B}-Rezeptoren stellen hierbei eine Ausnahme dar, da sie auch auf kardiale Gefäße vasokonstriktorisch wirken und damit für den Großteil der Nebenwirkungen (vor allem Angina pectoris-Anfälle und Herzrhythmusstörungen) verantwortlich sind. Die 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1D}- und 5-HT_{1F}-Rezeptoren spielen demnach eine durchaus wichtige Rolle im klinischen Alltag, jedoch gibt es bisher wenig Evidenz für eine Beteiligung an depressiven Störungen. 5-HT_{1E}-Rezeptoren nehmen eine besondere Stellung ein, da sie nicht von Mäusen und Ratten exprimiert werden. Der daraus entstehende Mangel an Tiermodellen ist auch teilweise

verantwortlich dafür, dass die genaue Funktion des 5-HT_{1E}-Rezeptors noch unbekannt ist (Klein and Teitler 2009).

5-HT_2-Rezeptoren lassen sich in drei Subtypen (A, B, C) unterteilen, die sich in Funktion und Lokalisation sehr deutlich voneinander unterscheiden. 5-HT_{2A}-Rezeptoren werden nahezu ubiquitär exprimiert und übernehmen eine zentrale Rolle in der primären Blutgerinnung, da sie zum einen zur Thrombozytenaggregation beitragen und zum anderen die Vasokonstriktion verletzter Gefäße unterstützen. 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten werden dementsprechend als Thrombozytenaggregationshemmer (Sarpogrelat) und auch als Antihypertonikum (Ketanserin) eingesetzt (Elbers et al. 2009; Kim et al. 2013). Interessanter für die psychiatrische Forschung ist jedoch die Erkenntnis, dass klassische Halluzinogene wie LSD, Meskalin und Psilocybin ihre Wirkung unter anderem über 5-HT_{2A}-Rezeptoraktivierung auslösen (Halberstadt and Geyer 2011). Im Einklang hiermit steht die Erkenntnis, dass Clozapin als eines der wichtigsten atypischen Neuroleptika neben zahlreichen weiteren Rezeptorinterkationen auch eine Blockade des 5-HT_{2A}-Rezeptors bewirkt. Noch wichtiger für die hier vorliegende Arbeit ist jedoch die Tatsache, dass auch Antidepressiva an 5-HT_2-Rezeptoren binden. Bestimmte genetische Polymorphismen des 5-HT_2-Rezeptors werden schon seit längerem kontrovers in Bezug auf eine mögliche Beteiligung an depressiven Symptomen sowie als Einflussfaktoren des klinischen Ansprechens auf SSRI diskutiert (Kamata et al. 2011; Zobel and Maier 2010).

Im Gegensatz zu den 5-HT_{2A}-Rezeptoren, spielen 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2C}-Rezeptoren für unser Modell nur eine untergeordnete Rolle. 5-HT_{2B}-Rezeptoren finden sich vor allem in Blutgefäßen, während 5-HT_{2C}-Rezeptoren überwiegend im ZNS exprimiert werden. Die teilweise schweren kardiovaskulären Nebenwirkungen (Hypertonie, Herzklappenschäden) der Anorektika Fenfluramin und Lorcaserin, sowie des Parkinson-Medikamentes Pergolid sollen durch Bindung an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2C}-Rezeptoren bedingt sein (Andrejak and Tribouilloy 2013).

Der 5-HT_3-Rezeptor nimmt im Gegensatz zu allen anderen Serotoninrezeptoren eine Sonderstellung ein, da er kein G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist, sondern ein ligandengesteuerter Ionenkanal. Dieser wird sowohl zentral in der Area postrema als auch peripher im Magen-Darm-Trakt exprimiert und ist verantwortlich für die Auslösung des Brechreflexes. Die Gruppe der sogenannten Setrone (Ondansetron, Tropisetron, etc.) sind stark wirksame 5-HT_3-Rezeptorantagonisten und werden bei therapierefraktärem, Zytostatika-bedingtem Erbrechen eingesetzt (Zeuzern 2013).

Der 5-HT_4-Rezeptor entfaltet seine Wirkung ebenfalls im Magen-Darm-Trakt und reguliert über Acetylcholin-Ausschüttung die Darmaktivität. Es gab mit Cisaprid und Tegaserod zwei prokinetisch wirkende 5-HT_4-Rezeptoragonisten, die man als Laxanzien verwendet hatte, bevor sie aufgrund schwerer kardialer Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen wurden (Quigley 2011; Tack et al. 2012).

Während über die 5-HT_5- und 5-HT_6-Rezeptoren bislang nur wenig bekannt ist, wird der 5-HT_7-Rezeptor mit zirkadianer Rhythmik und der Regulation der Körpertemperatur in Verbindung gebracht. Einen Hinweis darauf, dass dieser Rezeptor eventuell auch an psychiatrischen Erkrankungen beteiligt sein könnte liefert einmal mehr Clozapin, das eine hohe Affinität zum 5-HT_7-Rezeptor besitzt. Über die genauen Mechanismen bzw. einen Einfluss auf die antipsychotische Wirkung dieses Medikaments ist gegenwärtig noch wenig bekannt (Smith et al. 2011).

In *Drosophila melanogaster* sind aktuell vier verschiedene Serotoninrezeptoren bekannt (im Folgenden mit einem „d“ gekennzeichnet), die allesamt G-Protein-gekoppelt sind. Es gibt einerseits die d5-HT_{1A}- und d5-HT_{1B}-Rezeptoren, die eine sehr hohe Ähnlichkeit mit humanen Vertretern besitzen und andererseits die d5-HT_2- bzw. d5-HT_7-Rezeptoren, die zwar gewisse strukturelle Ähnlichkeiten mit den gleichnamigen menschlichen Rezeptoren besitzen, letztendlich aber keine vergleichbare orthologische Übereinstimmung wie die 5-$HT_{1A/B}$-Rezeptoren erreichen (Silva et al. 2014). Generell werden die Rezeptoren bei *Drosophila* nach dem menschlichen Rezeptor benannt, mit dem sie genetisch am höchsten übereinstimmen. Eine Ausnahme hiervon ist der von uns verwendete d5-HT_{1B}-Rezeptor, für den erst nach seiner Benennung festgestellt wurde, dass er eine höhere Ähnlichkeit zum menschlichen 5-HT_{1A}- als zum 5-HT_{1B}-Rezptor besitzt (siehe 2.6.2.2).

d5-HT_{1A}-Rezeptoren werden in der Fruchtfliege hauptsächlich im ZNS exprimiert und besitzen wichtige Funktionen im Zusammenhang mit Aggression, Gedächtnisbildung und Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus. d5-HT_{1B}-Rezeptoren werden ebenso vorwiegend zentralnervös und vor allem in den sogenannten „mushroom bodies“ exprimiert. Wie bereits in Abschnitt 2.6.2.2 näher erläutert, sollen sie an sozialem Lernverhalten, Hierarchiebildung und zirkadianer Rhythmik beteiligt sein. d5-HT_2-Rezeptoren finden sich nicht nur im ZNS, sondern auch verstärkt in den Augen der *Drosophila* sowie in den Speicheldrüsen. Ihre bisher bekannten Funktionen umfassen Aggression, Essverhalten bzw. Nahrungsaufnahme und Gedächtnisbildung. Die Expression von d5-HT_7-Rezeptoren ist zentralnervös, in thorakalen

Ganglien und in Speicheldrüsen am stärksten. Diese Rezeptoren stellen im Vergleich zu den drei Vorgängern eine Besonderheit dar, da sie zusätzlich eine Dopaminrezeptor-Aktivität besitzen. Sie haben weniger Einfluss auf Gedächtnisbildung und Aggression und sind vorwiegend am Paarungs- und Balzverhalten männlicher Fliegen beteiligt (alle Angaben der Ontologie-Datenbank von FlyMine entnommen: www.flymine.org, abgerufen am 10.01.2018)

In Anbetracht der aktuellen Datenlage zu den diversen serotonergen Rezeptoren wird schnell klar, dass Serotonin sowohl im menschlichen Körper als auch in der Fruchtfliege eine ganze Bandbreite an Funktionen beeinflusst, wobei höchstwahrscheinlich zahlreiche Mechanismen und Interaktionen noch nicht bekannt sind. Uns war jedoch klar, dass in unserem „chronic social defeat"-Modell vor allem die humanen 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren aufgrund ihrer hohen Relevanz für die menschliche Depression geeignete Ansatzpunkte für weitere genetische Untersuchungen sein würden.

Wir entschieden uns den 5-HT_{1A}-Rezeptor genauer zu untersuchen, da wir für ihn mit dem d5-HT_{1B}-Rezeptor ein passendes *Drosophila*-Ortholog mit hoher sequenzieller Ähnlichkeit zum humanen 5-HT_{1A}-Rezeptor besaßen. Außerdem verfügten wir bereits in unserem eigenen Labor über einen „GAL4-driver" für d5-HT_{1B}-Rezeptor-positive Neuronen, sodass sowohl aufgrund der Datenlage als auch aufgrund der praktikablen Umsetzbarkeit die Wahl auf den d5-HT_{1B}-Rezeptor fiel. Es gibt zwar auch einen d5-HT_2-Rezeptor in *Drosophila*, jedoch lässt sich für diesen keine eindeutige Orthologie zu einem der drei bekannten menschlichen 5-HT_2-Subtypen feststellen. Da somit ein eindeutiges menschliches Korrelat für diesen Rezeptor fehlte, entschieden wir uns gegen eine genauere Untersuchung des d5-HT_2-Rezeptors. Die Wahl des d5-HT_{1B}-Rezeptors sollte sich als überaus hilfreich erweisen und die zuvor durchgeführten α-MTP-Experimente an aussagekräftigen Ergebnissen deutlich übertreffen.

Die Zufütterung von α-MTP war eine einfach durchführbare, diätetische Maßnahme zur orientierenden Untersuchung des serotonergen Systems. Durch Züchtung der Versuchstiere auf einer α-MTP-haltigen Nahrungsmischung und der dadurch erfolgenden Reduktion der zentralnervösen Serotoninkonzentration um ca. 50% (Dierick and Greenspan 2007) konnten die Effekte der „chronic social defeat"-Erfahrung auf die Saccharosepräferenz der betroffenen Fliegen neutralisiert werden (siehe 3.5.1). Dieser Ansatz war durchaus nicht frei von Kritik, da die Fliegen ihre Kampffähigkeit einbüßten und somit der Testkampf keine nutzbaren Resultate hervorbrachte. Die Erfahrung der sozialen Niederlagen durch Kämpfe gegen die „bullies" blieb davon jedoch unbeeinträchtigt, sodass die Saccharosepräferenzanalyse unabhängig von der

Aggressionsanalyse eine eigene Validität hatte. Es konnte somit gezeigt werden, dass durch Reduktion der Serotoninkonzentration im ZNS der „chronischen Verlierer“ eine Stabilisierung der Saccharosepräferenz bewirkt wurde. Gerade im Hinblick auf die äußerst komplexen Interaktionen von Serotonin mit seinen zahlreichen Rezeptoren, konnte dies jedoch nur als ein erster Hinweis verstanden werden. Es war uns nicht bekannt, inwieweit die alleinige Reduktion von Serotonin im synaptischen Spalt die zentralnervösen Serotoninrezeptoren in ihrer Expression beeinflusste. Wichtig ist hierbei die Tatsache, dass Serotoninrezeptoren sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sind und dabei die serotonerge Transmission verstärken und auch hemmen können. Folglich kann man basierend auf der Verringerung der synaptischen Serotoninkonzentration keine eindeutigen Aussagen darüber treffen auf welche Weise das serotonerge System exakt beeinflusst und welche Signalwege verändert wurden. Hierfür benötigten wir eine spezifischere Versuchsreihe, die den d5-HT_{1B}-Rezeptor in das Zentrum der experimentellen Analyse stellte.

Die technische Umsetzung fand auf der Basis des GAL4/UAS-Systems statt, wobei ein komplexes RNAi-Konstrukt mütterlicherseits mit einem väterlichen „GAL4-driver“ zur Markierung von d5-HT_{1B}-positiven Neuronen gekreuzt wurde. Diese, in der Folge als *d5-HT_{1B}xRNAi* bezeichneten Fliegen, weisen eine um 70% reduzierte d5-HT_{1B}-Rezeptoraktivität auf (Yuan et al. 2006; Yuan et al. 2005) und wurden dem „chronic social defeat“-Protokoll unterzogen. Sowohl im Testkampf, als auch in der Saccharosepräferenzanalyse zeigte sich, dass die *d5-HT_{1B}xRNAi*-Fliegen keinen sichtbaren „chronischen Verlierer“-Phänotyp mehr entwickelten (siehe 3.5.3). Sie gewannen 57% ihrer Testkämpfe gegen naive *d5-HT_{1B}xRNAi*-Fliegen und zeigten eine vergleichbare Saccharosepräferenz. Schlüsselte man die „chronischen Verlierer“-*d5-HT_{1B}xRNAi*-Fliegen in Gewinner und Verlierer des Testkampfes auf und verglich diese beiden Gruppen erneut mit naiven *d5-HT_{1B}xRNAi*-Fliegen, so ergaben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf ihre Saccharosepräferenz. Das gleiche Bild zeigte sich in Bezug auf die Gesamtnahrungsaufnahme (GNA), die bei „chronischen Verlierer“- *d5-HT_{1B}xRNAi*-Fliegen nicht signifikant reduziert war und auch im Gruppenvergleich von Gewinnern und Verlierern des Testkampfes, sowie naiven *d5-HT_{1B}xRNAi*-Fliegen keine signifikanten Unterschiede erkenntlich werden ließ.

Mithilfe einer chronischen Suppression der d5-HT_{1B}-Rezeptoren waren wir somit in der Lage die Effekte von „chronic social defeat“ auf die Versuchstiere zu revidieren und eine Resistenzentwicklung gegenüber aversiven sozialen Erfahrungen zu befördern. Da unser Modell im weitesten Sinne als eine abstrakte Emulation menschlicher Verhaltensweisen im

Sinne eines vereinfachten Depressionsmodells zu verstehen ist, erscheint es als eine Form der Validierung, dass sich unsere Resultate bezüglich der Rolle des d5-HT_{1B}-Rezeptors mit denen aus klinischen Studien am Menschen in gewisser Weise decken (siehe 2.6.2.1). Ebenso wie im hier vorliegenden Fall eine Suppression der d5-HT_{1B}-Aktivität zu einer Neutralisierung der „depressionsähnlichen" Symptomatik geführt hat, so konnte für den Wirkstoff Pindolol, einem nicht-selektiven β-Blocker, der ein partieller Antagonist des menschlichen 5-HT_{1A}-Rezeptors (Ortholog des Drosophila-d5-HT_{1B}-Rezeptors) ist, eine Steigerung des Therapieerfolgs bei der Behandlung von depressiven Störungen nachgewiesen werden (Portella et al. 2011; Portella et al. 2009; Whale et al. 2010).

Jedoch gilt erneut zu bemerken, dass d5-HT_{1B}- bzw. 5-HT_{1A}-Rezeptoren bei Säugetieren und *Drosophila* sowohl prä- als auch postsynaptisch vorkommen und in diesen Lokalisationen dementsprechend als Auto- oder auch als Heterorezeptor dienen können (Huang et al. 2013; Pytliak et al. 2011). Diese anatomisch und neurophysiologisch komplexe Konstellation lässt eine eindeutige Aussage über die Rolle von d5-HT_{1B}-Rezeptoren bei der Entstehung des „chronischen Verlierer"-Phänotyps noch nicht zu. Einen Versuch in Richtung einer detaillierteren Analyse dieser Rezeptoren stellt nicht nur die hier vorliegende Arbeit, sondern auch eine neue Mausmodell-Studie dar. In dieser konnte gezeigt werden, dass chronischer unvorhergesehener Stress bei Mäusen zu einer Verringerung der Saccharosepräferenz führte, wobei gleichzeitig eine Erhöhung der d5-HT_{1B}-Transmission in selektierten Pyramidenzellen (Cornu ammonis Region 1, CA1) beobachtet werden konnte (Cai et al. 2013). In Zusammenhang mit der bereits mehrfach validierten Erkenntnis, dass Serotonin essentiell für die Gedächtnisbildung der *Drosophila* ist, wurde eine Rolle von d5-HT_{1B}-Rezeptoren im Rahmen von negativ-sozialem Lernverhalten postuliert (Huser et al. 2012; Lee et al. 2011; Svenningsson et al. 2006). Somit könnten d5-HT_{1B}-Rezeptoren in diesem Fall die Konsolidierung der „chronic social defeat"-Periode und das „Erlernen" des „chronischen Verlierer"-Phänotyps maßgeblich beeinflusst haben. Ein wichtiges Folgeprojekt unserer Arbeit sollte darin bestehen, den d5-HT_{1B}-Knockout noch spezifischer in den Gehirnregionen der Drosophila auszulösen und damit noch genauere Aussagen über die Wirkmechanismen treffen zu können.

4.6. Mögliche biologische Hintergründe von Resistenz und Empfänglichkeit

Wie bereits ausgeführt, bestand die ursprüngliche Motivation für diese Arbeit darin, ein erstes Depressionsmodell bzw. „chronic social defeat"-Modell im *Drosophila*-Organismus zu etablieren. Was uns hierbei überraschte war nicht nur die Tatsache, dass wir mithilfe einer sechstägigen Periode sozialer Niederlagen in der Lage waren einen „chronischen Verlierer"-Phänotyp auszulösen, sondern, dass dieser nur bei einem Teil der CS-Fliegen auftrat. So zeigte nur eine bestimmte Subpopulation der CS-Fliegen eine Verringerung ihrer Aggression bzw. ihrer Kampfkraft sowie eine Reduktion ihrer Saccharosepräferenz und ihrer gesamten Nahrungsaufnahme (siehe 3.1). Im Gegensatz dazu konnte man bei anderen CS-Fliegen keine signifikanten Verhaltensänderungen nach „chronic social defeat" feststellen. Obwohl die Gesamtheit der CS-Fliegen bis zu einem gewissen Grad die gleiche „chronic social defeat"-Erfahrung gemacht hatte, unterschieden sich die Reaktionen der jeweiligen Fliegen auf diesen Stressor in einer solchen Weise, dass wir eine Einteilung in zwei Subpopulationen vornahmen. Hieraus ergab sich die Klassifikation von „empfänglichen" und „resistenten" Fliegen in Bezug auf die sozialen Niederlagen. Die Erkenntnis, dass wir mittels sozialem Stress in der Lage waren eine vormals homogene Gruppe in zwei voneinander unterscheidbare phänotypische Subpopulationen aufzuteilen bzw. die Herausbildung dieser beiden Gruppen zu bewirken, bot gerade im *Drosophila*-Organismus die Möglichkeit einen neuen Einblick auf stressbedingte Gen-Umwelt-Interaktionen zu gewinnen. Die Vorarbeit von Eric Nestler und Kollegen zeigt, dass der Nucleus accumbens, das ventrale Tegmentum sowie der neurotrophe Faktor BDNF (brain-derived neurotrophic factor) für die Entstehung des depressionsähnlichen Phänotyps mitverantwortlich sind (Krishnan et al. 2007). Das ventrale Tegmentum mit seinen Projektionen in den Nucleus accumbens, den ventromedialen präfrontalen Kortex, den Nucleus caudatus, den Bulbus olfactorius, den Hippocampus und die Amygdala stellt das sogenannte endogene dopaminerge mesolimbische Belohnungssystem dar. Speziell die Projektion des ventralen Tegmentums auf dopaminerge D_2-Rezeptoren im Nucleus accumbens spielt eine zentrale Rolle in der Auslösung von Glücksgefühlen und trägt wesentlich zu emotional und sozial basiertem Lernverhalten bei (Jänig 2011). Die Arbeitsgruppe von Eric Nestler konnte bei „empfänglichen" Mäusen, die mit depressionsähnlichen Symptomen auf „chronic social defeat" reagiert hatten, eine Erhöhung der Feuerrate von Neuronen im ventralen Tegmentum detektieren, die wiederum eine Erhöhung der BDNF-Expression im Nucleus accumbens zur Folge hatte. Interpretiert wurden diese Veränderungen im Sinne einer Adaptation an die Vielzahl von sozialen Niederlagen, die jene Mäuse erlebt hatten. Somit kann der „chronische

Verlierer“-Phänotyp als Resultat synaptisch-plastischer Vorgänge interpretiert werden, die durch „chronic social defeat“ ausgelöst werden. Dies ist wiederum mit der Beobachtung im Einklang, dass die „resistenten“ Mäuse keine signifikanten Änderungen im ventralen Tegmentum bzw. dem Nucleus accumbens aufwiesen. Folglich wäre Resistenz in diesem Fall weniger eine aktive Gegenregulation als vielmehr das Ausbleiben eines Lernvorganges bzw. einer Adaptation an negative soziale Erfahrungen. Was Nestler und Kollegen jedoch noch nicht ergründet haben, ist die Frage, wodurch diese molekularen Prozesse in Gang gesetzt werden. An diesem Punkt könnte man unser Fliegenmodell und dessen Stärke auf dem Bereich der genetischen Analyse und Manipulation sinnvoll verwenden. Aus Eric Nestlers Modell wissen wir, dass dopaminerge Projektionen des limbischen Systems einen ganz wesentlichen Einfluss auf die Reaktion gegenüber „chronic social defeat“ haben. Unser Modell konnte zeigen, dass Serotonin eine wichtige Funktion einnimmt und man mithilfe eines gezielten knock-downs von d5-HT_{1B}-Rezeptoren eine Form der Resistenz erzeugen kann.

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend ergeben sich mehrere Möglichkeiten die Zusammenhänge von „Empfänglichkeit“ und Resistenz genauer aufzuschlüsseln. Zunächst könnte man ein anatomisch orientiertes Screening durchführen und beispielsweise eine RNA-Sequenzierung am Gewebe der „mushroom bodies“ durchführen. Wie bereits in 2.6.2.2 erläutert, stellen die „mushroom bodies“ eine Struktur im ZNS der *Drosophila* dar, die vor allem für soziales Lernverhalten und Gedächtnisbildung verantwortlich ist und gleichsam eine besonders hohe Dichte an d5-HT_{1B}-Rezeptoren aufweist. Somit wären die „mushroom bodies“ ein ausgesprochen attraktives Ziel für eine RNA-Sequenzierung mit der Hoffnung, nicht nur Veränderungen der d5-HT_{1B}-Rezeptorexpression nachzuweisen, sondern in dieser Struktur eine Schlüsselstelle zu finden, die in „empfänglichen“ und „resistenten“ Fliegen distinkte Expressionsprofile offenbart. Die sogenannte TRAP-Methode (translating ribosome affinity purification), die man in Kombination mit einem spezifischen GAL4/UAS-Konstrukt für eine solche Form der zelltyp-spezifischen RNA-Sequenzierung nutzen könnte, wurde von der Arbeitsgruppe von Michelle Arbeitman (Florida State University, College of Medicine) mitentwickelt (Thomas et al. 2012). Da Michelle Arbeitman bereits in der Vergangenheit mit unserem Labor erfolgreich kollaboriert hat, wäre es durchaus vorstellbar ihre Technik an unserem Modell auszutesten. Somit könnte man die Expressionsprofile in den „mushroom bodies“ von naiven CS, sowie von „empfänglichen“ und „resistenten“ Fliegen miteinander vergleichen. Bestimmte Gene, die bei der Sequenzierung besonders signifikant hervorstechen, könnte man anschließend mithilfe des GAL4/UAS-Systems manipulieren und die dabei

entstehenden Kreuzungen in unserem „chronic social defeat“-Modell verwenden. Im besten Falle würde man natürlich „GAL4-driver“ nutzen, die spezifisch für „mushroom bodies“ sind.

Des Weiteren hat unser Labor 2013 einen „GAL4-driver“ entwickelt, mit dem man spezifisch einzelne Neuronen ansteuern und in ihrer Aktivität modulieren kann (Alekseyenko et al. 2013). In der zugehörigen Veröffentlichung wurden zahlreiche dopaminerge Neuronen dahingehend getestet, ob sie allein bzw. im Verband in der Lage sind das Aggressionsverhalten von Fruchtfliegen zu verändern. Unter anderem wurden auch sogenannte PPL1-Neuronen gezielt angesteuert und manipuliert, wobei keine Veränderung des Kampfverhaltens beobachtet werden konnte. Bei diesen PPL1-Neuronen handelt es sich um eine Gruppe von insgesamt zwölf Nervenzellen, die sich im protozerebralen posterioren lateralen Cluster 1 (PPL1) befinden, einer Hirnstruktur, die lateral der „mushroom bodies“ liegt. Diese dopaminergen Neuronen projizieren auch vorwiegend in die „mushroom bodies“ und wurden bisher vor allem im Rahmen von Schlafverhalten, Lokomotion und negativer Geotaxis der Fliegen diskutiert (Mao and Davis 2009). Die Tatsache, dass diese Neuronen dopaminerg sind, in die „mushroom bodies“ projizieren und bei knock-down bzw. Aktivierung das Kampfverhalten der Fliegen nicht signifikant beeinflussen, macht sie zu einer attraktiven Zellpopulation, die man mithilfe des GAL4/UAS-Ansatzes noch gezielter untersuchen könnte. Wir haben uns bisher überwiegend auf Serotonin als zentralen Transmitter konzentriert und dessen d5-HT_{1B}-Rezeptoren mittels RNA-Interferenz blockiert, jedoch ohne dabei spezifische anatomische Regionen anzusteuern. Dementsprechend leidet auch dieser Ansatz darunter, dass er die d5-HT_{1B}-Rezeptoren im gesamten ZNS der *Drosophila* beeinflusst. Idealerweise sollte man nicht nur einen spezifischen Rezeptor bzw. Transmitter ausfindig machen, sondern auch in der Lage sein, die damit verbundenen biochemischen Veränderungen im Gehirn der Fliege zu lokalisieren. Mithilfe des GAL4/UAS-Konstruktes von Olga Alekseyenko wäre es für uns möglich dopaminerge Neuronen, die ausgeprägte Verbindungen zu den „mushroom bodies“ besitzen, gezielt zu manipulieren und die möglichen Veränderungen am „chronischen Verlierer“-Phänotyp zu beobachten. Dieser Versuchsansatz erscheint umso vielversprechender, da auch Eric Nestler „Empfänglichkeit“ gegenüber „chronic social defeat“ in seiner Publikation als vorwiegend dopaminerg modulierten Adaptationsvorgang beschreibt. Wichtig ist, dass die Manipulation dieser PPL1-Neuronen keine signifikanten Veränderungen des Kampfverhaltens bewirkt. Somit würden sich die betroffenen Fliegen höchstwahrscheinlich sowohl in den Trainingskämpfen gegen die „bullies“ als auch in den Testkämpfen ähnlich wie CS-Fliegen verhalten. Folglich müsste der gesamte „chronic social

defeat-Versuch gut durchführbar sein (ähnliche Überlegungen spielten bereits bei unseren d5-HT_{1B}-Experimenten eine Rolle, siehe 2.6.2.2).

Natürlich besteht auch die Möglichkeit, dass weder die zelltyp-spezifische RNA-Sequenzierung, noch die Manipulation einzelner dopaminerger Neuronen hilfreiche oder sinnvolle Daten erbringen. Dies könnte daran liegen, dass man eventuell falsche Vorstellungen von dem zugrundeliegenden Adaptationsvorgang hat. Hierbei stehen sich generell zwei verschiedene Annahmen gegenüber. Zum einen könnte der „chronische Verlierer"-Phänotyp dadurch entstanden sein, dass einige Gene mit bestimmten Schlüsselfunktionen deutliche und signifikante Änderungen erfahren haben, die man beispielsweise mit Screening-Methoden wie einer RNA-Sequenzierung detektieren könnte. So könnten eventuell gewisse Serotonin- oder Dopaminrezeptoren hoch- oder herunterreguliert worden sein, was dann die depressionsähnliche Symptomatik zur Folge hätte. Im gleichen Kontext könnten beispielsweise einzelne dopaminerge PPL1-Neuronen eine deutliche Alteration in ihrer Aktivität erfahren haben, die dann Auswirkungen auf die gesamte Fliege bzw. deren Verhalten hätte. Diese Annahme beruht also darauf, dass sich der Phänotyp durch einige distinkte biochemische, molekulare oder genetische Veränderungen erklären lässt, für deren Detektion man lediglich die passende Methodik wählen muss. Dem gegenüber könnte man jedoch das Prinzip stellen, dass der Phänotyp einer Fliege nicht durch einige wenige hochsignifikante Veränderungen an gewissen Schlüsselstellen bewirkt wird, sondern dass eine Vielzahl an Neuronen, Genen und Transmittern beteiligt ist, wobei jedes Element für sich genommen nur sehr geringe Alterationen erfahren hat. Dennoch erzeugen sie in ihrer Gesamtheit ein Mosaik an Aktivitäten, Feuerraten und Signalen, das einen bestimmten Phänotyp bzw. eine bestimmte Verhaltensweise definiert. Sollte dies der Fall sein, so könnten selbst hochspezifische Methoden wie das GAL4/UAS-System oder auch zelltyp-spezifische Expressionsanalysen kaum erträgliche Ergebnisse liefern, da man mit ihnen nicht in der Lage ist, die größeren Zusammenhänge und die Komplexität dieser Mechanismen zu entschlüsseln. Um möglicherweise übergeordnete Mechanismen zu entdecken, könnte man zum Beispiel nach epigenetischen Phänomenen suchen. Auch in diesem Fall hilft es sich klinisch an der menschlichen Depression zu orientieren. In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Studien, die nachweisen konnten, dass psychiatrische Krankheiten – allen voran stressbedingte Erkrankungen wie depressive Störungen und die posttraumatische Belastungsstörung – zahlreiche Auffälligkeiten in ihrer epigenetischen Regulation aufweisen (Klengel et al. 2014). Die Methylierung von Cytidin-Basen in Cytosin-Guanosin-Nukleotid-Dimeren (CpG-Inseln),

auch als DNA-Methylierung bezeichnet, sowie die Seitenketten-Methylierung und -Acetylierung von Histonen sind die wichtigsten Prinzipien der epigenetischen Expressionsregulation. Aktuell steht in der *Drosophila*-Forschung vor allem die DNA-Methylierung im Vordergrund, wobei es neben Studien, die sich auf die Expressionsregulation einzelner Gene konzentrieren (z.B. CR, COMT, BDNF), auch Arbeitsgruppen gibt, die genomweite Methylierungs-/Demethylierungsanalysen vornehmen und so in der Lage sind ein vollständigeres Bild der epigenetischen Vorgänge zu zeichnen (Kang et al. 2013; Sabunciyan et al. 2012; Uddin et al. 2011). Die Technik, die Sabunciyan und Kollegen für den ersten genomweiten DNA-Methylierungs-Scan von depressiven Patienten nutzten, nennt sich CHARM (Comprehensive High-throughput Arrays for Relative Methylation). Hierbei handelt es sich um eine Microarray-basierte Methodik, mit der man die Methylierung von CpG-Inseln im gesamten Genom bestimmen kann. CHARM soll hierbei eine Spezifität von bis zu 90% und eine Sensitivität von bis zu 100% erreichen und stellt damit auch für unser Modell eine hochinteressante Technik dar (Irizarry et al. 2008). Dass Methylierungsstudien an *Drosophila* kein unrealistisches Vorhaben, sondern ein hochaktuelles Thema sind, zeigen die Veröffentlichungen der letzten Jahre (Abbott et al. 2013; Kramer et al. 2011; Stilling and Fischer 2011). Um die vielversprechende CHARM-Technik auch zur Untersuchung der Fliegen unseres „chronic social defeat"-Modells nutzen zu können, sollten die epigenetischen Mechanismen von Mensch und Fruchtfliege einander möglichst ähneln. Nur wenn auch in der *Drosophila* die epigenetische Regulation auf Methylierung und Demethylierung von Cytosin in den CpG-Inseln basiert, kann man sie mittels CHARM analysieren. Ein erster Hinweis, dass dies tatsächlich der Fall ist, konnte von Capuano und Kollegen geliefert werden, die nachweisen konnten, dass in *Drosophila* Cytosin-Methylierungen vorzufinden sind (Capuano et al. 2014). Zwar ist der Anteil an methyliertem Cytosin in *Drosophila* mit 0,034% deutlich geringer als in anderen Modellorganismen wie beispielsweise Arabidopsis thaliana (14%), Mus musculus (7,6%) und Escherichia coli (2,3%), dennoch schließt dies nicht aus, dass eine CHARM-Untersuchung an Fruchtfliegen wertvolle neue Erkenntnisse über bisher unbekannte epigenetische Phänomene erbringen könnte. Wir wissen somit, dass DNA-Methylierung an CpG-Inseln in *Drosophila* vorkommt und dass Techniken wie CHARM in der Lage sind diese epigenetischen Veränderungen genomweit zu detektieren. Gerade im Hinblick darauf, dass die aktuelle psychiatrische Forschung immer stärker epigenetische Faktoren in die Diskussion psychiatrischer Krankheiten miteinbezieht, erscheint es umso wichtiger, dass ein *Drosophila*-Modell für „chronic social defeat" an dieser Entwicklung teilnimmt und gleichzeitig epigenetische Veränderungen nicht ausklammert. Gerade in Bezug auf unser Modell erscheint

es sinnvoll die Entwicklung „resistenter“ und „empfänglicher“ Subpopulationen mithilfe von epigenetischen Analysen zu untersuchen.

4.7. Nutzen des *Drosophila melanogaster*-Modells

Aus den vorherigen Ausführungen ergeben sich die zahlreichen Vorteile, Chancen und Möglichkeiten des von uns vorgestellten „chronic social defeat“-Modells in *Drosophila melanogaster*. Die aktuelle psychiatrische Forschung sucht Antworten zur Entstehung psychiatrischer Erkrankungen vermehrt auf genetischer und sogar epigenetischer Ebene. Wichtig ist hierbei vor allem das Spannungsfeld zwischen der eigenen genetischen Ausstattung und dem (psycho-)sozialen Umfeld. Diese Beziehung ist wechselseitig und dynamisch, denn genauso wie die genetische Prägung das Verhalten und die Adaptation an die Umwelt beeinflusst, so haben auch die Erfahrungen, die man in seiner Umwelt macht, eine Auswirkung auf die genetischen Anlagen. In diesem Sinne erscheint es umso sinnvoller, psychiatrische Erkrankungen als Störungen oder zumindest Resultate von Gen-Umwelt-Interaktionen anzusehen und dahingehend zu erforschen. Aus diesem Grund hat auch die *Drosophila* trotz der prominenten Maus-, Ratten- und Primatenmodelle nicht an Relevanz verloren und wird ungebrochen stark beforscht. Die anatomische und physiologische Simplizität der Fruchtfliege im Vergleich zu höheren Modellorganismen stellt sogar einen Vorteil dar, da man mit gut durchdachten und abstrahierten Modellen einen unmittelbaren und direkten Zugriff auf bestimmte genetische Vorgänge hat. Mit einem vollständig sequenzierten Genom, einer ausreichenden genetischen Analogie zum Menschen und zahlreichen genetischen Werkzeugen (z.B. das GAL4/UAS-System oder auch die CHARM-Methode) aus der psychiatrischen Genetik hat die Fruchtfliege das Potential auch zukünftig ein wichtiger Eckpfeiler für die psychiatrische und neurobiologische Forschung zu sein.

Gerade im Hinblick auf die aktuelle wirtschaftliche Situation, den immer stärker werdenden finanziellen Zwängen und den zunehmend stärker implementierten ökonomischen Prinzipien in der Forschung, bietet die *Drosophila* gleich mehrere Vorteile. Man benötigt für Experimente mit Fruchtfliegen keine Ethikanträge oder sonstige formale Voraussetzungen. Gerade in der Primatenforschung, aber auch im Feld der Nagetiere hat diese ethische Thematik aufgrund zunehmend verschärfter Tierschutzgesetze eine ganz besondere Brisanz entwickelt, die im Laboralltag der betroffenen Arbeitsgruppen eine nicht zu unterschätzende Belastung darstellt. Im Vergleich zu Nagetieren und Primaten lassen sich *Drosophila* mit nur einem Bruchteil an Kosten und Arbeitsaufwand halten. Zur Durchführung von Experimenten und Studien, die hohe Stichprobenzahlen erfordern, eignen sie sich aufgrund sehr kurzer Generationszeiten, platzsparender Haltung und der bereits erwähnten großen Palette an genetischen Werkzeugen.

Für unser „chronic social defeat“-Modell wäre in diesem Sinne auch von Bedeutung, den experimentellen Ablauf noch effizienter zu gestalten, um die Stärken der *Drosophila* noch weiter zu fördern. Bislang wurden alle Trainingskämpfe gegen die „bullies“, sowie die Testkämpfe und auch die SPA manuell durchgeführt und ausgewertet. Welchen Aufwand dies bedeutet, lässt sich an einem kurzen Beispiel erläutern. Zum Aufbau und zur Vorbereitung von beispielsweise 30 Trainingskämpfen benötigt man ungefähr eine Stunde. Darin inbegriffen sind der Aufbau der Arenen, die Befüllung der „food cups“ mit frischer Nahrung und frisch enthaupteten Weibchen, sowie die Zuordnung von CS-Fliegen zu ihren jeweiligen Gegnern des Tages (es wurde stets darauf geachtet, dass die „bullies“ einen Größenvorteil gegenüber den CS-Fliegen besaßen). Danach bringt man die Fliegen schnellstmöglich in die Arenen ein, damit in etwa alle Kämpfe zeitgleich beginnen und man zügig zum Beobachten und Auswerten der Kämpfe übergehen kann. Dies ist wichtig, da die meisten Kämpfe zwischen CS-Fliegen und „bullies“ in den ersten 20-30 Minuten entschieden werden. Das Einbringen von insgesamt 60 Fliegen (30 Kämpfe) sollte also nicht mehr als fünf bis zehn Minuten dauern. Danach beobachtet man die Kämpfe für 90 Minuten und beginnt mit dem Einsammeln der Fliegen. Hierbei werden Kämpfe mit unklaren Resultaten bzw. mit siegreichen CS-Fliegen aussortiert und die jeweiligen Fliegen entsorgt. Dieser Abschnitt dauert bei 60 Fliegen ungefähr 30 Minuten. Somit benötigt man drei bis vier Stunden um eine Runde an Trainingskämpfen für 30 CS-Fliegen durchzuführen. Gerade für die Trainingsphase als zeitintensivste Einheit des Protokolls sollte daher eine effizientere Gestaltung gefunden werden. Dies könnte beispielsweise mit einer automatisierten Auswertung der Trainings- und Testkämpfe bewerkstelligt werden. Bereits 2009 schlug die Arbeitsgruppe von David Anderson ein computergestütztes System vor, das unter anderem in der Lage ist „lunges“ selbständig zu detektieren (Dankert et al. 2009). In den letzten Jahren sind weitere Instrumente hinzugekommen, die nunmehr auch in der Lage sind, die Bewegungen von Fliegen zu verfolgen, dabei die Fliegen verlässlich voneinander zu unterscheiden und sogar die Bewegungen einzelner Fliegenbeine aufzuzeichnen (Ardekani et al. 2013; Kain et al. 2013). Mit einer Kombination dieser Verfahren könnte man dementsprechend nicht nur bestimmen, wann und wie lange sich eine Fliege auf dem „food cup“ aufhält, sondern auch wie viele „lunges“ sie dort ausführt und wann sie den „food cup“ wieder verlässt. Folglich könnte man in zukünftigen Experimenten mit dem nötigen Equipment sowohl die Trainings- als auch die Testkämpfe vollkommen automatisiert auswerten lassen und müsste somit nicht für jeden einzelnen Kampf 90 Minuten Filmmaterial durchgehen.

Der Aufbau der Arenen, das Ansetzen der Kämpfe und das Einsammeln der Fliegen kann derzeit nicht weiter vereinfacht werden und muss immer noch eigenhändig durchgeführt werden. In der Forschungseinrichtung „Janelia Farm“ (www.janelia.org, abgerufen am 10.01.2018) wurden bereits Isolationsgefäße entwickelt, in denen die Fliegen gehalten werden und an die man Kampfarenen anschließen kann, ohne dass ein Transfer von Fliegen zwischen Isolationsgefäßen und Kampfarenen notwendig ist. Folglich würde man das Ansetzen von Kämpfen nicht nur drastisch beschleunigen, sondern man würde auch die heikle Handhabung der Fliegen vereinfachen, da gerade beim Transfer der Fliegen zwischen Isolationsgefäßen und Arenen immer wieder einzelne Fliegen verloren gehen, was gerade bei komplexeren Kreuzungen ein herber Verlust sein kann. Bei diesen Ausführungen handelt es sich jedoch noch um unveröffentlichtes Material, das lediglich auf einigen Kongressen vorgestellt wurde und dessen Alltagstauglichkeit bzw. technische Ausreifung noch nicht näher zu beurteilen ist.

Wie man sieht, gibt es bezüglich der technischen Aspekte unseres „chronic social defeat“-Modelles einige Verbesserungsmöglichkeiten und auch Herausforderungen im Hinblick auf die Weiterentwicklung zu einem verlässlichen, robusten und ertragreichen Forschungsinstrument. Neben den bereits beschriebenen Anwendungsmöglichkeiten für unser Modell soll die Medikamentenentwicklung und -testung noch einmal besonders hervorgehoben werden. Da die Forschung mit Fruchtfliegen zum einen keinerlei ethisch-rechtliche Voraussetzungen benötigt und zum anderen zur schnellen Generierung hoher Fallzahlen in der Lage ist, erscheint dieser Organismus in hohem Maße für das Screening von Medikamenten geeignet. Zunächst könnte man unsere „chronischen Verlierer“-Fliegen nutzen, um bestimmte Medikamente detailliert auf ihre genetischen und sogar epigenetischen Wirkungen hin zu testen. Man würde über die rein phänotypische und biochemische Wirkungsanalyse hinausgehen und könnte ein tieferes Verständnis für die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Therapeutika entwickeln. Gerade Psychopharmaka stehen oft unter besonders kritischer Betrachtung, da ihre Wirkungsweisen noch sehr wenig verstanden sind. Die eigentliche Chance in der Etablierung eines Depressionsmodells in *Drosophila* liegt letztendlich in der Entwicklung neuer Medikamente basierend auf den Erkenntnissen dieses Modells. Denn mit der Weiterentwicklung von Tiermodellen und experimentellen Ansätzen, entwickeln sich auch die damit generierten Wirkstoffe. Folglich bietet ein solches Modell, das sich von Beginn an auf Gen-Umwelt-Interaktionen konzentriert und phänotypische Veränderungen im Zusammenhang mit genetischen und epigenetischen Manipulationen betrachtet, die Möglichkeit, Medikamente genau nach diesem Maßstab zu entwerfen. Es könnte

dementsprechend eine Klasse an Therapeutika erzeugt werden, die in erster Linie darauf ausgerichtet ist, bestimmte phänotypische Änderungen durch Manipulation genetischer und epigenetischer Vorgänge zu bewirken. Indem man an einem solch hohen Punkt in der „Hierarchie“ eines Organismus eingreift, ergeben sich verständlicherweise neue und bisher nicht erkannte Therapiemöglichkeiten. Natürlich handelt es sich hierbei um Überlegungen, die weit in die Zukunft vorgreifen und eine stetige Entwicklung dieses Modells im Speziellen und der *Drosophila*-Forschung im Allgemeinen voraussetzen. Dennoch erscheint es allein schon aufgrund der Beobachtungen, die wir im Rahmen dieser Arbeit gemacht haben, für sinnvoll und richtig weiterhin ambitioniert und optimistisch zu bleiben.

4.8. Ausblick

Das „chronic social defeat“-Modell, das in der hier vorliegenden Arbeit detailliert erläutert und diskutiert wurde, kann mit seinen Stärken und Schwächen durchaus als Stellvertreter für die gesamte *Drosophila*-Forschung angesehen werden. Mit einer gut abstrahierten Idee und einem effizienten Versuchsprotokoll ist es möglich Modelle in Fruchtfliegen zu entwerfen, deren Potential genetische Zusammenhänge zu entschlüsseln, von keinem anderen Modellorganismus übertroffen wird. Da bisher Fruchtfliegen vornehmlich für recht basale Verhaltensweisen wie Paarung und Aggression verwendet wurden, stellt das hier vorgestellte „chronic social defeat“-Modell einen ersten Schritt in Richtung komplexerer und auch klinisch orientierter Verhaltensuntersuchungen dar. Die Möglichkeiten, die sich dabei ergeben – von der Suche nach potentiellen Kandidatengenen mittels RNA-Sequenzierung, über die Manipulation und Untersuchung einzelner Neurone bzw. Neuronenverbände bis hin zu Entzifferung übergeordneter epigenetischer Prozesse – sind derartig vielfältig, dass unser Modell hoffentlich nur einen Grundstein für weitere Entwicklungen darstellt. Was uns diesbezüglich optimistisch stimmt, ist die Tatsache, dass das Massachussetts General Hospital mit unserem Labor eine Kollaboration anstrebt, die auf den Ergebnissen meines Modells beruht. Dieses Projekt hat sich zum Ziel gesetzt mein Modell noch weiter zu vereinfachen und, wie bereits in der Diskussion beschrieben, an einigen Stellen zu automatisieren, um daraus ein Hochdurchsatz-Verfahren zu entwickeln. Dieses könnte im besten Falle als ein erstes Screeningverfahren für neue Medikamente dienen, was natürlich ganz im Interesse der klinisch tätigen Psychiater wäre. Diese jüngsten Entwicklungen sind nicht nur als Validierung unseres Modelles zu verstehen, sondern zeigen auch das Potential unserer Arbeit auf. Es bleibt zu hoffen, dass wir und auch andere Arbeitsgruppen in der Lage sein werden, dieses Modell weiter zu verfeinern und damit unseren Beitrag zur Entschlüsselung der depressiven Störung, einer der aktuell größten Bürden unserer Gesellschaft, leisten zu können.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit, welche von März 2011 bis April 2012 im Labor von Prof. Kravitz an der Harvard Medical School ausgetragen wurde, bestand darin ein „chronic social defeat“-Modell im *Drosophila melanogaster*-Organismus zu etablieren. Hierfür diente uns das Mausmodell von Eric Nestler und Kollegen als theoretische Grundlage. Nach mehreren Testläufen zur Feinjustierung des Protokolls, gelangten wir letztendlich zu einem achttägigen Versuchsablauf, der sich zusammensetzt aus sechs Tagen sozialer Niederlagen („chronic social defeat“-Erfahrung im engeren Sinne), einem Testkampf am siebten, sowie einer Saccharosepräferenzanalyse am achten Tag.

Die ersten sechs Tage des Experimentes bestanden aus den sogenannten Trainingskämpfen, bei denen CS-Fliegen jeden Tag gegen eine hochaggressive „bully“-Fliege antraten. Gewann eine CS-Fliege einen dieser Trainingskämpfe oder verlor ihn nicht eindeutig, so wurde sie umgehend aus dem Versuchsablauf aussortiert. Am Ende der sechstätigen „chronic social defeat“-Phase erhielten wir somit eine Gruppe an „chronischen Verlierern“, die definitiv sechs Kämpfe in sechs Tagen gegen die kämpferisch überlegenen „bullies“ verloren hatten. Im Sinne der bereits etablierten „learned helplessness“- bzw. Depressionsmodelle in Säugetieren untersuchten wir auch unsere „chronische Verlierer“-Population auf etwaige phänotypische Veränderungen. Aufgrund der Simplizität des *Drosophila melanogaster*-Organismus war unser Spektrum an Verhaltensuntersuchungen eingeschränkt. Dennoch fanden wir mit dem Testkampf und der Saccharosepräferenzanalyse zwei geeignete Tests, die den abstrahierten Depressionsparadigmen der Säugetiermodelle nachempfunden waren. Im Testkampf ließen wir die „chronische Verlierer“-Fliege gegen eine naive CS-Fliege antreten, die ihr in hohem Maße ähnelte (Größe, Alter, CS-Genotyp) und somit einen ebenbürtigen Gegner darstellte. Hierbei zeigte sich, dass „chronische Verlierer“-Fliegen eine signifikante Reduktion ihrer Kampfkraft aufwiesen und den naiven CS-Fliegen klar unterlegen waren. Dieser Effekt war auch am 13. Tag – eine Woche nach dem letzten Trainingskampf – noch signifikant nachweisbar. Unsere Verhaltenstestung wurde komplettiert durch die Saccharosepräferenzanalyse, bei der die „chronischen Verlierer“-Fliegen die Wahl zwischen normaler Fliegennahrung und gesüßter Fliegennahrung mit dem doppelten Saccharosegehalt hatten. Hierbei wiesen die „chronischen Verlierer“-Fliegen im Vergleich zu naiven CS-Fliegen eine signifikant verringerte Präferenz für die süße Nahrung auf. Diese Abschwächung der Präferenz für süße Nahrung wurde von Eric Nestler in seinem Mausmodell bereits als

anhedonische Verhaltensänderung interpretiert. Die Saccharosepräferenzanalyse gestattete uns auch, die gesamte Nahrungsaufnahme der Fliegen zu berechnen. Hierbei wurde ersichtlich, dass die „chronischen Verlierer“ weniger Nahrung zu sich nahmen als naive CS-Fliegen. Diese phänotypischen Testungen verfeinerten wir noch weiter, indem wir die Ergebnisse des Testkampfes genauer aufschlüsselten und so die Gruppe der „chronischen Verlierer“ in zwei Subpopulation aufteilten. War eine „chronische Verlierer“-Fliege am siebten Tag immer noch in der Lage ihren Gegner im Testkampf zu besiegen oder einen ausdauernden Kampf zu liefern und erst nach mindestens vier Attacken (sogenannten „lunges“) des Gegners den Kampf zu verlieren, so wurde diese Fliege als „resistent“ bezeichnet. Zeigte die Fliege jedoch kaum kämpferische Handlungen und gab bereits nach 3 oder weniger Attacken auf, so wurde diese Fliege als „empfänglich“ klassifiziert. Diese Einteilung gab uns die Möglichkeit, die Ergebnisse der Saccharosepräferenzanalyse genauer zu analysieren. Hierbei stellte sich heraus, dass nur die „empfänglichen“ Fliegen eine signifikante Reduktion ihrer Saccharosepräferenz aufwiesen, während sich die „resistenten“ Fliegen im Essverhalten nicht von naiven CS-Fliegen unterschieden. Dieses veränderte Essverhalten konnte am achten Tag in der SPA mit hoher Signifikanz nachgewiesen werden, ließ sich jedoch im Gegensatz zu der Aggressionsminderung eine Woche später nicht mehr detektieren.

Aufgrund der klinischen Relevanz im Kontext der menschlichen Depression stand der Neurotransmitter Serotonin und dessen mögliche Beteiligung am „chronischen Verlierer“-Phänotyp bzw. der Entstehung von „resistenten“ und „empfänglichen“ Subpopulationen im Fokus unserer nachfolgenden Experimente. Zunächst hielten wir CS-Fliegen auf einer speziellen Fliegennahrung, die zusätzlich mit α-Methyltryptophan versetzt war, welches die Serotoninproduktion im ZNS der Fliege drastisch senkt. Diese Fliegen verwendeten wir in unserem „chronic social defeat“-Modell und erhielten dadurch erste Hinweise für eine maßgebliche Rolle von Serotonin im „chronic social defeat“-Prozess. Aufgrund einer massiven Aggressionsreduktion konnten die Testkämpfe der Fliegen nicht ausgewertet werden, jedoch zeigten die Fliegen eine sehr hohe Saccharosepräferenz, die sich auch durch „chronic social defeat“ nicht verringerte. Nachfolgend verwendeten wir das GAL4-UAS-System, mit dem wir die serotonerge Transmission auf unterschiedliche Art und Weise manipulieren konnten. Ein erster Versuch mit *TpHxShi*^{ts1}-Fliegen, der eine Verringerung der Tryptophan-Hydroxylase-Aktivität mittels Temperatursteigerung vorsah, war nicht erfolgreich. Da wir den Testkampf und die SPA bei 19°C durchführen mussten, waren die Fliegen hierbei so stark immobilisiert, dass eine Auswertung der beiden Tests nicht mehr möglich war. Dahingegen erwiesen sich die

d5-HT$_{1B}$xRNAi-Fliegen als überaus ertragreiche Versuchssubjekte. Hierbei handelte es sich um eine Kreuzung, bei der wir mittels RNA-Interferenz einen knock-down des serotonergen d5-HT$_{1B}$-Rezeptors herbeiführten. Auf diese Fliegen schien „chronic social defeat“ nun keinen Effekt mehr zu haben. Sowohl das Kampfverhalten als auch die Nahrungsaufnahme waren bei dieser Kreuzung nach den sozialen Niederlagen mit naiven CS-Fliegen vergleichbar. Der d5-HT$_{1B}$-Rezeptor der Drosophila besitzt eine hohe sequenzielle Ähnlichkeit zum menschlichen 5-HT$_{1A}$-Rezeptor, der aktuell sehr intensiv im Zusammenhang mit der menschlichen Depression beforscht wird. Dies kann gleichermaßen als erste Validierung unseres Modells und als Grundlage für weitere Experimente gesehen werden.

Letztendlich gelangten wir mit unserem Experiment zu dem Schluss, dass sich mithilfe von „chronic social defeat“ spezifische Verhaltensänderungen in *Drosophila melanogaster* auslösen lassen und dass man durch Blockade der serotonergen d5-HT$_{1B}$-Transmission Resistenz gegenüber der Erfahrung sozialer Niederlagen herbeiführen kann. Darauf aufbauend streben wir aktuell eine noch genauere Aufschlüsselung der zugrundeliegenden Mechanismen auf genetischer bzw. epigenetischer Ebene an. Eine Kooperation mit dem Massachussetts General Hospital zur weiteren Verfeinerung und Vereinfachung des entwickelten „chronic social defeat“-Protokolls im Sinne eines Hochdurchsatz-Verfahrens sind bereits geplant. Ebenso befinden wir uns in der Planungsphase mittels zelltyp-spezifischer RNA-Sequenzierungstechniken bzw. epigenetischer Untersuchungsmethoden die exakten biologischen Zusammenhänge von Resistenz und „Empfänglichkeit“ gegenüber „chronic social defeat“ weiter zu ergründen.

6. Danksagung

Ich möchte mich bei Jill Mellis Penn bedanken, die mittlerweile viel mehr als nur eine Betreuerin für mich ist. Abseits des Fachlichen stand sie mir auch in den schwierigeren Zeiten in Boston zur Seite, woraus sich im Laufe der Jahre eine Freundschaft entwickelt hat, die ich bewahren werde.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Edward Kravitz, meinem Doktorvater an der Harvard Medical School, bedanken. Er gab mir die Möglichkeit meinen Traum zu verwirklichen, förderte und forderte mich und gab mir das Gefühl nicht nur ein Student aus Deutschland, sondern ein Teil seiner Familie zu sein.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem meinem Doktorvater in München, Prof. Michael Meyer vom Physiologischen Institut der LMU München. Die Arbeit und Geduld, die Prof. Meyer aufwendete, um einen Doktoranden zu betreuen, der nicht in seinem Labor geforscht hatte und eine Doktorarbeit zu korrigieren, die ihm keine Publikation einbringen würde, kann nicht hoch genug geschätzt werden. Ich bedanke mich für all die Stunden, die ich mit ihm verbringen durfte. Abseits der fachlichen Diskussionen blickten wir auch über den Tellerrand hinaus und führten Gespräche, deren Echo noch lange nachhallen wird.

Des Weiteren danke ich allen Personen, die in verschiedenster Art und Weise an der hier vorgelegten Arbeit beteiligt waren: meinen Kollegen aus dem Kravitz Labor, namentlich Olga Alekseyenko, Francesca Reindel, Yick-Bun Chan, Adelaine Leung, Kyle Gobrogge, Maria de la Paz Fernandez, Budhaditya Chowdhury, Richard Sima, Ran Li, Sarahi Cisneros und Laura Parker sowie meinen Kollegen vor Ort an der LMU Tamas Schauer und Andreas Thomae.

Außerdem möchte ich mich bei der Studienstiftung des deutschen Volkes sowie beim Max-Weber-Programm bedanken. Über die gesamte Dauer meines Studiums wurde ich von beiden Organisationen in herausragender Weise finanziell und ideell gefördert. Kostspielige Unternehmungen wie der einjährige Aufenthalt an der Harvard Medical School wären ohne eine solche Unterstützung nicht denkbar gewesen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Ohne sie wäre nichts von alledem möglich gewesen.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geschlechtsspezifische Unterschiede bei *Drosophila melanogaster*.....9
Abbildung 2: Abdominalansicht männlicher und weiblicher Fliegen. 10
Abbildung 3: Lebenszyklus der Drosophila melanogaster 11
Abbildung 4: Schematische Darstellung des *Drosophila melanogaster*-Genoms. 12
Abbildung 5: Das ZNS der Drosophila melanogaster in der Frontalansicht.....16
Abbildung 6: *Drosophila melanogaster* in Standardgefäßen und Gruppengefäßen 25
Abbildung 7: GAL4/UAS-System. 27
Abbildung 8: Aufbau der Arena.....29
Abbildung 9: Verschiedene Szenen aus Fliegenkämpfen. 30
Abbildung 10: Ablauf des „chronic social defeat"-Protokolls. 36
Abbildung 11: Darstellung des experimentellen SPA-Ansatzes. 39
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Serotoninsynthese in *Drosophila melanogaster*. 43
Abbildung 13: „chronic social defeat"-Protokoll mit α-MTP-Zusatz.....43
Abbildung 14: Darstellung der Temperaturwirkung auf ein Neuron der *TpHxShi^{ts1}*-Kreuzung. 45
Abbildung 15: Temperaturmodifizierter Ablauf bei Verwendung von *TpHxShi^{ts1}*. 47
Abbildung 16: Schematische Darstellung des RNA-Interferenzvorgangs. 52
Abbildung 17: Schematischer Aufbau der Tage 7 und 8 des „chronic social defeat"-Protokolls.....64
Abbildung 18: Ablauf des „chronic social defeat"-Protokolls mit Isolationsperiode. 67
Abbildung 19: Quantifizierungsmethoden der Nahrungsaufnahme von Drosophila melanogaster.....87

7.2. Figurenverzeichnis

Figur 1: Phänotypische Effekte von „chronic social defeat" auf das Kampfverhalten. 56
Figur 2: Verringerung der SPR bei „chronischen Verlierern". 57
Figur 3: Verringerung der GNA bei „chronischen Verlierern" 58
Figur 4: Auswirkungen von Gewinn und Verlust eines einmaligen Kampfes auf SPR und GNA 59
Figur 5: Kumulatives Histogramm der „lunges" vor der ersten Aufgabe bei CS-Fliegen.....63
Figur 6: Vergleich der SPR der drei experimentellen Hauptgruppen. 66
Figur 7: Auswirkungen der Isolationsperiode auf das Kampfverhalten der „chronischen Verlierer". .68
Figur 8: α-MTP-Effekte auf die SPR von CS und „chronischen Verlierern". 72
Figur 9: α-MTP-Effekte auf die GNA von CS und „chronischen Verlierern". 73
Figur 10: *d5-HT$_{1B}$xRNAi*-Fliegen: Testkampf zwischen naiven und „chronischen Verlierern". 76
Figur 11: Einfluss der d5-HT$_{1B}$-Suppression auf die Saccharosepräferenz. 78
Figur 12: Vergleich der Saccharosepräferenz anhand des Resultats des Testkampfes. 79
Figur 13: Einfluss der d5-HT$_{1B}$-Suppression auf die GNA.....81
Figur 14: Vergleich der GNA anhand des Resultats des Testkampfes. 82
Figur 15: X/Y-Diagramm der ursprünglichen SPR-Berechnung und einer alternativen Variante 102

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chromosomenkonstitutionen und Geschlechtsphänotypen bei Drosophila. 13
Tabelle 2: Übersicht der verschiedenen Verhaltensmuster der Fliegen während eines Kampfes..... 32

7.4. Inhalt der beigefügten DVD mit Videobeispielen

- Film 1) Fencing
- Film 2) Holding
- Film 3) Wing Threat
- Film 4) Lunge Nr.1
- Film 5) Lunge Nr. 2
- Film 6) Kampfbeispiel Nr. 1 (Anfang eines Kampfes)
- Film 7) Kampfbeispiel Nr. 2 (beide Fliegen aggressiv)
- Film 8) Kampfbeispiel Nr. 3 (mit Hierarchiebildung)
- Film 9) Kampfbeispiel Nr. 4 (Dominanz und Verteidigung des Gebiets)

Tabelle 1: Chromosomenkonstitutionen und Geschlechtsphänotypen bei Drosophila. 13
Tabelle 2: Übersicht der verschiedenen Verhaltensmuster der Fliegen während eines Kampfes..... 32

7.5. Matlab-Script zur Berechnung der SPR-Funktion

```
%% script for DA
P = [0 : 0.01 : 0.99, 1 : 0.1 : 9.9 , 10 : 1 : 150];
Data_Matrix = [];
for i = 1:numel(P)
    Data_Matrix(i,1) = P(i);
    Data_Matrix(i,2) = P(i)/(1+P(i));
end
sz = 10;
s = scatter(Data_Matrix(:,1),Data_Matrix(:,2),sz,'filled')
saveas(s,'SPR_Plot.png')
```

7.6. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HTP	5-Hydroxytrypophan
8-OH-DPAT	7-(Dipropylamino)-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-ol
ADP	Adenosindiphosphat
AR	Allura Red
ATP	Adenosintriphosphat
BB	Brilliant Blue
BDNF	brain derived neurotrophic factor

CA1	Cornu ammonis-Region 1 (Hippocampus)
CAFE	Capillary Feeder
CHARM	Comprehensive High-throughput Arrays for Relative Methylation
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CpG	Cytosin-Guanosin-Nukleotid-Dimer
CR	corticoid receptor (Kortikoidrezeptor)
CSD	chronic social defeat
CS-Fliegen	Canton S-Fliegen (Wildtyp-Fliegen)
DALY	Disease Adjusted Life Years
DDC	DOPA-Decarboxylase
DEGS1-Studie	Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland
DGPPN	Dt. Ges. für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
dsRNA	double-stranded RNA
GNA	Gesamtnahrungsaufnahme
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IQA	Interquartilsabstand
LSD	Lysergsäurediethylamid
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NRI	Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren
PBS	Phosphate buffered saline
PPL1	protozerebraler posteriorer lateraler Cluster 1
RISC	RNA-induced silencing protein complex
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
Shi	Shibire
siRNA	small interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SNRI	Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren
SPA	Saccharosepräferenzanalyse
SPR	Saccharosepräferenzratio
SSRI	Selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren

TK	Testkampf
TpH	Tryptophan-Hydroxylase
TRAP	translating ribosome affinity purification
UAS	Upstream Activation Sequence
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
α-MTP	α-Methyltryptophan

8. Literaturverzeichnis

Abbott, J. K., Innocenti, P., Chippindale, A. K., and Morrow, E. H. (2013). "Epigenetics and sex-specific fitness: an experimental test using male-limited evolution in Drosophila melanogaster." *PLoS One*, 8(7), e70493.

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., et al. (2000). "The genome sequence of Drosophila melanogaster." *Science*, 287(5461), 2185-95.

Albert, P. R., Le Francois, B., and Millar, A. M. (2011). "Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness." *Mol Brain*, 4, 21.

Alekseyenko, O. V., Chan, Y. B., Li, R., and Kravitz, E. A. (2013). "Single dopaminergic neurons that modulate aggression in Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(15), 6151-6.

Alekseyenko, O. V., Lee, C., and Kravitz, E. A. (2010). "Targeted manipulation of serotonergic neurotransmission affects the escalation of aggression in adult male Drosophila melanogaster." *PLoS One*, 5(5), e10806.

Andrejak, M., and Tribouilloy, C. (2013). "Drug-induced valvular heart disease: an update." *Arch Cardiovasc Dis*, 106(5), 333-9.

Angles, M. R., Ocana, D. B., Medellin, B. C., and Tovilla-Zarate, C. (2012). "No association between the HTR1A gene and suicidal behavior: a meta-analysis." *Rev Bras Psiquiatr*, 34(1), 38-42.

Ardekani, R., Biyani, A., Dalton, J. E., Saltz, J. B., Arbeitman, M. N., Tower, J., Nuzhdin, S., and Tavare, S. (2013). "Three-dimensional tracking and behaviour monitoring of multiple fruit flies." *J R Soc Interface*, 10(78), 20120547.

Armbruster, D., Mueller, A., Strobel, A., Lesch, K. P., Brocke, B., and Kirschbaum, C. (2011). "Predicting cortisol stress responses in older individuals: influence of serotonin receptor 1A gene (HTR1A) and stressful life events." *Horm Behav*, 60(1), 105-11.

Avgustinovich, D. F., Kovalenko, I. L., and Kudryavtseva, N. N. (2005). "A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology." *Neurosci Behav Physiol*, 35(9), 917-24.

Becnel, J., Johnson, O., Luo, J., Nassel, D. R., and Nichols, C. D. (2011). "The serotonin 5-HT7Dro receptor is expressed in the brain of Drosophila, and is essential for normal courtship and mating." *PLoS One*, 6(6), e20800.

Berry, J., Krause, W. C., and Davis, R. L. (2008). "Olfactory memory traces in Drosophila." *Prog Brain Res*, 169, 293-304.

Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development*, 118(2), 401-15.

Busch, M. A., Maske, U. E., Ryl, L., Schlack, R., and Hapke, U. (2013). "Prävalenz von depressiver Symptomatik und diagnostizierter Depression bei Erwachs enen in Deutschland - Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1)." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56(5/6), 733-739.

Cai, X., Kallarackal, A. J., Kvarta, M. D., Goluskin, S., Gaylor, K., Bailey, A. M., Lee, H. K., Huganir, R. L., and Thompson, S. M. (2013). "Local potentiation of excitatory synapses by serotonin and its alteration in rodent models of depression." *Nat Neurosci*, 16(4), 464-72.

Caldarone, B. J., George, T. P., Zachariou, V., and Picciotto, M. R. (2000). "Gender differences in learned helplessness behavior are influenced by genetic background." *Pharmacol Biochem Behav*, 66(4), 811-7.

Capuano, F., Mulleder, M., Kok, R., Blom, H. J., and Ralser, M. (2014). "Cytosine DNA Methylation Is Found in Drosophila melanogaster but Absent in Saccharomyces

cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, and Other Yeast Species." *Anal Chem*, 86(8), 3697-702.

Castagne, V., Moser, P., and Porsolt, R. D. (2009). "Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents", in J. J. Buccafusco, (ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Boca Raton (FL).

Cenik, E. S., Fukunaga, R., Lu, G., Dutcher, R., Wang, Y., Tanaka Hall, T. M., and Zamore, P. D. (2011). "Phosphate and R2D2 restrict the substrate specificity of Dicer-2, an ATP-driven ribonuclease." *Mol Cell*, 42(2), 172-84.

Certel, S. J., and Kravitz, E. A. (2012). "Scoring and analyzing aggression in Drosophila." *Cold Spring Harb Protoc*, 2012(3), 319-25.

Chen, S., Lee, A. Y., Bowens, N. M., Huber, R., and Kravitz, E. A. (2002). "Fighting fruit flies: a model system for the study of aggression." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 5664-8.

Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E., and Gribskov, M. (2002). "Homophila: human disease gene cognates in Drosophila." *Nucleic Acids Res*, 30(1), 149-51.

Chintapalli, V. R., Wang, J., and Dow, J. A. (2007). "Using FlyAtlas to identify better Drosophila melanogaster models of human disease." *Nat Genet*, 39(6), 715-20.

Crisafulli, C., Chiesa, A., Han, C., Lee, S. J., Park, M. H., Balzarro, B., Andrisano, C., Patkar, A. A., Pae, C. U., and Serretti, A. (2012). "Case-control association study for 10 genes in patients with schizophrenia: influence of 5HTR1A variation rs10042486 on schizophrenia and response to antipsychotics." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 262(3), 199-205.

Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics, C., Lee, S. H., Ripke, S., Neale, B. M., Faraone, S. V., Purcell, S. M., Perlis, R. H., Mowry, B. J., Thapar, A., Goddard, M. E., Witte, J. S., Absher, D., Agartz, I., Akil, H., Amin, F., Andreassen, O. A., Anjorin, A., Anney, R., Anttila, V., Arking, D. E., Asherson, P., Azevedo, M. H., Backlund, L., Badner, J. A., Bailey, A. J., Banaschewski, T., Barchas, J. D., Barnes, M. R., Barrett, T. B., Bass, N., Battaglia, A., Bauer, M., Bayes, M., Bellivier, F., Bergen, S. E., Berrettini, W., Betancur, C., Bettecken, T., Biederman, J., Binder, E. B., Black, D. W., Blackwood, D. H., Bloss, C. S., Boehnke, M., Boomsma, D. I., Breen, G., Breuer, R., Bruggeman, R., Cormican, P., Buccola, N. G., Buitelaar, J. K., Bunney, W. E., Buxbaum, J. D., Byerley, W. F., Byrne, E. M., Caesar, S., Cahn, W., Cantor, R. M., Casas, M., Chakravarti, A., Chambert, K., Choudhury, K., Cichon, S., Cloninger, C. R., Collier, D. A., Cook, E. H., Coon, H., Cormand, B., Corvin, A., Coryell, W. H.,

Craig, D. W., Craig, I. W., Crosbie, J., Cuccaro, M. L., Curtis, D., Czamara, D., Datta, S., Dawson, G., Day, R., De Geus, E. J., Degenhardt, F., Djurovic, S., Donohoe, G. J., Doyle, A. E., Duan, J., Dudbridge, F., Duketis, E., Ebstein, R. P., Edenberg, H. J., Elia, J., Ennis, S., Etain, B., Fanous, A., Farmer, A. E., Ferrier, I. N., Flickinger, M., Fombonne, E., Foroud, T., Frank, J., Franke, B., et al. (2013). "Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs." *Nat Genet*, 45(9), 984-94.

Cryan, J. F., and Holmes, A. (2005). "The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety." *Nat Rev Drug Discov*, 4(9), 775-90.

Daly, E. J., Trivedi, M. H., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Gaynes, B. N., Warden, D., Morris, D. W., Luther, J. F., Farabaugh, A., Cook, I., and Rush, A. J. (2010). "Health-related quality of life in depression: a STAR*D report." *Ann Clin Psychiatry*, 22(1), 43-55.

Dankert, H., Wang, L., Hoopfer, E. D., Anderson, D. J., and Perona, P. (2009). "Automated monitoring and analysis of social behavior in Drosophila." *Nat Methods*, 6(4), 297-303.

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

Der-Avakian, A., Mazei-Robison, M. S., Kesby, J. P., Nestler, E. J., and Markou, A. (2014). "Enduring Deficits in Brain Reward Function after Chronic Social Defeat in Rats: Susceptibility, Resilience, and Antidepressant Response." *Biol Psychiatry*, E-Pub ahead of Print.

Deshpande, S. A., Carvalho, G. B., Amador, A., Phillips, A. M., Hoxha, S., Lizotte, K. J., and Ja, W. W. (2014). "Quantifying Drosophila food intake: comparative analysis of current methodology." *Nat Methods*, 11(5), 535-40.

DGPPN/S3-Leitlinie. (2009). "S3-Leitlinie/Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression-Kurzfassung, 1. Auflage 2009." DGPPN, BÄK, KBV, AWMF, AkdÄ, BPtK, BApK, DAGSHG, DEGAM, DGPM, DGPs, DGRW (Hrsg.) für die Leitliniengruppe Unipolare Depression, S. 54.

Dierick, H. A., and Greenspan, R. J. (2007). "Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression." *Nat Genet*, 39(5), 678-82.

Duffy, J. B. (2002). "GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife." *Genesis*, 34(1-2), 1-15.

Dus, M., Min, S., Keene, A. C., Lee, G. Y., and Suh, G. S. (2011). "Taste-independent detection of the caloric content of sugar in Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(28), 11644-9.

Edgecomb, R. S., Harth, C. E., and Schneiderman, A. M. (1994). "Regulation of feeding behavior in adult Drosophila melanogaster varies with feeding regime and nutritional state." *J Exp Biol*, 197, 215-35.

Egawa, J., Endo, T., Tamura, R., Masuzawa, N., Fukui, N., Sugai, T., and Someya, T. (2012). "Influence of the 5-HTR1A C-1019G polymorphism on clinical phenotypes of autism spectrum disorders." *Psychiatry Res*, 198(2), 336-7.

Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate." *EMBO J*, 20(23), 6877-88.

Elbers, P. W., Ozdemir, A., van Iterson, M., van Dongen, E. P., and Ince, C. (2009). "Microcirculatory imaging in cardiac anesthesia: ketanserin reduces blood pressure but not perfused capillary density." *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 23(1), 95-101.

Etges, W., Marshall, C. (2007). "https://stockcenter.ucsd.edu/index.php?table=Species&action=view&id=1970." 31.08.2014.

Ferrari, A. J., Charlson, F. J., Norman, R. E., Patten, S. B., Freedman, G., Murray, C. J., Vos, T., and Whiteford, H. A. (2013). "Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010." *PLoS Med*, 10(11), e1001547.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." *Nature*, 391(6669), 806-11.

Flügge, G. (2012). "11.1 Serotonin", *Handbuch der Psychopharmakotherapie, 2. Auflage*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: G. Gründer, O. Benkert (Hrsg.), pp. 116-118.

Förstl, H. (2009). "25.2.1 Borderline-Persönlichkeitsstörung: diagnostische Kriterien und klinische Symptomatik: Neurobiologische Befunde", *Theory of Mind, 2. Auflage*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: H. Förstl (Hrsg.), pp. 305-306.

Guven-Ozkan, T., and Davis, R. L. (2014). "Functional neuroanatomy of Drosophila olfactory memory formation." *Learn Mem*, 21(10), 519-26.

Halberstadt, A. L., and Geyer, M. A. (2011). "Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens." *Neuropharmacology*, 61(3), 364-81.

Hammond, S. M. (2005). "Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway." *FEBS Lett*, 579(26), 5822-9.

Hamon, M., and Blier, P. (2013). "Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 54-63.

Härter, M., Schneider, F. (2012). "21.1 Affektive Störungen - Definition", *Facharztwissen Psychiatrie und Psychotherapie, 1. Auflage*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: F. Schneider (Hrsg.), pp. 296-299.

Heisenberg, M. (2003). "Mushroom body memoir: from maps to models." *Nat Rev Neurosci*, 4(4), 266-75.

Hettema, J. M., An, S. S., van den Oord, E. J., Neale, M. C., Kendler, K. S., and Chen, X. (2008). "Association study between the serotonin 1A receptor (HTR1A) gene and neuroticism, major depression, and anxiety disorders." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B(5), 661-6.

Hirata, Y., Zai, C. C., Souza, R. P., Lieberman, J. A., Meltzer, H. Y., and Kennedy, J. L. (2012). "Association study of GRIK1 gene polymorphisms in schizophrenia: case-control and family-based studies." *Hum Psychopharmacol*, 27(4), 345-51.

Hodoniczky, J., Robinson, G. J., McGraw, E. A., and Rae, A. L. (2010). "Fruit fly bioassay to distinguish "sweet" sugar structures." *J Agric Food Chem*, 58(24), 12885-9.

Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, P. R., and Humphrey, P. P. (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." *Pharmacol Rev*, 46(2), 157-203.

Huang, C. C., Yeh, C. M., Wu, M. Y., and Hsu, K. S. (2013). "A single in vivo cocaine administration impairs 5-HT(1B) receptor-induced long-term depression in the nucleus accumbens." *J Neurochem*, 125(6), 809-21.

Huser, A., Rohwedder, A., Apostolopoulou, A. A., Widmann, A., Pfitzenmaier, J. E., Maiolo, E. M., Selcho, M., Pauls, D., von Essen, A., Gupta, T., Sprecher, S. G., Birman, S., Riemensperger, T., Stocker, R. F., and Thum, A. S. (2012). "The serotonergic central nervous system of the Drosophila larva: anatomy and behavioral function." *PLoS One*, 7(10), e47518.

ICD-10. (2014). "Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10.Revision, Version 2014." S. 835.

Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Carvalho, B., Wu, H., Brandenburg, S. A., Jeddeloh, J. A., Wen, B., and Feinberg, A. P. (2008). "Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM)." *Genome Res*, 18(5), 780-90.

Jacobson-Pick, S., Audet, M. C., McQuaid, R. J., Kalvapalle, R., and Anisman, H. (2013). "Social agonistic distress in male and female mice: changes of behavior and brain monoamine functioning in relation to acute and chronic challenges." *PLoS One*, 8(4), e60133.

Jänig, W., Birbaumer, N. (2011). "Integrative Leistungen des Nervensystems - mesolimbisches Dopaminsystem", *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, 31. Auflage*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M. (Hrsg.), pp. 226-230.

Jannig, W., Knust, E. (2008a). "Die Fliege Drosophila melanogaster", *Genetik - Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik*. Thieme Verlagsgruppe, pp. 345.

Jannig, W., Knust, E. (2008b). "Genetik der Geschlechtsbestimmung I", *Genetik - Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik*. Thieme Verlagsgruppe, pp. 79 - 80.

Johnson, O., Becnel, J., and Nichols, C. D. (2009). "Serotonin 5-HT(2) and 5-HT(1A)-like receptors differentially modulate aggressive behaviors in Drosophila melanogaster." *Neuroscience*, 158(4), 1292-300.

Johnson, O., Becnel, J., and Nichols, C. D. (2011). "Serotonin receptor activity is necessary for olfactory learning and memory in Drosophila melanogaster." *Neuroscience*, 192, 372-81.

Jones, W. D. (2009). "The expanding reach of the GAL4/UAS system into the behavioral neurobiology of Drosophila." *BMB Rep*, 42(11), 705-12.

Kain, J., Stokes, C., Gaudry, Q., Song, X., Foley, J., Wilson, R., and de Bivort, B. (2013). "Leg-tracking and automated behavioural classification in Drosophila." *Nat Commun*, 4, 1910.

Kamata, M., Suzuki, A., Yoshida, K., Takahashi, H., Higuchi, H., and Otani, K. (2011). "Genetic polymorphisms in the serotonergic system and symptom clusters of major depressive disorder." *J Affect Disord*, 135(1-3), 374-6.

Kamikouchi, A., Inagaki, H. K., Effertz, T., Hendrich, O., Fiala, A., Gopfert, M. C., and Ito, K. (2009). "The neural basis of Drosophila gravity-sensing and hearing." *Nature*, 458(7235), 165-71.

Kang, H. J., Kim, J. M., Lee, J. Y., Kim, S. Y., Bae, K. Y., Kim, S. W., Shin, I. S., Kim, H. R., Shin, M. G., and Yoon, J. S. (2013). "BDNF promoter methylation and suicidal behavior in depressive patients." *J Affect Disord*, 151(2), 679-85.

Karlovic, D., Serretti, A., Jevtovic, S., Vrkic, N., Seric, V., and Peles, A. M. (2013). "Diagnostic accuracy of serum brain derived neurotrophic factor concentration in antidepressant naive patients with first major depression episode." *J Psychiatr Res*, 47(2), 162-7.

Kasuya, J., Ishimoto, H., and Kitamoto, T. (2009). "Neuronal mechanisms of learning and memory revealed by spatial and temporal suppression of neurotransmission using shibire, a temperature-sensitive dynamin mutant gene in Drosophila melanogaster." *Front Mol Neurosci*, 2, 11.

Katz, M. M., Bowden, C. L., and Frazer, A. (2010). "Rethinking depression and the actions of antidepressants: uncovering the links between the neural and behavioral elements." *J Affect Disord*, 120(1-3), 16-23.

Khan, A., Faucett, J., Lichtenberg, P., Kirsch, I., and Brown, W. A. (2012). "A systematic review of comparative efficacy of treatments and controls for depression." *PLoS One*, 7(7), e41778.

Kim, H. K., Kim, S. J., Lee, Y. J., Lee, H. J., Kang, S. G., Choi, J. E., Yun, K. W., and Lim, W. J. (2011). "Influence of the interaction between the serotonin 1A receptor C-1019G polymorphism and negative life stressors on the development of depression." *Neuropsychobiology*, 64(1), 1-8.

Kim, T. E., Kim, J. R., Jung, J. A., Kim, S. R., Lee, J. W., Jun, H., Lee, S. Y., Huh, W., and Ko, J. (2013). "Comparison of pharmacokinetics between sarpogrelate hydrochloride immediate-release formulation and controlled-release formulation." *Int J Clin Pharmacol Ther*, 51(2), 114-9.

Kirkhart, C., and Scott, K. (2015). "Gustatory learning and processing in the Drosophila mushroom bodies." *J Neurosci*, 35(15), 5950-8.

Kishi, T., Tsunoka, T., Ikeda, M., Kawashima, K., Okochi, T., Kitajima, T., Kinoshita, Y., Okumura, T., Yamanouchi, Y., Inada, T., Ozaki, N., and Iwata, N. (2009). "Serotonin 1A receptor gene and major depressive disorder: an association study and meta-analysis." *J Hum Genet*, 54(11), 629-33.

Kishi, T., Yoshimura, R., Fukuo, Y., Okochi, T., Matsunaga, S., Umene-Nakano, W., Nakamura, J., Serretti, A., Correll, C. U., Kane, J. M., and Iwata, N. (2013). "The serotonin 1A receptor gene confer susceptibility to mood disorders: results from an

extended meta-analysis of patients with major depression and bipolar disorder." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 263(2), 105-18.

Kitamoto, T. (2001). "Conditional modification of behavior in Drosophila by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons." *J Neurobiol*, 47(2), 81-92.

Klein, M. T., and Teitler, M. (2009). "Guinea pig hippocampal 5-HT(1E) receptors: a tool for selective drug development." *J Neurochem*, 109(1), 268-74.

Klengel, T., Pape, J., Binder, E. B., and Mehta, D. (2014). "The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders." *Neuropharmacology*, 80C, 115-132.

Kramer, J. M., Kochinke, K., Oortveld, M. A., Marks, H., Kramer, D., de Jong, E. K., Asztalos, Z., Westwood, J. T., Stunnenberg, H. G., Sokolowski, M. B., Keleman, K., Zhou, H., van Bokhoven, H., and Schenck, A. (2011). "Epigenetic regulation of learning and memory by Drosophila EHMT/G9a." *PLoS Biol*, 9(1), e1000569.

Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., Lee, F. S., Tamminga, C. A., Cooper, D. C., Gershenfeld, H. K., and Nestler, E. J. (2007). "Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions." *Cell*, 131(2), 391-404.

Krishnan, V., and Nestler, E. J. (2008). "The molecular neurobiology of depression." *Nature*, 455(7215), 894-902.

Lai, J. S., Lo, S. J., Dickson, B. J., and Chiang, A. S. (2012). "Auditory circuit in the Drosophila brain." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(7), 2607-12.

Laje, G. (2013). "Pharmacogenetics of mood disorders: what clinicians need to know." *CNS Spectr*, 18(5), 272-84.

Lee, P. T., Lin, H. W., Chang, Y. H., Fu, T. F., Dubnau, J., Hirsh, J., Lee, T., and Chiang, A. S. (2011). "Serotonin-mushroom body circuit modulating the formation of anesthesia-resistant memory in Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(33), 13794-9.

Luckinbill, L. S. (1998). "Selection for longevity confers resistance to low-temperature stress in Drosophila melanogaster." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 53(2), B147-53.

Machado-Vieira, R., Salvadore, G., Luckenbaugh, D. A., Manji, H. K., and Zarate, C. A., Jr. (2008). "Rapid onset of antidepressant action: a new paradigm in the research and treatment of major depressive disorder." *J Clin Psychiatry*, 69(6), 946-58.

Mao, Z., and Davis, R. L. (2009). "Eight different types of dopaminergic neurons innervate the Drosophila mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity." *Front Neural Circuits*, 3, 5.

Mavridis, D., and Salanti, G. (2014). "Exploring and accounting for publication bias in mental health: a brief overview of methods." *Evid Based Ment Health*, 17(1), 11-5.

Menke, A., Klengel, T., Rubel, J., Bruckl, T., Pfister, H., Lucae, S., Uhr, M., Holsboer, F., and Binder, E. B. (2013). "Genetic variation in FKBP5 associated with the extent of stress hormone dysregulation in major depression." *Genes Brain Behav*, 12(3), 289-96.

Miczek, K. A., de Almeida, R. M., Kravitz, E. A., Rissman, E. F., de Boer, S. F., and Raine, A. (2007). "Neurobiology of escalated aggression and violence." *J Neurosci*, 27(44), 11803-6.

Monroe, S. M., Slavich, G. M., Torres, L. D., and Gotlib, I. H. (2007). "Major life events and major chronic difficulties are differentially associated with history of major depressive episodes." *J Abnorm Psychol*, 116(1), 116-24.

Moreno, S. G., Sutton, A. J., Turner, E. H., Abrams, K. R., Cooper, N. J., Palmer, T. M., and Ades, A. E. (2009). "Novel methods to deal with publication biases: secondary analysis of antidepressant trials in the FDA trial registry database and related journal publications." *BMJ*, 339, b2981.

Morrison, K. E., Bader, L. R., McLaughlin, C. N., and Cooper, M. A. (2013). "Defeat-induced activation of the ventral medial prefrontal cortex is necessary for resistance to conditioned defeat." *Behav Brain Res*, 243, 158-64.

Nall, A., and Sehgal, A. (2014). "Monoamines and sleep in Drosophila." *Behav Neurosci*, 128(3), 264-72.

Nestler, E. J., Gould, E., Manji, H., Buncan, M., Duman, R. S., Greshenfeld, H. K., Hen, R., Koester, S., Lederhendler, I., Meaney, M., Robbins, T., Winsky, L., and Zalcman, S. (2002). "Preclinical models: status of basic research in depression." *Biol Psychiatry*, 52(6), 503-28.

Nichols, C. D. (2006). "Drosophila melanogaster neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery." *Pharmacol Ther*, 112(3), 677-700.

Noro, M., Antonijevic, I., Forray, C., Kasper, S., Kocabas, N. A., Lecrubier, Y., Linotte, S., Mendlewicz, J., Montgomery, S., Snyder, L., Souery, D., Verbanck, P., Zohar, J., and

Massat, I. (2010). "5HT1A and 5HT2A receptor genes in treatment response phenotypes in major depressive disorder." *Int Clin Psychopharmacol*, 25(4), 228-31.

Nugent, A. C., Bain, E. E., Carlson, P. J., Neumeister, A., Bonne, O., Carson, R. E., Eckelman, W., Herscovitch, P., Zarate, C. A., Jr., Charney, D. S., and Drevets, W. C. (2013). "Reduced post-synaptic serotonin type 1A receptor binding in bipolar depression." *Eur Neuropsychopharmacol*, 23(8), 822-9.

Nykänen, A., Haley, B., and Zamore, P. D. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell*, 107(3), 309-21.

Papakostas, G. I., Perlis, R. H., Scalia, M. J., Petersen, T. J., and Fava, M. (2006). "A meta-analysis of early sustained response rates between antidepressants and placebo for the treatment of major depressive disorder." *J Clin Psychopharmacol*, 26(1), 56-60.

Papakostas, G. I., Shelton, R. C., Kinrys, G., Henry, M. E., Bakow, B. R., Lipkin, S. H., Pi, B., Thurmond, L., and Bilello, J. A. (2013). "Assessment of a multi-assay, serum-based biological diagnostic test for major depressive disorder: a pilot and replication study." *Mol Psychiatry*, 18(3), 332-9.

Penn, J. K., Zito, M. F., and Kravitz, E. A. (2010). "A single social defeat reduces aggression in a highly aggressive strain of Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(28), 12682-6.

Perez-Tejada, J., Arregi, A., Gomez-Lazaro, E., Vegas, O., Azpiroz, A., and Garmendia, L. (2013). "Coping with chronic social stress in mice: hypothalamic-pituitary-adrenal/sympathetic-adrenal-medullary axis activity, behavioral changes and effects of antalarmin treatment: implications for the study of stress-related psychopathologies." *Neuroendocrinology*, 98(1), 73-88.

Pfennig, A., Bschor, T., Falkai, P., and Bauer, M. (2013). "Diagnostik und Therapie bipolarer Störungen: Empfehlungen aus der aktuellen S3-Leitlinie." *Dtsch Arztebl Int*, 110(6), 92-100.

Phelps, C. B., and Brand, A. H. (1998). "Ectopic gene expression in Drosophila using GAL4 system." *Methods*, 14(4), 367-79.

Picouto, M. D., and Braquehais, M. D. (2013). "Use of antidepressants for major depressive disorder in children and adolescents: clinical considerations." *Int J Adolesc Med Health*, 25(3), 213-9.

Pooryasin, A., and Fiala, A. (2015). "Identified Serotonin-Releasing Neurons Induce Behavioral Quiescence and Suppress Mating in Drosophila." *J Neurosci*, 35(37), 12792-812.

Portella, M. J., de Diego-Adelino, J., Ballesteros, J., Puigdemont, D., Oller, S., Santos, B., Alvarez, E., Artigas, F., and Perez, V. (2011). "Can we really accelerate and enhance the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant effect? A randomized clinical trial and a meta-analysis of pindolol in nonresistant depression." *J Clin Psychiatry*, 72(7), 962-9.

Portella, M. J., de Diego-Adelino, J., Puigdemont, D., Perez-Egea, R., Alvarez, E., Artigas, F., and Perez, V. (2009). "Pindolol augmentation enhances response outcomes in first depressive episodes." *Eur Neuropsychopharmacol*, 19(7), 516-9.

Praefcke, G. J., and McMahon, H. T. (2004). "The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?" *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2), 133-47.

Pytliak, M., Vargova, V., Mechirova, V., and Felsoci, M. (2011). "Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications." *Physiol Res*, 60(1), 15-25.

Quigley, E. M. (2011). "Cisapride: what can we learn from the rise and fall of a prokinetic?" *J Dig Dis*, 12(3), 147-56.

Quitkin, F. M., Rabkin, J. G., Ross, D., and Stewart, J. W. (1984). "Identification of true drug response to antidepressants. Use of pattern analysis." *Arch Gen Psychiatry*, 41(8), 782-6.

Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., and Bier, E. (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster." *Genome Res*, 11(6), 1114-25.

Renn, S. C., Armstrong, J. D., Yang, M., Wang, Z., An, X., Kaiser, K., and Taghert, P. H. (1999). "Genetic analysis of the Drosophila ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex." *J Neurobiol*, 41(2), 189-207.

Rutz, S., and Scheffold, A. (2004). "Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems." *Arthritis Res Ther*, 6(2), 78-85.

Sabunciyan, S., Aryee, M. J., Irizarry, R. A., Rongione, M., Webster, M. J., Kaufman, W. E., Murakami, P., Lessard, A., Yolken, R. H., Feinberg, A. P., Potash, J. B., and Gen, R. E. D. C. (2012). "Genome-wide DNA methylation scan in major depressive disorder." *PLoS One*, 7(4), e34451.

Saudou, F., Boschert, U., Amlaiky, N., Plassat, J. L., and Hen, R. (1992). "A family of Drosophila serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns." *EMBO J*, 11(1), 7-17.

Schmitt, A., Malchow, B., Hasan, A., and Falkai, P. (2014). "The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders." *Front Neurosci*, 8, 19.

Schwärzel, M., and Müller, U. (2006). "Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain." *Cell Mol Life Sci*, 63(9), 989-98.

Serway, C. N., Kaufman, R. R., Strauss, R., and de Belle, J. S. (2009). "Mushroom bodies enhance initial motor activity in Drosophila." *J Neurogenet*, 23(1-2), 173-84.

Shohat-Ophir, G., Kaun, K. R., Azanchi, R., Mohammed, H., and Heberlein, U. (2012). "Sexual deprivation increases ethanol intake in Drosophila." *Science*, 335(6074), 1351-5.

Silva, B., Goles, N. I., Varas, R., and Campusano, J. M. (2014). "Serotonin receptors expressed in Drosophila mushroom bodies differentially modulate larval locomotion." *PLoS One*, 9(2), e89641.

Sitaraman, D., Laferriere, H., Birman, S., and Zars, T. (2012). "Serotonin is Critical for Rewarded Olfactory Short-Term Memory in Drosophila." *J Neurogenet*, 26(2), 238-44.

Sitaraman, D., Zars, M., Laferriere, H., Chen, Y. C., Sable-Smith, A., Kitamoto, T., Rottinghaus, G. E., and Zars, T. (2008). "Serotonin is necessary for place memory in Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(14), 5579-84.

Smith, C., Toohey, N., Knight, J. A., Klein, M. T., and Teitler, M. (2011). "Risperidone-induced inactivation and clozapine-induced reactivation of rat cortical astrocyte 5-hydroxytryptamine(7) receptors: evidence for in situ G protein-coupled receptor homodimer protomer cross-talk." *Mol Pharmacol*, 79(2), 318-25.

Speck, V., and Maihofner, C. (2013). "[Migraine - established concepts and new developments]." *Fortschr Neurol Psychiatr*, 81(6), 308-23.

St Johnston, D. (2013). "Using mutants, knockdowns, and transgenesis to investigate gene function in Drosophila." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2(5), 587-613.

Stilling, R. M., and Fischer, A. (2011). "A Drosophila model for the role of epigenetics in brain function and development." *Genome Biol*, 12(2), 103.

Sullivan, G. M., Ogden, R. T., Huang, Y. Y., Oquendo, M. A., Mann, J. J., and Parsey, R. V. (2013). "Higher in vivo serotonin-1a binding in posttraumatic stress disorder: a pet study with [11C]way-100635." *Depress Anxiety*, 30(3), 197-206.

Sullivan, P. F., Neale, M. C., and Kendler, K. S. (2000). "Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis." *Am J Psychiatry*, 157(10), 1552-62.

Svenningsson, P., Chergui, K., Rachleff, I., Flajolet, M., Zhang, X., El Yacoubi, M., Vaugeois, J. M., Nomikos, G. G., and Greengard, P. (2006). "Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states." *Science*, 311(5757), 77-80.

Tack, J., Camilleri, M., Chang, L., Chey, W. D., Galligan, J. J., Lacy, B. E., Muller-Lissner, S., Quigley, E. M., Schuurkes, J., De Maeyer, J. H., and Stanghellini, V. (2012). "Systematic review: cardiovascular safety profile of 5-HT(4) agonists developed for gastrointestinal disorders." *Aliment Pharmacol Ther*, 35(7), 745-67.

Thomas, A., Lee, P. J., Dalton, J. E., Nomie, K. J., Stoica, L., Costa-Mattioli, M., Chang, P., Nuzhdin, S., Arbeitman, M. N., and Dierick, H. A. (2012). "A versatile method for cell-specific profiling of translated mRNAs in Drosophila." *PLoS One*, 7(7), e40276.

Trivedi, M. H. (2006). "Major depressive disorder: remission of associated symptoms." *J Clin Psychiatry*, 67 Suppl 6, 27-32.

Turner, E. H., Matthews, A. M., Linardatos, E., Tell, R. A., and Rosenthal, R. (2008). "Selective publication of antidepressant trials and its influence on apparent efficacy." *N Engl J Med*, 358(3), 252-60.

Uddin, M., Koenen, K. C., Aiello, A. E., Wildman, D. E., de los Santos, R., and Galea, S. (2011). "Epigenetic and inflammatory marker profiles associated with depression in a community-based epidemiologic sample." *Psychol Med*, 41(5), 997-1007.

Venzala, E., Garcia-Garcia, A. L., Elizalde, N., Delagrange, P., and Tordera, R. M. (2012). "Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors." *Psychopharmacology (Berl)*, 224(2), 313-25.

Vermehren-Schmaedick, A., Scudder, C., Timmermans, W., and Morton, D. B. (2011). "Drosophila gustatory preference behaviors require the atypical soluble guanylyl cyclases." *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 197(7), 717-27.

Vollmayr, B., and Gass, P. (2013). "Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model." *Cell Tissue Res*, 354(1), 171-8.

Vosshall, L. B. (2007). "Into the mind of a fly." *Nature*, 450(7167), 193-7.

Waddell, S., Armstrong, J. D., Kitamoto, T., Kaiser, K., and Quinn, W. G. (2000). "The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the Drosophila brain that are critical for memory." *Cell*, 103(5), 805-13.

Whale, R., Terao, T., Cowen, P., Freemantle, N., and Geddes, J. (2010). "Pindolol augmentation of serotonin reuptake inhibitors for the treatment of depressive disorder: a systematic review." *J Psychopharmacol*, 24(4), 513-20.

Wilkinson, M. B., Xiao, G., Kumar, A., LaPlant, Q., Renthal, W., Sikder, D., Kodadek, T. J., and Nestler, E. J. (2009). "Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models." *J Neurosci*, 29(24), 7820-32.

Wilkinson, P., and Izmeth, Z. (2012). "Continuation and maintenance treatments for depression in older people." *Cochrane Database Syst Rev*, 11, CD006727.

Willner, P. (1997). "Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation." *Psychopharmacology (Berl)*, 134(4), 319-29.

Wong, R., Piper, M. D., Wertheim, B., and Partridge, L. (2009). "Quantification of food intake in Drosophila." *PLoS One*, 4(6), e6063.

Wu, Y., Xu, Y., Sun, Y., Wang, Y. F., Li, X., Lang, X. E., Wang, W. P., and Zhang, K. R. (2008). "Association between the serotonin 1A receptor C(-1019)G polymorphism and major depressive disorder in the northern Han ethnic group in China." *Chin Med J (Engl)*, 121(10), 874-6.

Yuan, Q., Joiner, W. J., and Sehgal, A. (2006). "A sleep-promoting role for the Drosophila serotonin receptor 1A." *Curr Biol*, 16(11), 1051-62.

Yuan, Q., Lin, F., Zheng, X., and Sehgal, A. (2005). "Serotonin modulates circadian entrainment in Drosophila." *Neuron*, 47(1), 115-27.

Yurkovic, A., Wang, O., Basu, A. C., and Kravitz, E. A. (2006). "Learning and memory associated with aggression in Drosophila melanogaster." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(46), 17519-24.

Zeuzern, S., Rösch, W. (2013). "E 1.3.2 Gastroenterologie - Erbrechen", *Duale Reihe Innere Medizin, 3. Auflage*. Georg Thieme Verlag Stuttgart: K. Arasteh (Hrsg.), pp. 461-462.

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

Zobel, A., and Maier, W. (2010). "Pharmacogenetics of antidepressive treatment." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 260(5), 407-17.

Zwarts, L., Versteven, M., and Callaerts, P. (2012). "Genetics and neurobiology of aggression in Drosophila." *Fly (Austin)*, 6(1), 35-48.

Eidesstattliche Versicherung

Popovic, David

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die hier vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Entwicklung eines „chronic social defeat“-Modells in *Drosophila melanogaster*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

DAVID POPOVIĆ

david.popovic@med.uni-muenchen.de |

KLINIK

Assistenzarzt | Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München (Direktor: Prof. Dr. P.G. Falkai) Seit 01.02.2016

- Aktuell: Studienarzt der EU-geförderten PRONIA-Studie sowie der PRONIA-Früherkennungsambulanz (OA Prof. Dr. N. Koutsouleris)
- Frühere Tätigkeiten: Stationsarzt der Adoleszentenstation D1 (OA Prof. Dr. N. Koutsouleris), Betreuung der Spezialambulanz für Tic-Störungen (OA PD Dr. R. Musil)

FORSCHUNG

Stipendiat | Else-Kröner-Fresenius-Forschungskolleg „Translationale Psychiatrie“ Seit 01.11.2016

- Facharzt/PhD-Programm zur Ausbildung von „Clinician Scientists“
- PhD-Supervisor: Prof. Nikolaos Koutsouleris
- Forschungsschwerpunkt: Entwicklung von Prädiktionsmodellen zur Früherkennung und Frührehabilitation psychischer Erkrankungen
- Methoden: Morphometrie (VBM, DBM), Machine Learning, Multivariate Analysen, Programmiersprachen (R, Python, Matlab)

Forschungsaufenthalt | Harvard Medical School 03/2011–03/2012

- Labor von Prof. Edward Kravitz (Neurobiology Department)
- Grundlage für die Promotion „Entwicklung eines chronic social defeat-Modells in Drosophila melanogaster“ (Doktorvater an der LMU: Prof. Michael Meyer)
- Methoden: GAL4/UAS-System, RNA-Sequenzierung, Verhaltensanalyse von Drosophila

Publikationen

- Papiol, S., Popovic, D., Keeser, D., Hasan, A., Schneider-Axmann, T., Degenhardt, F., Rossner, M. J., Bickeböller, H., Schmitt, A., Falkai, P., and Malchow, B. (2017). "Polygenic risk has an impact on the structural plasticity of hippocampal subfields during aerobic exercise combined with cognitive remediation in multi-episode schizophrenia." *Translational Psychiatry*, 7, e1159; doi:10.1038/tp.2017.131; published online 27 June 2017.
- Trannoy, S., Penn, J., Lucey, K., Popovic, D., and Kravitz, E. A. (2016). "Short and long-lasting behavioral consequences of agonistic encounters between male Drosophila melanogaster." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(17), 4818-23.

STIPENDIEN/AUSZEICHNUNGEN

- Else-Kröner-Fresenius Forschungskolleg „Translationale Psychiatrie“ (in Kooperation mit IMPRS-TP) — Seit 01.11.2016
- Studienstiftung des deutschen Volkes — Seit 2009
- Max-Weber-Programm (Elitenetzwerk Bayern) — 2008 – 2015

AUSBILDUNG

Approbation — 04.12.2015

Regierung von Oberbayern

Studium Humanmedizin — 2008 – 2015

Ludwig-Maximilians-Universität München

- 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: „gut“ — 24.11.2015
- 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: „gut“ (87,4% schriftlich, Top 5% im nationalen Ranking) — 09.10.2014
- 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/Physikum: „sehr gut“ (91,8% schriftlich, Top 2% im nationalen Ranking) — 31.08.2010

Schulische Laufbahn — 1995 – 2008

- Erfolgreiche Teilnahme an der Hochbegabtenprüfung der Regierung Oberbayern — 13.06.2008
- Klenze-Gymnasium München: Abiturnote 1,0 — 1999 – 2008
- Volksschule an der Konrad-Celtis-Straße — 1995 – 1999

WEITERES

- Studentische Praktika während des Medizinstudiums in folgenden Kliniken: 2008 – 2015
    - Warneford Hospital (University of Oxford, UK)
    - Hochgebirgsklinik Davos (CH)
    - Clinical Center of Serbia (Universität Belgrad, SRB)
    - Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie sowie Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie (LMU München)
- Hobbies: Tischtennis (SpVgg Thalkirchen), moderne Literatur, Filmkritik
- Sprachkenntnisse: Deutsch (Muttersprache), Englisch (sehr gut), Serbisch (sehr gut)

Ort, Datum

Unterschrift

LMU LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN | Dekanat Medizinische Fakultät

Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Popovic, David

Name, Vorname

Straße, Hausnummer

PLZ, Ort

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

Entwicklung eines „chronic social defeat“-Modells in *Drosophila melanogaster*

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand