

**Die Rolle des
Proteinkinase A - Ankerprotein - Komplexes
bei der Bildung von olfaktorischen Gedächtnissen**

Dissertation zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Andrea Jaeckel

Saarbrücken
Dezember 2007

Tag des Kolloquiums:	08. April 2008
Dekan:	Prof. Dr. U. Müller
Berichterstatter:	
Vorsitzender:	Prof. Dr. M. Schmitt
Gutachter:	Prof. Dr. U. Müller
	Prof. Dr. U. Walldorf
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. H. Kallenborn

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1 Lernen und Gedächtnisbildung.....	8
1.2 Nicht-assoziatives und assoziatives Lernen.....	9
1.3 Modellsysteme für die Untersuchung von Lern- und Gedächtnisphasen.....	10
1.4 Die verschiedenen Gedächtnisphasen.....	13
1.5 Mechanismen von Lernen und Gedächtnis.....	14
1.5.1 Das cAMP second messenger System.....	14
1.5.2 Die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA).....	16
1.5.3 Die Organisation der Signalwege innerhalb der Zelle geschieht mittels Ankerproteine.....	17
1.6 Ziel dieser Arbeit.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Lösungen.....	21
2.1.2 Medien und Platten.....	24
2.1.3 Vektoren.....	26
2.1.3.1 pENTR™ / D-TOPO® (Sigma).....	26
2.1.3.2 pTW Destination Vektor (siehe T. Murphy, 2003).....	26
2.1.4 Oligonukleotide (Primer).....	27
2.1.5 Synthetische Peptide.....	27
2.1.6 Antikörper.....	28

2.1.6.1	Primäre Antikörper.....	28
2.1.6.2	Sekundäre Antikörper.....	28
2.1.7	Verwendete Fliegenstämme.....	28
2.1.8	Bezugsquellen.....	29
2.1.8.1	Chemikalien.....	29
2.1.8.2	Antikörper.....	29
2.1.8.3	Synthetische Peptide.....	29
2.1.9	Geräte.....	30
2.1.10	Verwendete „Kits“.....	30
2.1.11	Internetadressen.....	31
2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (<i>E.coli</i>).....	32
2.2.1.1.1	Minipreparation: Alkalische Lyse mit SDS.....	32
2.2.1.1.2	Plasmid Midiprep (QIAGEN®).....	33
2.2.1.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	33
2.2.1.3	Amplifikation von DNA mittels einer PCR (Polymerase Kettenreaktion).....	34
2.2.1.3.1	Reaktionsansatz.....	34
2.2.1.4	DNA-Präzipitation.....	35
2.2.1.5	Restriktionsverdau.....	36
2.2.1.6	Auftrennung von DNA Fragmenten in Agarosegelen.....	36
2.2.1.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	37
2.2.1.8	Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Bakterien (<i>E.coli</i>).....	37
2.2.2	Untersuchungen an <i>Drosophila melanogaster</i>	38
2.2.2.1	Fliegenzucht.....	38

2.2.2.2	Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) und Kreuzungen.....	38
2.2.2.3	Die Gal4 Technik.....	38
2.2.2.4	Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i> -Embryonen mit Hilfe der Gateway Destination Vektoren.....	40
2.2.2.4.1	Herstellung der Injektionslösung.....	40
2.2.2.4.2	Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen der <i>Drosophila</i> Embryonen.....	41
2.2.2.4.3	Injektion der Konstrukte in <i>Drosophila</i> Embryonen.....	42
2.2.2.5	Olfaktorisches Lernen bei <i>Drosophila melanogaster</i>	43
2.2.2.5.1	Trainingsapparatur „T-maze“ nach Tully & Quinn.....	43
2.2.2.5.2	Versuchsdurchführung.....	44
2.2.2.6	Präparation genomischer DNA aus Fliegen für PCR.....	45
2.2.2.7	Histologische Paraffinschnitte.....	46
2.2.3	Untersuchungen an der Honigbiene <i>Apis mellifera carnica</i>	47
2.2.3.1	Vorbereitung der Versuchstiere.....	47
2.2.3.2	Injektion des Kompetitor-Peptids.....	47
2.2.3.3	Olfaktorische Konditionierung.....	48
3.	Ergebnisse.....	49
3.1	Hemmung der PKA-R2/AKAP Interaktion mittels eines Kompetitor-Peptids.....	49
3.2	AKAP-gebundene PKA-R2 stützt eine deutlich abgrenzbare Gedächtnisphase nach dem aversiven Training.....	53
3.3	AKAP-gebundenes PKA-R2 Gedächtnis ist in den Pilzkörpern lokalisiert.....	55

3.4	Expression des UAS-eCOPR2 Kompetitor-Peptids im adulten Stadium.....	57
3.5	AKAP-gebundene PKA-R2 stützt eine späte Phase des Kälte sensitiven aversiven Gedächtnisses.....	58
3.6	Der AKAP-gebundene PKA-R2 Signalweg wird im appetitiven Gedächtnis nicht benötigt.....	60
3.7	Benötigen die Signalwege zur Induktion des STM geankerte PKA?.....	62
3.8	Der Effekt der veränderten Trainingsparameter auf die Bildung des PKA-R2/AKAP- abhängigen Gedächtnisses.....	63
3.9	Das AKAP-gebundene PKA-R2 Gedächtnis wird ab dem 2. Schock in den Pilzkörpern benötigt.....	66
3.10	Der erhaltene Lerneffekt ist allein auf das Kompetitor-Peptid zurückzuführen.....	67
3.11	Eine 1 Schock Konditionierung induziert ein Kälte resistentes Gedächtnis.....	68
3.12	AKAP-gebundene PKA-R2 stützt auch bei der Honigbiene (<i>Apis mellifera</i>) eine deutlich abgrenzbare Gedächtnisphase.....	70
3.13	Eine Störung des PKA/ AKAP-Komplexes führt zu einer Verbesserung des 1 Trial STM nach einem Tag.....	73

4. Diskussion	75
4.1 Unterteilung des Gedächtnisses in spezifische Gedächtnisphasen mittels geankerter PKA.....	75
4.2 Die Gedächtnisphasen werden bei <i>Drosophila</i> wie bei <i>Aplysia</i> und der Honigbiene parallel prozessiert.....	78
4.3 Aversive und appetitive Gedächtnisse werden über verschiedene molekulare Mechanismen gebildet.....	82
4.4 Ankerproteine als organisierende Elemente während der olfaktorischen Konditionierung der Honigbiene.....	85
5. Zusammenfassung	89
6. Summary (Zusammenfassung in englischer Sprache)	90
7. Literaturverzeichnis	91
8. Liste der verwendeten Abkürzungen	102
9. Danksagung	104
10. Lebenslauf	106
11. Eidesstattliche Versicherung	108

1. Einleitung

1.1 Lernen und Gedächtnisbildung

Unser Gehirn besteht aus einer nicht definierbaren Anzahl von flexiblen Verschaltungselementen. Diese Netzwerke beruhen auf einem angeborenen Bauplan von Kernen und Cortices, die untereinander verschaltet sind. Trotz des vorgegebenen Organisationsschemas herrscht jedoch eine erhebliche Flexibilität: Das Neuron (der Grundbaustein dieser Netzwerke) ist kein statisches, sondern ein dynamisches Element. Ein ganzes Leben lang verändert sich die Zusammensetzung der Synapsenmembranen im Bezug auf Ionenkanäle und Rezeptoren. Dies geschieht vor allem durch äußere Einflüsse. Bei den Veränderungen von Nervenzellen und deren Verbindungen werden unter anderem Ionenkanäle moduliert, Enzymkaskaden aktiviert oder inaktiviert oder die Struktur von Neuronen verändert. Aber auch die synaptischen Verknüpfungsmuster der Neuronen verändern sich. So können sie sich einengen, ganz auflösen oder sich auf zusätzliche Neurone ausweiten. Dies bezeichnet man als „synaptische und strukturelle Plastizität des Gehirns“ und macht es den Organismen möglich, sich an veränderte Umstände anzupassen, oder aus Erfahrungen zu lernen. Diese neuronale Plastizität scheint sowohl in Vertebraten, als auch in Invertebraten funktionelle Ähnlichkeiten zu besitzen (Benfenati, 2007; Menzel, 1990; Menzel & Müller 1996). Doch was bleibt für eine gewisse Zeit oder für den Rest des Lebens erhalten? Was wird erlernt und im Gedächtnis gespeichert?

Lernen ist das Speichern von individuellen und selektiv erworbenen Informationen aus der Umwelt im Gedächtnis in abrufbarer Form. Die ständig auftretenden Umweltveränderungen und die unterschiedlichen Bedürfnisse eines Lebewesens machen eine ständige Anpassung unerlässlich. Tiere besitzen die Fähigkeit, ihr Verhalten aufgrund veränderter Umwelt Ereignisse zu ändern und aus Erfahrungen zu lernen. Die während des Lernvorgangs gewonnenen Informationen stehen über einen längeren Zeitraum zur Verfügung und sind jederzeit abrufbar. Diese Erinnerungen sind für die weitere Verhaltenssteuerung von wichtiger Bedeutung. Die Fähigkeit zu

lernen und die gelernten Informationen im Gedächtnis abzuspeichern, ist bei allen Tieren gleich ausgebildet und läuft wie schon erwähnt bei Vertebraten und Invertebraten häufig gleich ab. Den Lernprozess (Konditionierung) ansich kann man in zwei Stufen unterteilen: Den Lernvorgang, der den Erwerb des Gedächtnisses (Akquisition) beinhaltet und die anschließenden unterschiedlichen Phasen der Gedächtnisbildung. Beim Lernen unterscheidet man die assoziativen und nicht-assoziativen Lernformen.

1.2 Nicht-assoziatives und assoziatives Lernen

Zu den nicht-assoziativen Lernformen zählen die Habituation und die Sensitisierung. Als Habituation bezeichnet man die Fähigkeit eines Tieres, sich an einen wiederholt auftretenden Reiz, der neutral ist, d.h. weder mit positiven oder negativen Folgen verbunden ist, nicht mehr zu reagieren bzw. sich daran zu gewöhnen. Die Sensitisierung ist die Verstärkung einer Reflexantwort aufgrund eines zusätzlichen starken Reizes. Im Gegensatz zum nicht-assoziativen Lernen, bei dem über einen einzelnen Stimulus gelernt wird, kommt es beim assoziativen Lernen zur Verknüpfung eines neutralen Reizes mit einem belohnenden oder bestrafenden Reiz. Pawlow untersuchte im Jahr 1927 die klassische Konditionierung an Hunden.

Bei der klassischen oder Pawlowschen Konditionierung wird ein bedeutungsloser Reiz (z.B. ein Ton) als zu konditionierender Reiz (CS = conditioned stimulus) mit einem Reiz gepaart, welcher ein Verhalten auslöst (z.B. Futtergeruch). Der unkonditionierte Reiz (US = unconditioned stimulus) löst z.B. bei einem Hund einen Speichelfluss aus, welcher als unkonditionierte Reaktion (UR = unconditioned response) bezeichnet wird. Bei der Pawlowschen Konditionierung wird ein solches Reizpaar CS und US wiederholt präsentiert. Nach nur einer Trainingsphase (Akquisitionsphase) löst die alleinige Präsentation des CS eine Reaktion aus. Der anfangs bedeutungslose Reiz hat nun eine Bedeutung erlangt. Aus der unkonditionierten Reaktion ist nun eine konditionierte Reaktion (UR) geworden. Um eine Assoziation zwischen dem Ton und dem Futtergeruch zu erreichen, muss die Präsentation des CS mit dem US zeitlich eng korreliert und in der richtigen Reihenfolge geschehen.

Das bei der assoziativen Konditionierung erworbene Verhalten wird im Gedächtnis abgespeichert. Die Gedächtnisspeicherung ist ein dynamischer Prozess, in dem die Informationen unter Beteiligung verschiedener neuronaler Strukturen gespeichert werden. Diese Dynamik des Gedächtnisses kann man in mindestens drei Gedächtnisphasen einteilen: Kurzzeit-, Mittelzeit- und Langzeitgedächtnis. Das Kurzzeitgedächtnis besitzt eine begrenzte „Speicherkapazität“ und ist störanfällig gegenüber neuen Ereignissen und amnestischen Einwirkungen (z.B. Kälte). Es wird kurz nach der Konditionierung gebildet. Dabei kommt es zu Modifikationen von vorhandenen Proteinen und Signalkaskaden. Durch die Konditionierung wird das Kurzzeitgedächtnis in eine spätere Phase, das Mittelzeitgedächtnis überführt und dann in das Langzeitgedächtnis. Das Langzeitgedächtnis selbst ist von der Proteinsynthese abhängig, da die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses durch einen strukturellen Umbau gekennzeichnet ist (Bailey & Kandel, 1993).

1.3 Modellsysteme für die Untersuchung von Lern- und Gedächtnisphasen

Sucht man einen geeigneten Modellorganismus für die Untersuchung des Gedächtnisses, müssen verschiedene Kriterien beachtet werden: Der Organismus sollte ein stabiles, im Labor reproduzierbares Lernverhalten zeigen und für experimentelle Eingriffe wie z.B. die Injektion von Chemikalien gut zugänglich sein. Außerdem sollten die anatomische Struktur und die molekularen Signalwege bekannt und geeignet für biochemische und elektrophysiologische Untersuchungen sein.

Ein klassisches Beispiel für einen Lern-Modellorganismus ist die Meeresschnecke *Aplysia*. Aufgrund ihrer großen Neurone und einfachen Schaltkreise sind die Grundlagen der Habituation und der Sensitisierung weitgehend aufgeklärt und untersucht. Im Jahre 1963 zeigten Eric Kandel und Ladislav Tauc, dass man assoziatives Lernen am Nervensystem der Meeresschnecke *Aplysia* mit ihren großen Neuronen an den Synapsen studieren kann. Berührt man den Siphon oder auch den Mantelrand von *Aplysia*, zieht sie als Schutzmechanismus ihre Kiemen und den Mantelrand ein. Stimuliert man nun wiederholt, wird der Reflex habituiert. Reizt man den Fuß der Schnecke mit einem elektrischen Impuls, so verstärkt sich der

Rückzugreflex. Der Reflex wird sensitisiert. Forschern gelang es, den an diesem Lernformen beteiligte Schaltkreis aus sensorischen Neuronen, Motor- und Interneuronen zu identifizieren. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten wurde dieser Schaltkreis nun auf zellulärer Ebene untersucht. Man beobachtete an diesen Präparat einige Verbesserungen der synaptischen Übertragung, was man bei *Aplysia* auch „synaptische Faszilitierungen“ bezeichnet. Diese treten sowohl in einer kurzzeitigen, als auch langzeitigen Form auf (Carew et al., 1972;; Pinsker et al., 1970; Frost et al., 1985). Eine kurzzeitige oder eine langzeitige Faszilitierung ist abhängig von der Anzahl der Stimuli, die eine synaptische Faszilitierung auslösen können. Zu diesen beiden Faszilitierungsformen kam noch eine dritte Phase der Veränderung dazu: die intermediäre Phase der synaptischen Faszilitierung (Ghirardi et al., 1995).

Das in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte Modellsystem *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) zeichnet sich durch die einfache Handhabung und Haltung der Tiere aus. Der relativ kurze Generationszyklus von ca. 14 Tagen und das kleine Genom waren ausschlaggebend, dass *Drosophila* in den letzten Jahrzehnten zu einem weit verbreiteten Versuchstier für genetische Analysen, Untersuchungen zum Lernen und der Gedächtnisbildung und die Analyse von Lernmutanten wurde. Neben den nicht-assoziativen Lernprozessen ist *Drosophila* auch in der Lage, ein assoziatives Gedächtnis zu bilden. Quinn et al. etablierten 1974 das olfaktorische Vermeidungslernen oder das „aversive“ Lernen. Beim aversiven Training werden den Fliegen nacheinander zwei Düfte (CS+ und CS-) präsentiert, wobei die Präsentation des ersten Duftes mit 12 elektrischen Schocks (US) gepaart wird. Die gelernte Assoziation zwischen Duft und den elektrischen Schocks wird getestet, indem den Fliegen in einem sogenannten „T-maze“ beide Düfte zur Wahl gestellt werden. Tiere, die ein assoziatives Gedächtnis gebildet haben, vermeiden den bestraften Duft CS+ signifikant. Die Entwicklung dieses Lernparadigmas ermöglichte die Identifizierung von Genprodukten, die an Lern- und Gedächtnisbildungsprozessen beteiligt sind. So konnten für *Drosophila* vier zeitlich verschiedene Gedächtnisphasen gezeigt werden: Die Konditionierung oder die Akquisition (LRN), das Kurzzeitgedächtnis (STM), das Mittelzeitgedächtnis (MTM) und das Langzeitgedächtnis (LTM) (Dubnau & Tully et al., 1998; Isabel et al., 2004).

Der zweite in dieser Arbeit verwendete Modellorganismus ist die Honigbiene *Apis mellifera*. Sie besitzt ein relativ einfach aufgebautes Nervensystem und ein komplexes Verhalten. Neben nicht-assoziativen Lernformen wie der Habituation und der Sensitisierung sind Bienen genau wie *Drosophila* in der Lage, ein assoziatives Gedächtnis sowie Konzepte und Regeln zu bilden (Giurfa & Menzel, 1997; Giurfa et al., 2001). Für die Untersuchung des Lernens und der Gedächtnisbildungsprozesse ist das olfaktorische Lernen besonders geeignet. Einem Duftreiz als zu konditionierendem Stimulus (CS) folgt ein unkonditionierter Stimulus (US) in Form von Zuckerwasser, welches mit Hilfe eines Zahnstochers an die herausgestreckte Proboscis appliziert wird. Nach der Konditionierung kann nun die alleinige Präsentation des Duftes (CS) einen Rüsselreflex (PER = Proboscis extension reflex) als konditionierte Reaktion auslösen (Takeda, 1961; Menzel et al., 1974). Welches Gedächtnis während der Konditionierung ausgebildet wird, ist abhängig von der Anzahl der CS/US Paarung. Nach einem Trainingsdurchgang (1 Trial) bildet die Biene ein Kurzzeitgedächtnis (STM) aus, welches nach einem Tag wieder abklingt (Hammer & Menzel, 1995). Eine mehrfache Konditionierung (3 Trials) führt dagegen zur Bildung eines stabilen, lang anhaltenden (mehr als 4 Tage), transkriptions- und translationsabhängigen Langzeitgedächtnisses (Wüstenberg et al., 1998; Grünbaum & Müller, 1998).

Auch die Maus spielt als Modellorganismus in der Forschung eine zentrale Rolle. Sie ist neben dem Menschen der am besten charakterisierte Säuger (Beck et al., 2000). Im Mai 2002 gelang es dem „Mouse Genome Sequencing Consortium“, das Genom des weitverbreiteten Mausstammes C57BL/6J zu sequenzieren. Die Maus besitzt mit ihren 27000 bis 30500 Genen eine ähnliche Anzahl an Erbinformationen wie der Mensch. 99% dieser DNA-Bereiche haben eine entsprechende Homologie zum menschlichen Erbgut (Waterston et al., 2002). So gibt es zum Beispiel gleiche Strukturen und überlappende Expressionen und Funktionen. Weitere Ähnlichkeiten mit dem Mensch lassen sich in ihrem Stoffwechsel finden. Die Maus ist der beste Organismus, um physiologische Vorgänge und Krankheiten zu untersuchen. Sie besitzt eine rasche Generationsfolge und ist nicht nur durch die geringe Größe leicht zu halten. In der Molekularbiologie hat sich das Spektrum der möglichen genetischen Eingriffe in das Mausgenom enorm erweitert. Vor allem im Bereich der

Neurobiologie wurde in den letzten Jahren eine große Anzahl von Mausmutanten hergestellt (Nagy und Mar, 2001).

Mit molekularbiologischen Methoden konnten neue Gene ins Mäusegenom eingebracht und aktiviert werden. Den Forschern war es nun möglich, jedes beliebige Gen zu verändern oder an- und auszuschalten, um dann zu untersuchen, wie sich diese Veränderung auf die Funktionsweise von Neuronen im Hippocampus oder anderen, für das Gedächtnis wichtigen Gehirnregionen auswirkt. Vor allem in der Alzheimer Forschung sind transgene Mäuse als Testobjekte der Schlüssel zu erfolgversprechenden Behandlungsmethoden der Krankheit (Schenk et al., 1999; Bard et al., 2000; Janus et al., 2000; Lim et al., 2000; Morgan et al., 2000; Cherny et al., 2001; Dovey et al., 2001). Über die Mausmodelle der Alzheimer Krankheit wurde schon von über 20 Forschungsgruppen berichtet.

1.4 Die verschiedenen Gedächtnisphasen

Die PKA wurde als dritte Komponente des cAMP-Signalwegs auch bei *Drosophila melanogaster* in das Lernen und die Gedächtnisbildung mit einbezogen. Hier gaben selektive Gedächtnismutanten Aufschluss über die molekularen Mechanismen, die für die verschiedenen Gedächtnisphasen notwendig sind. Zwei Mutanten, die Defekte im cAMP-Stoffwechsel aufweisen, sind *dunce* und *rutabaga* (McGuire et al., 2005). *Dunce* war die erste Lern- und Gedächtnismutante, die isoliert wurde. Sie besitzt einen Defekt in der cAMP Phosphodiesterase Aktivität (Dudai et al., 1976). *Rutabaga* war die nächste Mutante, die molekular charakterisiert wurde. *Rutabaga* Fliegen sind defizient in der Aktivität der Ca^{2+} /calmodulin-sensitiven Adenylatzyklase (Livingstone et al., 1984). Bei beiden Mutanten wird die Bildung des STM und des ASM gestört und das Gedächtnis ist nicht bis auf 0 % reduziert (Li et al., 1995). Im Fall der Mutante *amnesiac* reduziert eine Mutation in einem Neuropeptidgen das Mittelzeitgedächtnis innerhalb der ersten Stunden nach dem Training (Quinn et al., 1979; Feany & Quinn, 1995). Ein Modell der Gedächtnisprozessierung in *Drosophila* zeigt, dass abhängig von einem einzelnen Trial oder einem mehrfach wiederholten (massed) Training drei verschiedene Gedächtnisphasen induziert werden. Diese Gedächtnisphasen beinhalten das Kurzzeitgedächtnis (STM, short-term-memory), das Mittelzeitgedächtnis (MTM, mid-term-memory) und das Kälte resistente

Gedächtnis (ARM, anesthesia-resistant-memory). Das Kurzzeitgedächtnis ist kurz nach dem Training abrufbar. Das Mittelzeitgedächtnis folgt nach dem Kurzzeitgedächtnis und ist auch mit dem cAMP Signalweg verknüpft. Das Kälte resistente Gedächtnis ist eine Komponente des Mittelzeitgedächtnisses, dauert aber bis zu 24h an. Dieses Modell vergegenwärtigt einen linearen Signalweg, ausgehend vom Kurzzeitgedächtnis, gefolgt vom Mittelzeitgedächtnis mit dem Kälte sensitiven und resistenten Gedächtnis, endend mit dem Proteinsynthese unabhängigen Langzeitgedächtnis (LTM, long-term memory) oder auch ARM. Das Proteinsyntheseabhängige Langzeitgedächtnis wird spezifisch induziert, indem man „spaced“ trainiert. Das heisst, dass viele Trainingseinheiten mit einem zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen Trainingsdurchgängen durchgeführt werden (Quinn und Dudai, 1976; Tully et al., 1994; Isabel et al., 2004).

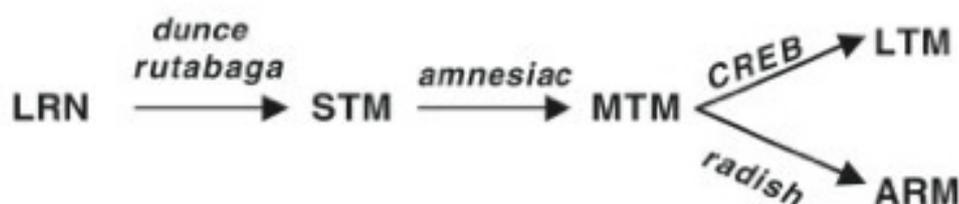


Abbildung 1: Ein älteres Modell der auseinander hervorgehenden Gedächtnisphasen, welches besagt, dass ARM und LTM nach einem spaced Training coexistieren (Isabel et al., 2004).

1.5 Molekulare Mechanismen von Lernen und Gedächtnis

1.5.1 Das cAMP second messenger System

Das cAMP second messenger System wird auch gerne als Lernpathway oder cAMP Signalweg bezeichnet. Bei der synaptischen Signalübertragung nennt man das chemische Signal, welches von Zelle zu Zelle gesendet wird Neurotransmitter. Dieses Molekül ist das erste Signal (first messenger), welcher von Zielzellen aufgenommen wird. Neurotransmitter können direkt auf Ionenkanäle wirken, um deren Durchlässigkeit von Ionen zu ändern. Änderungen in Ca^{2+} Ionenpegeln kann

eine Aktivierung des cAMP Signalwegs bewirken. Zyklisches AMP (cAMP) wurde als einer der ersten sekundären Botenstoffe beschrieben (Sutherland & Rall, 1957).

Bei der Sensitisierung von *Aplysia*, auf welche später noch genauer eingegangen wird, aktiviert die Stimulation am Schwanz bestimmte Neurone, die Serotonin freisetzen (Kandel und Schwartz, 1982). Dabei bindet das Serotonin an einen Rezeptor, der über ein G-Protein die Aktivität der Adenylatzyklase steuert. Als Folgeantwort kommt es zu einem Anstieg von zyklischem AMP (cAMP) (Bernier et al., 1982). Das cAMP aktiviert nun die Proteinkinase A (PKA), welche die cAMP Signale zu downstream Zielpartnern übermittelt, indem sie die Zielproteine wie z.B. Kanäle oder das CREB Protein phosphoryliert. Hierbei wird der Kaliumkanal, der für die Repolarisierung des Aktionspotentials notwendig ist, phosphoryliert. Damit wird der Kalium-Auswärtsstrom reduziert und das Aktionspotential in den sensorischen Neuronen zeitlich verlängert (Castellucci et al., 1980; Siegelbaum et al., 1982). Diese Verlängerung des Aktionspotentials hat zur Folge, dass mehr Ca^{2+} in die sensorischen Synapsen gelangt. Dies hat wiederum zur Folge, dass mehr Transmitter ausgeschüttet werden. Diese erhöhte Transmitterausschüttung führt zu einem erhöhten exzitatorischen postsynaptischen Potential in den Motorneuronen und bewirkt die im Verhalten beobachtete gesteigerte Reaktion. In Organismen wie *Aplysia*, *Drosophila* oder Wirbeltieren ist das CREB-Protein (cyclic-AMP response element binding protein) direkt in die Anlage eines Langzeitgedächtnisses involviert (Bailey, 1994). Dabei wird angenommen, dass die PKA in den Somata der Neurone vom Zytoplasma in den Zellkern wandert und über die Phosphorylierung von CREB die Induktion der Genexpression vermittelt (Dash et al., 1990; Bacskai et al., 1993; Kaang et al., 1993). Dass das CREB-Protein für das Langzeitgedächtnis notwendig ist, konnte in verschiedenen Systemen wie z.B. *Aplysia* (Dash et al., 1990; Martin et al., 1997), *Drosophila* (Yin et al., 1994; 1995) und der Maus (Bourtchuladze et al., 1994; Pittenger et al., 2002) gezeigt werden. Der Abbau von cAMP erfolgt durch Phosphodiesterasen (PDE), was eine dauerhafte Aktivierung der PKA verhindert (Rybalkin & Beavo, 1996).

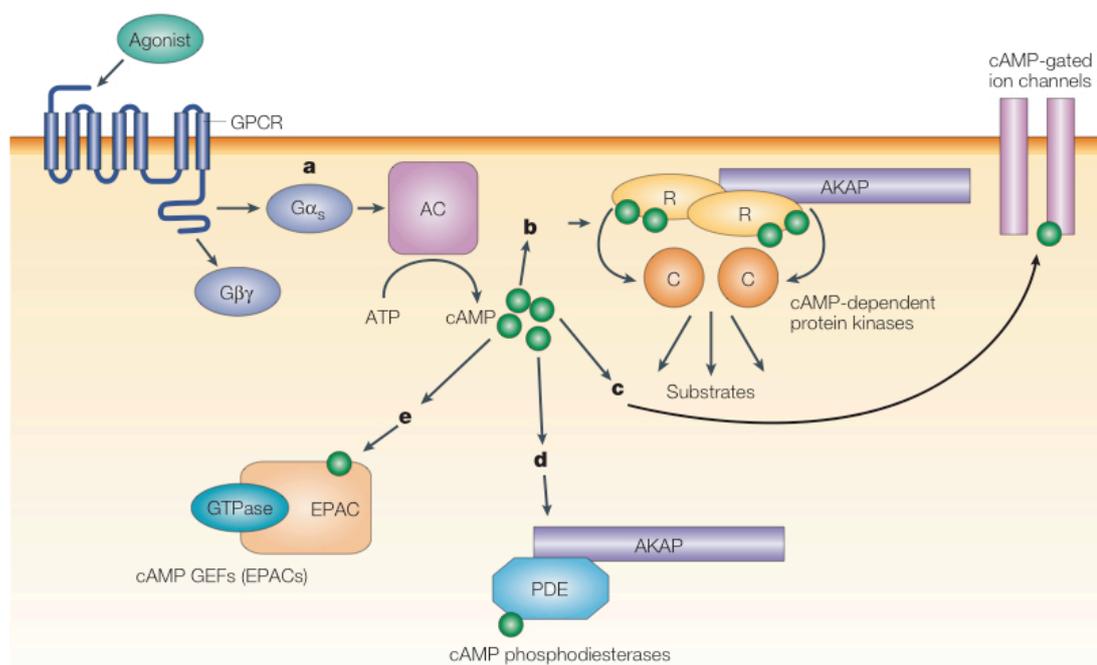
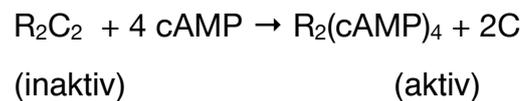


Abbildung 2: Der cAMP Signalweg. Agonist Stimulierung des (a) G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCRs) aktiviert die Adenylatzyklase (AC), welche die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert. cAMP bindet an die regulatorischen Untereinheiten (R) der Proteinkinase A (PKA; b), was eine Konformationsänderung zur Folge hat. Die aktive katalytische Untereinheit (C) wird freigesetzt und kann nun Substrate phosphorylieren, welche sich in der Nähe befinden. PKA ist intrazellulär der Haupteffektor des cAMP Signalwegs. cAMP kann Ionenkanäle aktivieren (c), Phosphodiesterasen (PDEs; d), und Guanin Nukleotid-Austausch Faktoren (GEFs), welche als Austauschproteine bekannt sind, die durch cAMP aktiviert werden (EPACs; e) (Wong und Scott, 2004).

1.5.2 Die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA)

Die Aktivierung der cAMP abhängigen Proteinkinase A ist eine der am besten charakterisierten Signalwege und gilt als Hauptsensor der Zelle für Änderungen im cAMP-Spiegel. Die PKA ist eine Serin/Threonin Kinase Zusammensetzung von zwei katalytischen (C) Untereinheiten, die durch die Bindung mit einem Dimer der regulatorischen (R) Untereinheit in einem inaktiven Stadium gehalten werden (Michel & Scott, 2002). Die katalytischen Untereinheiten werden von drei verschiedenen Genen codiert: C α , C β und C γ . Die regulatorischen Untereinheiten werden hingegen von vier verschiedenen Genen exprimiert: R1 α , R1 β (Typ I; Lee et al., 1983; Clegg et al., 1988), R2 α , R2 β (Typ 2; Jahnsen et al., 1986; Scott et al., 1987). Die

regulatorische Untereinheit ist ein modulares Polypeptid, welches eine N-terminale Dimerisierungsdomäne enthält. Diese Domäne dient als Bindestelle für die katalytische Untereinheit und besitzt außerdem noch zwei cAMP Bindestellen. Binden nun zwei cAMP Moleküle an die regulatorische Untereinheit, ändert sich die Konformation der R-Untereinheiten. Dies hat zur Folge, dass die Affinität für die C-Untereinheiten um 4-5 Größenordnungen gesenkt wird (Granot et al., 1980), so dass diese gemäß der Gleichung



dissoziieren. Die R-Untereinheiten verbleiben als Dimer. Die beiden freien C-Untereinheiten können nun Substrate im Cytoplasma oder im Zellkern phosphorylieren. Sowohl bei den katalytischen, als auch bei den regulatorischen Untereinheiten sind mehrere Isoformen beschrieben worden. Neben den kurzfristigen Effekten, die durch die Phosphorylierung hervorgerufen werden, werden bei der Gedächtnisbildung auch Langzeiteffekte durch die Aktivität der PKA vermittelt.

1.5.3 Die Organisation der Signalwege innerhalb der Zelle geschieht mittels Ankerproteine

Die Lokalisation der Typ I und 2 PKA innerhalb der Zelle erfolgt durch die A-Kinase-Ankerproteine (AKAPs). Mit Hilfe dieser Gerüstproteine sind die regulatorischen Untereinheiten an ihrer N-terminalen Dimerisierungs und Dockingdomäne (DD-Domäne) mit Membranen oder Zellorganellen verankert (Banky et al., 1998; Leon et al., 1997). Durch diesen Zusammenschluss kann Spezifität und Effizienz in den Zell-Signalwegen erreicht werden. Die Ankerproteine bewirken, dass Enzyme wie zum Beispiel Kinasen und Phosphatasen ihre Zielsubstrate an ganz spezifischen innerzellulären Orten phosphorylieren bzw. dephosphorylieren können. Außerdem besitzen einige Ankerproteine die Fähigkeit, Multienzymkomplexe zu bilden, indem die Proteinkinasen und Proteinphosphatasen gleichzeitig geankert werden können. So können aktivierende und inaktivierende Enzyme an einem ganz bestimmten Ort

der Zelle lokalisiert werden und haben somit einen ortsspezifischen Einfluss auf die molekularen Prozesse (Rubin, 1994; Dodge & Scott, 2000; Colledge et al., 2000). In Zellen des Herzens konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Aktivierung von geankerter PKA durch cAMP Einfluss auf die Signaltransduktion hat. In der löslichen Fraktion blieb die Aktivierung ohne Folgen (Steinberg & Brunton, 2001). Mittlerweile sind 50 verschiedene AKAPs bekannt. Sie unterscheiden sich vor allem in der Struktur, funktionell sind sie aber alle gleich: sie besitzen alle die Fähigkeit PKA zu binden. Ankerproteine bestehen aus einer amphipathischen Helix von 14 bis 18 Aminosäure-Resten, welche für die Bindung des N-terminalen Endes des PKA-R2 1 - 45 Dimers zuständig ist (Colledge & Scott, 1999). Die ersten 30 Reste der R2 Untereinheit sind für die AKAP-Bindung und die Dimerisierung der R2 notwendig. Insbesondere die Isoleucine drei und fünf sind wichtige Faktoren für die PKA-AKAP Interaktion (Hausken et al., 1994). Das menschliche Thyroid Ankerprotein Ht31 diente als Prototyp, um dieses Modell zu testen. Ht31 ist ein Peptid, welches an die R2 Untereinheit bindet und somit die Bindung der PKA an AKAPs kompetiert. Dieses Ht31 Peptid wurde unter anderem verwendet, um zu untersuchen, inwiefern Ankerproteine notwendig für die Gedächtnisbildung und die Angst-Konditionierung sind. Um eine Wirkung innerhalb der Zellen untersuchen zu können, stellte man ein Zell-permeables Peptid her (St-Ht31 = sterated Ht31). Injizierte man dieses Peptid nun in die laterale Amygdala von Ratten, zeigten diese eine Stunde nach dem Training ein normales Angstverhalten (freezing). Nach 4 und 24 Stunden allerdings war das Angstverhalten eingeschränkt. Dies ließ vermuten, dass an AKAPs geankerte PKA in der lateralen Amygdala nötig für die Bildung einer auditorischen Angst-Konditionierung ist (Moita et al., 2002). Bei *Drosophila* wurde bisher noch keine Kompetition dieser Art durchgeführt. So wurde hier z.B. die Notwendigkeit der cAMP-abhängigen Protein Kinase (PKA) im assoziativen Lernen mit Hilfe der *Drosophila* PKA Mutante DC0 untersucht (Li et al., 1995; Skoulakis et al., 1993). Mutanten, die direkt das zyklische AMP beeinflussen, stören die Bildung des ASM. Des weiteren verursachten Störungen der G-Protein α Untereinheit, einer Phosphodiesterase (*dunce*) und einem cAMP-reagierenden Transkriptionsfaktor (dCREB2) Defizite im Lernen und der Gedächtnisbildung (Goodwin et al., 1997).

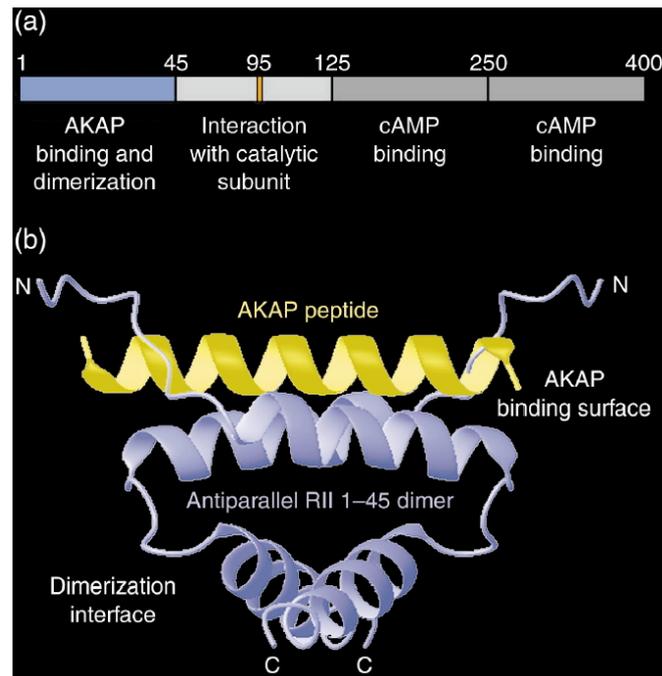


Abbildung 3: Modell der Bindung von PKA an die Ankerproteine. (A) Schematische Darstellung der R2 Untereinheit der Protein Kinase A (PKA). Die verschiedenen Bindungsstellen der R2 Untereinheit sind gekennzeichnet. Die orangene Box stellt die Autophosphorylierungsstelle dar. (B) Dreidimensionales Modell des PKA-AKAP Komplexes. Die vier Helices des R2 α Dimers (1-45) sind blau dargestellt. Die oberen zwei Helices bilden Kontakte zu dem AKAP, die unteren zwei vermitteln die Dimerisierung. Das gelbe Band stellt das AKAP Peptid (Ht31) dar, welches so „geformt“ wurde, dass es in die Bindungsstelle der R2 Untereinheit passt (Colledge und Scott, 1999).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der Ankerung von PKA an Ankerproteine beim olfaktorischen Lernen und der Gedächtnisbildung zu untersuchen.

Da *Drosophila* über einfache und komplexe Lernformen verfügt und sehr gut geeignet für genetische Analysen ist, habe ich sie als Modellsystem für diese Untersuchung gewählt. Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden soll zuerst ein Expressionsvektor hergestellt werden, der den Teil der R2 Untereinheit enthält, der an die Ankerproteine binden kann (UAS-eCOPR2). Dieser wird dann in die Fliege gebracht, um mittels Verhaltensversuche untersuchen zu können, ob eine Störung der PKA-R2/AKAP Interaktion einen Einfluss auf die Gedächtnisleistung der Fliegen hat.

Im Anschluss soll die Störung der PKA-R2/AKAP Bindung auch in dem anderen Modellorganismus Honigbiene untersucht werden. Da eine genetische Analyse ausgeschlossen ist, werden die Untersuchungen mittels eines synthetisch hergestellten Transfektionspeptids durchgeführt, welches wie auch bei *Drosophila* den für die Bindung an Ankerproteine wichtigen Teil der DD-Domäne enthält. Das Transfektionspeptid soll nun mittels Injektion in die für das olfaktorische Lernen notwendigen Gehirnbereiche injiziert werden.

- Werden assoziative Lernformen von der Störung der PKA-R2/AKAP-Bindung beeinflusst?
- Zu welchem Zeitpunkt wird die PKA-R2/AKAP Interaktion für das Lernen und die Gedächtnisbildung benötigt?
- Welche Gedächtnisphase ist betroffen?
- In welcher Gehirnstruktur wird die PKA-R2/AKAP Interaktion bei der Gedächtnisbildung benötigt?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen

Lösungen ohne besonderen Vermerk wurden bei RT aufbewahrt. Lösungen die autoklaviert wurden, sind mit einem * gekennzeichnet. Das Lösungsmittel ist in den meisten Fällen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$; Ausnahmen sind angegeben.

Ampicillin-Stammlösung (-20°C, aliquotiert):

Ampicillin Natriumsalz, 50 mg/ml

Carnoy-Lösung:

Ansatz für 100 ml (entspricht der prozentualen Zusammensetzung)

60 ml Ethanol abs.

30 ml Chloroform

10 ml Eisessig

Injektionspuffer (pH 6.8):

5 mM Kaliumchlorid

0,1 mM Na_2HPO_4

0,1 mM NaHP_2O_4

mit Na_2HPO_4 und NaHP_2O_4 auf pH 6.8 einstellen

Kanamycin-Stammlösung (-20°C, aliquotiert):

20 mg/ml

Natriumhypochlorit-Lösung:

7% (w/v) Natriumhypochlorit

PBS* (10x):

1,3 M NaCl

70 mM Na₂HPO₄

30 mM NaH₂PO₄

PBST:

0,2% (v/v) Tween 20 in 1x PBS

Proteinase K:

20 mg/ml Stammlösung

Puffer P1 (für QIAGEN® Plasmid Midiprep, Resuspendierungspuffer, 4°C):

50 mM Tris-Cl, pH 8.0

10 mM Na₃-EDTA

100 µg/ml RNase A

Puffer P2 (für QIAGEN® Plasmid Midiprep, Lysispuffer):

0,2 M NaOH

1% (w/v) SDS

Puffer P3 (für QIAGEN® Plasmid Midiprep, Neutralisierungspuffer):

3 M Kaliumacetat, pH 5.5

Puffer QBT (für QIAGEN® Plasmid Midiprep, Equilibrierungspuffer):

0,75 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7.0

15% (v/v) Isopropanol

0,15% (v/v) Triton X-100

Puffer QC (für QIAGEN® Plasmid Midiprep, Waschpuffer):

1 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7.0

15% (v/v) Isopropanol

Puffer QF (für QIAGEN® Plasmid Midiprep, Eluierungspuffer):

1,25 M NaCl

50 mM Tris-Cl, pH 8.5

15% (v/v) Isopropanol

RNase A (-20°C) :

10 mg/ml

30 min kochen, um vorhandene DNasen zu inaktivieren

Solution I (für Plasmid Miniprep, alkalische Lyse):

50 mM Glucose

25 mM Tris-Cl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

EDTA und Tris-Cl werden mit 437,5 ml Aqua dest. gemischt und autoklaviert. Erst danach werden die 25 ml Glucose beigefügt. Solution I kühl lagern bei 4°C.

Solution II (für Plasmid Miniprep, alkalische Lyse):

0,2 M NaOH

1% SDS

Wird immer frisch angesetzt.

Solution III (für Plasmid Miniprep, alkalische Lyse):

60 ml 5 M KOAc

11,5 ml 96% acetic acid

28,5 ml H₂O

„Squishing“-Puffer (für die Herstellung von genomischer DNA aus einer Fliege):

10 mM Tris, pH 8.2

25 mM NaCl

1 mM Na₃-EDTA

200 µg/ml Proteinase K

Stoplade-Puffer (EDTA und Tris-HCl pH 8.0):

1 mM EDTA
10 mM Tris-HCl, pH 8.0
0,1% (w/v) SDS
30% (v/v) Glycerin
0,25% (w/v) Bromphenolblau

TAE-Puffer (50x):

10 mM Na₃-EDTA
0,4 M Tris-HCl, pH 7.4
0,2 M Natriumacetat

TE-Puffer (pH 8.0):

10 mM Tris-Cl
1 mM Na₃-EDTA

2.1.2 Medien und Platten**Standard-Fliegenfutter:**

Das Fliegenfutter ist ein Gemisch aus Maismehl, Malzextrakt, Rübensirup, Fadenagar, Trockenhefe (Bierhefe), Sojamehl, Propionsäure & Nipagin (um Schimmel- und Parasitenbefall zu unterbinden) und H₂O. Um 8 Liter Standard-Fliegenfutter herzustellen wurden 64 g gemahlener Agar in ca. 3 Litern H₂O so lange aufgeköcht, bis er sich vollständig gelöst hat. Den restlichen 5 Litern H₂O wurden unter Rühren 160 g Trockenhefe (Bierhefe), 80 g Sojamehl und 1160 g Maismehl zugefügt. Nun wurden dem gelösten Agar 130 g Rübensirup und 640 g Malzextrakt untergerührt und das Mehlgemisch zugegeben. Nachdem das angerührte Futter auf ca. 60°C abgekühlt war, wurden 50 ml Propionsäure und 20 g Nipagin (Methyl 4 – hydroxybenzoate) hinzugefügt und das Futter konnte nun in Fliegenbecher oder Fliegenröhrchen umgefüllt werden. Das Futter wurde abgedeckt und üN bei RT getrocknet. Am nächsten Tag konnte man nun die Röhrchen mit etwas Trockenhefe

bestreuen und mit Stopfen verschließen. Die fertigen Futterröhrchen konnten bei 4°C im Kühlraum gelagert werden.

LB- Medium*:

10 g Bacto Trypton

10 g NaCl

5 g Hefeextrakt

H₂O_{bidest.} ad. 1000 ml

LB-Agarplatten:

15 g Bacto Agar in 1000 ml LB-Medium*

Jede 500 ml-Flasche wird mit 3,75 g Bacto Agar und 250 ml LB-Medium gefüllt und autoklaviert. Der Bacto Agar löst sich während dem Autoklaviervorgang. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf ca. 60°C abgekühlt und in runde, sterile Einweg Petrischalen gegossen. Die fertigen Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert.

Antibiotika-haltige Medien und Agarplatten:

Das Antibiotikum wurde erst nach dem Abkühlen des Mediums auf 60°C bzw. kurz vor dem Gießen der Agarplatten zugegeben.

Apfelsaftplatten:

250 ml H₂O_{bidest.}

8 g Agar Agar

80 ml Apfelsaft

8 g Zucker

In einer 500 ml Flasche (mit einem Magnetrührstäbchen) wurden 8 g Agar Agar mit 250 ml H₂O_{bidest.} gemischt und während dem Autoklaviervorgang gelöst. 80 ml Apfelsaft, vermischt mit 8 g Zucker, wurde in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt und zu dem Agar (bei 80°C gelöst) gegeben. Nun wird mit Hilfe eines Magnetrührers

2.1.4 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotidsynthesen wurden von SIGMA Genosys durchgeführt. Bei der Auswahl der Primer spielen verschiedene Kriterien wie der G/C-Gehalt, Schmelztemperatur, Komplementarität und das Vermeiden von Hairpins eine Rolle. Einige der Primer enthalten Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsenzyme oder Vektoren.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Annealing Temp
PKA-R2 forw	CACCATGTCGAGCGATTTCGAGTCGAAGG	64°C
PKA-R2Δ forw	CACCATGGAGGAGCTGAAGGAGGTG	63°C
PKA-R2 revers	TGAGTTGACGCTCAGCTGGTCATC	59°C

2.1.5 Synthetische Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptide wurden von der WITA GmbH (Teltow) hergestellt. Das synthetische Transfektionspeptid besteht aus einem Stück der regulatorischen Untereinheit Typ 2 der PKA und enthält das für die Bindung an Ankerproteine notwendige Isoleucin. Das Kontrollpeptid besteht aus einer Aminosäuresequenz, die aus dem Bereich der regulatorischen Untereinheit besteht, welche wegen dem fehlenden Isoleucin nicht mehr an Ankerproteine binden kann. Zudem enthalten beide Peptide eine Bisulfitbrücke und eine Leadersequenz, die das Peptid in die Zellen schleust (Mochly-Rosen et al., 1991).

Tabelle 2: Verwendete synthetische Peptide

Name	Sequenz
Transfektionspeptid Honigbiene	KIIVPDEL R DC-SS-CRRRRRRR
Kontrollpeptid Honigbiene	EQPVDI I DYAC-SS-CRRRRRRR

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

- Monoklonaler Maus Anti - TAU (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA): Verdünnung 1:1000 für Färbungen an Paraffinschnitten

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

- Anti - Maus IgG Phosphatase gekoppelt (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA): Verdünnung 1:400 für Färbungen an Paraffinschnitten

2.1.7 Verwendete Fliegenstämme

Stamm für P-Element-Transformation: w¹¹¹⁸ CS 70 (Würzburg)

Wildtyp: Canton-S (Würzburg)

Doppelbalancer: w[*]; Kr[lf-1] / CyO; D[1] / TM6C, Sb[1] Tb[1] (Bloomington)

Stamm mit dem Kompetitor-Peptid: w¹¹¹⁸; +; UAS-eCOPR2 / TM6C, Sb[1] Tb[1]
Fliegen sind homozygot letal

Stamm mit der trunkierten Version des Kompetitor-Peptids:

w¹¹¹⁸; +; UAS-eCOPR2Δ / UAS-eCOPR2Δ

Ausgangsstämme für Verhaltensversuche:

1. *elav*; +; UAS-eCOPR2 / TM6C, Sb[1] Tb[1]
2. *elav*; +; UAS-eCOPR2 Δ / UAS-eCOPR2 Δ
3. *elav*; +; +
4. UAS-eCOPR2; +; +
5. w^{1118} ; +; 247 / UAS-eCOPR2
6. w^{1118} ; +; 247 / +
7. w^{1118} ; +; GH146 / UAS-eCOPR2
8. w^{1118} ; +; GH146 / +
9. w^{1118} ; +; 247, tub-Gal80^{ts} / UAS-eCOPR2

2.1.8 Bezugsquellen

2.1.8.1 Chemikalien

Diagonal (Münster), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (St.Louis, USA), zentrales Chemikalienlager der Universität

2.1.8.2 Antikörper

Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)

2.1.8.3 Synthetische Peptide

WITA GmbH (Teltow)

2.1.9 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Name des Gerätes	Bezugsquelle
Gel-Elektrophorese-System	OWL (Portsmouth)
Bio Rad Power Pac 300	Bio Rad (München)
Thermo Photometer "Bio Mate 3"	Thermo (Waltham)
Eppendorf Mastercycler Personal	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf 5417R Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf 5804R Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Schüttelinkubator EB TH15/KS15	EB Labortechnik
Tischzentrifuge Spectrafuge 24D	Labnet international Inc. (Windsor Berkshire)
Inversmikroskop	Motic (Wetzlar)
Mikrotom	Leica (Wetzlar)
Mikromanipulator	Zeiss (Jena)

2.1.10 Verwendete „Kits“

Tabelle 4: Verwendete „Kits“

Name des „Kits“	Bezugsquelle
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

2.1.11 Internetadressen

Tabelle 5: Am häufigsten verwendete Internetadressen

URL („Uniform Resource Locator“)	Beschreibung
http://flybase.bio.indiana.edu	FlyBase: A Database of the <i>Drosophila</i> Genome
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed	PubMed: National Library of Medicine
http://flybrain.uni-freiburg.de/	Online Atlas and Database of the <i>Drosophila</i> Nervous System
http://flystocks.bio.indiana.edu/	Bloomington Stock Center
https://dgrc.cgb.indiana.edu/	<i>Drosophila</i> Genomics Resource Center

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (*E.coli*)

2.2.1.1.1 Minipreparation: Alkalische Lyse mit SDS

Bei dieser Methode wurde eine SDS/NaOH-haltige Lösung eingesetzt, um eine Zellyse hervorzurufen. Unter diesen alkalischen Bedingungen kommt es zur Denaturierung der chromosomalen- und Plasmid-DNA. Bei der Zugabe von Kaliumacetat wird die supercoiled Form umgewandelt und befindet sich im Überstand der Lösung. 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden selektierenden Antibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie (*E.coli*) angeimpft und ca. 6-7 h oder üN bei 37°C in einem Schüttelinkubator (EB TH15/KS15) inkubiert (220 rpm). 1,5 ml dieser Bakteriensuspension wurden in ein Reaktionsgefäß gefüllt und 30 sek bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert (Eppendorf 5417R). Der Rest der Suspension wurde bei 4°C gelagert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl der Solution I versetzt. Danach wurde das Pellet durch Vortexen resuspendiert; es wurden 200 µl der frisch zubereiteten Solution II zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und alles auf Eis inkubiert. 150 µl kalte Solution III wurde zugegeben und der Ansatz wurde wieder vorsichtig gemischt und 3-5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 5 min bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, da die zerstörten Zellbestandteile sich als Pellet abgelagert haben und die DNA sich im Überstand befindet. Nach der Zugabe von 2 Volumen Ethanol (RT) wurde erneut durch Vortexen gemischt und der Ansatz 5 min bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach einer 2 minütigen Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Die fertige DNA wurde in 50 µl 1x TE Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.1.1.2 Plasmid Midiprep (QIAGEN)

Zur Gewinnung von größeren Mengen an reiner DNA wurde eine Plasmid-Isolierung im größeren Maßstab durchgeführt. 25 ml LB-Medium (oder 100 ml bei low-copy Plasmiden) mit dem entsprechenden selektierenden Antibiotikum wurden mit 50 µl der gewünschten Miniprep-Bakteriensuspension angeimpft und bei 37°C in einem Schüttelinkubator (EB TH15/KS15) inkubiert. Diese wurde am folgenden Tag in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und 15 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf 5804R). Die Präparation erfolgte mit Hilfe des „QIAGEN® Plasmid Midi Kits“. Das Protokoll wird hier nicht aufgeführt, da strikt nach den Angaben des Herstellers gearbeitet wurde. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einer Eppendorf 5804R Zentrifuge durchgeführt. Die Qualität und Reinheit der Plasmid-DNA reichte aus, um alle anfallenden DNA Arbeiten wie Transformationen, Klonierungen inklusive Restriktionsanalyse, Injektionen, Sequenzierungen oder eine PCR durchzuführen.

2.2.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt.

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Spektralcharakteristika der in ihnen enthaltenen Basen UV-Licht zwischen 250 und 270 nm Wellenlänge. Sie zeigen dabei ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Im Vergleich dazu liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm. Bei 260 nm Wellenlänge entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 1 cm Schichtdicke der Küvette ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml ds DNA}$$

Der Quotient der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten zeigt die Reinheit einer Nukleinsäuren-Präparation an. Bei reiner DNA liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0. Höhere Werte können ein Hinweis auf denaturierte DNA oder die Anwesenheit von RNA sein, wohingegen niedrigere Werte ein Indiz für Verunreinigungen mit organischen Lösungsmitteln oder Proteinen sind. Die

photometrischen Messungen in dieser Arbeit wurden mit einem BioMate 3 Photometer der Firma Thermo durchgeführt.

2.2.1.3 Amplifikation von DNA mittels einer PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Bei der PCR handelt es sich um ein *in vitro* Verfahren, welches die rasche, selektive Anreicherung von DNA möglich macht. Man nutzt hierbei die Eigenschaft von DNA-Polymerasen aus, die einen DNA-Einzelstrang zu einem DNA-Doppelstrang aufpolymerisieren können, wenn ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich (Primer) zur Verfügung steht. Im ersten Reaktionszyklus wird die DNA denaturiert, d.h. einzelsträngig gemacht, um unter geeigneten Bedingungen die Bildung von Hybridmolekülen zwischen einem Strang der zu amplifizierenden DNA und einem zu diesem Strang komplementären Primer zu erlauben. Der durch Hybridisierung (Annealing) entstandene Bereich dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase bzw. der *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase (welche in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurden). Man erhält nun doppelsträngige DNA-Moleküle, die in einem zweiten Reaktionszyklus erneut denaturiert werden und nach dem Anhybridisieren der Primer wieder durch die Polymerase zu Doppelstrang aufgefüllt werden. Bei der Wiederholung der Reaktionsfolge aus Denaturierung, Annealing und Polymerisation kommt es nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der DNA und somit nach vielen Zyklen zu einer exponentiellen Vermehrung des zwischen den Primern gelegenen DNA-Abschnitts.

2.2.1.3.1 Reaktionsansatz

Reaktionsansatz einer PCR mit 20 µl Gesamtvolumen:

- 20 ng – 1 µg Template-DNA (genomisch oder Plasmid)
- 2 µl 10 x Polymerase Puffer
- 0,5 µl dNTP Mix (10 mM)
- 1 µl Primer 1 (10 pMol/µl)
- 1 µl Primer 2 (10 pMol/µl)
- 0,5 µl *Taq* oder *Pfu* DNA-Polymerase (5 U/µl)
- H₂O_{bidest.} ad. 20 µl

Tabelle 6: PCR Bedingungen für die Herstellung von PCR Amplifikaten

Zeit		Temperatur	Vorgang
5 min		95°C	Denaturierung
X Zyklen	30 sek	95°C	Denaturierung
	30 sek	X °C	Annealing
	30 sek	72 °C	Elongation
5 min		72 °C	Finale Elongation

Aufgrund der unterschiedlichen Schmelzpunkte der Primer wurde die Annealing Temperatur verändert (individuelle Annealingtemperatur der verwendeten Primer siehe Tabelle 1). Die Bedingungen, die abhängig sind von der verwendeten DNA-Polymerase (*Taq* oder *Pfu* Polymerase), den Primern, der Fragmentgröße und der Annealingtemperatur wurden jeweils angepasst und in den Ergebnissen gesondert erläutert.

Für die Durchführung der PCR wurde ausschließlich ein Eppendorf Mastercycler personal verwendet. In dieser Arbeit betragen die Temperaturbedingungen der Zyklen 95°C für 5 min, gefolgt von 35 Zyklen einer 30 sek Denaturierung, 30 sek Annealing bei 60°C und 60 sek Elongation bei 72°C. Die Vorwärts-Primer wurden dem open reading frame (ORF) einschließlich der Konsensus Sequenzen, die in den Gateway-Vektoren (Murphy, 2003) verwendet wurden, angepasst (Sequenzen siehe Tabelle 1).

2.2.1.4 DNA-Präzipitation

Um DNA aus wässriger Lösung zu fällen, erhöht man die Salzkonzentration und gibt Alkohol dazu.

0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2

2 Volumen 100% Ethanol

Die DNA wurde mindestens 30 min bei -20°C gefällt, der Ansatz anschließend 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA Pellet wurde mit

100 µl 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Nun wurde die DNA in einem der Konzentration angepassten Volumen H₂O_{bidest.} aufgenommen und weiterverwertet.

2.2.1.5 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen schneiden die DNA sequenzspezifisch, wobei die Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme unterschiedlich lang sind. Sie erzeugen entweder glatte (blunt) oder klebrige (sticky) Enden. Letztere weisen einen 1 - 4 Basen Einzelstrangüberhang auf und sind somit in der Lage, mit einem komplementären Einzelstrangende zu assoziieren. Bei den glatten Enden hingegen liegt die Schnittstelle genau in der Mitte der Sequenz. Die Reaktionsbedingungen, unter denen ein Restriktionsverdau abläuft, sind für jedes Enzym spezifisch. Pro Ansatz eines Restriktionsverdaus wurden gemischt:

in 1x TE oder H₂O gelöste DNA
0,1 Volumen 10x Restriktionspuffer
0,1 Volumen Restriktionsenzym (4-5 U)

Der Verdau wurde 1 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6 Auftrennung von DNA Fragmenten in Agarosegelen

Bei der Gel-Elektrophorese werden Makromoleküle der Größe nach aufgetrennt. Die Elektrophorese macht von der Eigenschaft geladener Substanzen Gebrauch, in einem elektrischen Feld zu dem ihrer Ladung entgegengesetzten Pol zu wandern. Für DNA Trennungen werden Agarosegele in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Mit deren Hilfe ist es möglich, DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Agarose wurde in einem Mikrowellengerät mit 1x TAE-Puffer aufgeköcht, bis sie sich vollständig gelöst hatte. In die Gelkammer wurde der gewünschte Kamm eingesetzt. Nachdem die aufgeköchte Agarose-Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben. Das Ethidiumbromid ist ein Interkalator, der mit den DNA-Molekülen Komplexe bildet und

somit die DNA im UV-Licht bei 312 nm sichtbar macht. Nachdem die Agarose-Lösung in die Gel-Kammer gegossen wurde, ließ man sie vollständig auspolymerisieren. Der Kamm wurde herausgezogen, das Gel in die Gelkammer gelegt und die Kammer wurde mit 1x TAE aufgefüllt. Nun wurde die vorbereitete DNA-Lösung (DNA + 1/5 Volumen Stop-Lade-Puffer) in die Geltaschen pipettiert. Die Gel-Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung (50 – 100 V, je nach Größe des Gels) durchgeführt. Die Gel-Elektrophorese wurde ausschließlich mit dem Gel-Elektrophorese-System von OWL (Portsmouth), kombiniert mit einem Netzteil der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die Auswertung der Agarosegele erfolgte mit dem UV-System und einer Polaroid schwarz-weiß Kamera.

2.2.1.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick® Extraction Kits aus dem Agarosegel isoliert. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich DNA-Fragmente mit einer Größe von 70 bp bis 10 kb mit einem Verlust von 20 - 30% isolieren. Die verschiedenen Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und unter UV Licht betrachtet. Die gewünschte Bande wurde nun mit Hilfe eines Skalpell sauber ausgeschnitten, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Das Protokoll wird hier nicht aufgeführt, da strikt nach den Angaben des Herstellers gearbeitet wurde. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einer Tischzentrifuge Spectrafuge 24D von Labnet durchgeführt.

2.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Bakterien (E.coli)

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden zu 25 µl chemisch-kompetenten *E. coli* Bakterien (TOP 10, Invitrogen) 10-100 ng DNA gegeben. Danach folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis und anschließend ein 90 sek andauernder Hitzeschock bei 42°C. Daraufhin wurde der Ansatz wieder 5 min auf Eis inkubiert und dann in 250 µl SOC Medium (RT) bei 37°C 60 min geschüttelt. 20-200 µl der Bakteriensuspension wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, die mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion versehen wurden. Die LB-Agarplatten

inkubierte man üN bei 37°C. Am folgenden Tag konnten die gewachsenen Kolonien „gepickt“ werden.

2.2.2 Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*

2.2.2.1 Fliegenzucht

Die verschiedenen Fliegenstämme wurden je nach Anzahl der Fliegen in Bechern verschiedener Größe gehalten. Die Stammhaltung erfolgte bei 18°C. Bei dieser Temperatur beträgt die Generationszeit ca. 21 Tage. Fliegen, die ständig für die verschiedenen Experimente benötigt wurden, wurden bei 25°C gehalten, da die Generationszeit hier nur bei ca. 10 Tagen liegt.

2.2.2.2 Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) und Kreuzungen

Zum gezielten Absammeln von virginellen Weibchen für Kreuzungen wurden die adulten Fliegen der entsprechenden Stämme durch Abschütteln entfernt und die Becher mit den darin enthaltenen Larven und pharaten Fliegen bei 25°C gehalten. Die Weibchen wurden nun morgens und am späten Nachmittag gesammelt, um einer Befruchtung durch die männlichen Fliegen zuvorzukommen. Pro Kreuzung wurden zu 20 – 80 virginellen Weibchen ca. die Hälfte an Männchen dazugegeben und bei 25°C gehalten. Die Kreuzungen wurden in regelmäßigen Abständen umgeschüttelt. Nach einer Injektion wurde zu einer Fliege 3 Fliegen des anderen Geschlechts gegeben.

2.2.2.3 Die Gal4 Technik

Die Gal4-Technik wurde von Brand und Perrimon (1993) entwickelt und ermöglicht es, die gewünschten klonierten Gene in definierten Regionen der Fliege zu exprimieren. Das Prinzip der Methode ist die zelltypspezifische Expression des hefespezifischen Transkriptionsfaktors GAL4, durch welchen selektiv Transgene eingeschaltet werden können, die hinter die Erkennungssequenz für den GAL4-Faktor (UAS) kloniert und in die Keimbahn von *Drosophila* eingebracht wurden.

Der Vorteil dieses Systems liegt in der Existenz großer zugänglicher GAL4-Stammsammlungen sowie in dem wachsenden Katalog von Promotor-gekoppelten GAL4 Konstrukten. Die Expression eines Gens X hinter der UAS-Sequenz erfordert nur die Kreuzung der entsprechenden Transformanten mit dem gewünschten GAL4-Stamm.

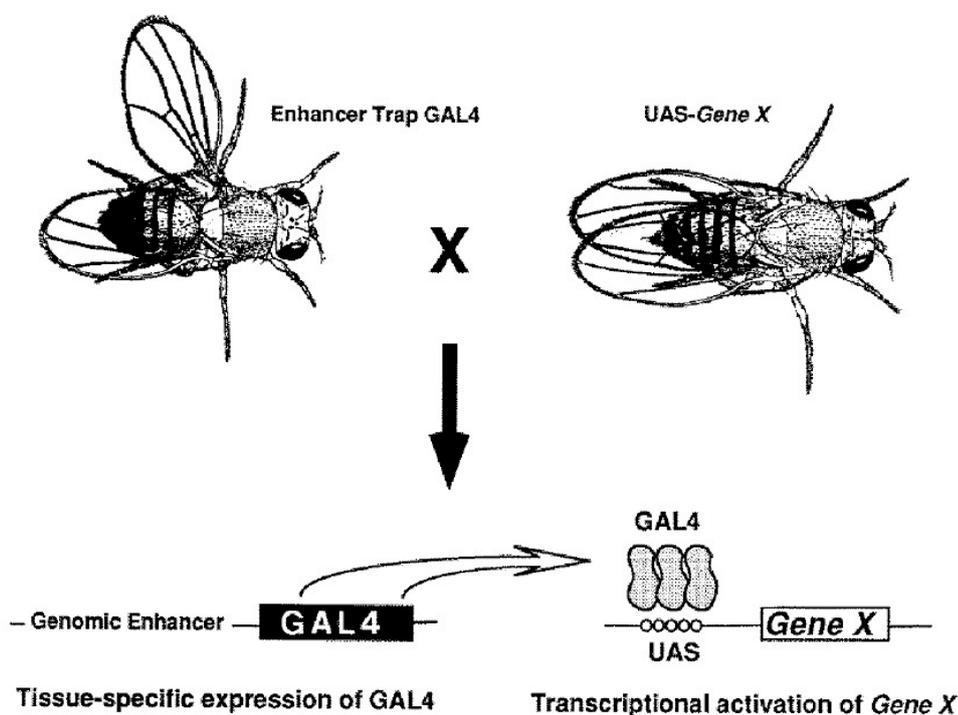


Abbildung 5: Gerichtete Genexpression in *Drosophila*. Um transgene Fliegen zu erzeugen die GAL4 in zahlreichen Zell- und Gewebespezifischen Mustern exprimieren, wird das GAL4 Gen in das Genom eingebaut. Ein GAL4-abhängiges Zielgen kann dann konstruiert werden, indem man die gewünschte Sequenz hinter die GAL4 Bindestellen kloniert. Das Zielgen ist in Abwesenheit von GAL4 wirkungslos. Um es in einem Zell- oder Gewebespezifischen Muster zu aktivieren, werden Fliegen mit dem UAS-Gen X mit Fliegen gekreuzt, die GAL4 exprimieren.

Um die Expressionsmuster der in dieser Arbeit verwendeten Gal4-Linien darzustellen, wurde UAS-Tau als Reporter verwendet (Ito et al., 1997). Das von einer Rinder-cDNA kodierte Mikrotubulus-assoziierte Protein Tau, ein neuronales Protein, verteilt sich auf das ganze Axon und läßt sich mit Anti-Tau Antiserum (Papasozomenos & Binder, 1987) sichtbar machen. Gal4 +/+ - Fliegen wurden mit UAS-Tau +/+ - Fliegen gekreuzt, nach dem Schneiden mit Anti-Tau nachgewiesen und mit NBT-BCIP gefärbt.

2.2.2.4 Keimbahntransformation von *Drosophila*-Embryonen mit Hilfe der Gateway Destination Vektoren

Die Keimbahntransformation ist eine Methode, um Fremd-DNA in Form von Transformationskonstrukten stabil in die Keimbahn von *Drosophila*-Fliegen zu bringen, und somit neue, transgene Fliegenstämme zu erzeugen. Verwendet wurden die Gateway Transformationsvektoren (Murphy, 2003) der Firma Invitrogen und des *Drosophila* Genomics Resource Centers (siehe auch „Murphy lab for the *Drosophila* research community“).

Die UAS – Destination Vektoren enthalten:

- Einen GAL4 Promotor für eine in vivo Expression
- Die Gateway Cassette mit den attR Sequenzen und der ccdb Site, welche toxisch ist und verhindert, dass Kolonien ohne ORF wachsen
- Ein mini white Gen
- Ampicillinresistenz *amp*
- Den gewünschten Marker (z.B. GFP)

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Vektor pTW verwendet, der alle genannten Eigenschaften, aber keinen Marker besitzt. Des weiteren wurde streng nach Herstellerprotokoll gearbeitet.

2.2.2.4.1 Herstellung der Injektionslösung

Für die Herstellung der Injektionslösung wurden 25 µg des zu injizierenden Expressionsvektors verwendet. Dieser wurde zuvor mit dem QIAGEN Midiprep Kit gewonnen und aufgereinigt. Des weiteren wurden 10 µg Helferplasmid (pTurbo) zugesetzt. Der DNA-Ansatz wurde nach Zugabe von 300 µl H₂O, 1/10 3M NaAc und 3 Volumen Ethanol 100% üN bei -20°C gefällt. Nach einer 30 min Zentrifugation bei 14000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Dann wurde 10 min bei 14000 x g zentrifugiert und der Überstand

verworfen. Nachdem das Pellet leicht angetrocknet war wurde es mit 50 μ l Injektionspuffer gelöst und bei -20°C gelagert. Kurz vor der Injektion wurde der Ansatz erneut kurz zentrifugiert, um größere Partikel zu entfernen, die sonst zu einer schnelleren Verstopfung der Injektionsnadel führen würden.

2.2.2.4.2 Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen der *Drosophila* Embryonen

Um die Embryonen absammeln zu können, wurde eine große Menge w^{1118} CS70 Fliegen in luftdurchlässigen Plastikröhrchen auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Diese setzte man bereits einen Tag vor dem Absammeln auf die Agarplatten, damit sich die Fliegen an die Hefe-Apfelsaftplatten gewöhnen konnten. Einige Stunden vor dem eigentlichen Injektionsvorgang wurden die Hefe-Apfelsaftplatten in einem Rhythmus von 30 min gewechselt, um die Fliegen an den Wechselrhythmus zu gewöhnen. Bei den Agarplatten ist darauf zu achten, dass die frische Hefe angetrocknet ist bevor man das Fliegenröhrchen darauf setzt, damit die Fliegen nicht an der Hefe kleben bleiben und absterben. Im Abstand von 30 min wurden nun die Embryonen abgesammelt und mit Hilfe von 7% Natriumhypochlorit dechorioniert. Dazu wurde die Apfelsaftplatte von den toten Fliegen gereinigt und für ca. 1,5 min mit der 7% Natriumhypochloritlösung überschichtet. Nachdem die Platte einige Male sanft geschwenkt wurde, lösten sich die Embryonen von der Apfelsaftplatte ab und schwammen an der Oberfläche. Mit Hilfe eines Gazenetzes wurden die Embryonen aufgefangen und mit H_2O mehrmals gewaschen. Unter einem Binokular wurden die Embryonen anschließend auf den Rand einer geteilten, frischen Apfelsaftplatte mit einer Präpariernadel so aufgereiht, dass der anteriore Pol der Embryonen zu Rand der abgeschnittenen Platte zeigte. Die Zeit für das Aufreihen betrug höchstens 8 min. Um die Embryonen nun auf einen Objektträger zu transferieren, wurde doppelseitiges Klebeband der Firma „tesa“ verwendet. Mit Hilfe dieses Klebebandes wurden die Embryonen zwischen 8-9 min auf Trockenperlen getrocknet und mit Voltalef 10S-Öl überschichtet, um sie vor dem Austrocknen zu bewahren.

2.2.2.4.3 Injektion der Konstrukte in *Drosophila* Embryonen

Durchgeführt wurde die Mikroinjektion unter einem Inversmikroskop der Firma Motic (Wetzlar), welches mit einem Mikromanipulator (Zeiss) kombiniert wurde. Als Injektionsnadeln wurden fein ausgezogene Glaskapillaren (ca. 2-8 μm) verwendet. Als Puller wurde ein Gerät der Firma Sutter Instruments P-87 verwendet. Mit Hilfe einer sehr feinen und langen Pipettenspitze (Eppendorf Microloader) wurden jeweils 2 μl Injektionsmaterial in die Spitze der Injektionsnadel gefüllt und diese in den Mikromanipulator eingesetzt. Der Objektträger mit den aufgereihten Embryonen wurde mit doppelseitigem Klebeband auf dem Objektisch fixiert und positioniert. Der Objektträger wurde vorsichtig gegen die Injektionsnadel bewegt, um deren Spitze abzubrechen und eine feine, scharfe Öffnung zu erzeugen. Durch Bewegung des Objektisches wurde die Nadel in die Nähe der zukünftigen Polzellen am posterioren Pol gebracht und kleine DNA Mengen in diesen Bereich jedes Embryos injiziert. Die zu injizierende DNA Menge wurde mittels Druckluft vom Injektor reguliert. Nachdem alle Embryonen eines Objektträgers injiziert waren, wurde dieser in eine feuchte Kammer gegeben und üN bei RT dort aufbewahrt. Am Folgetag wurde der Klebestreifen mit den Embryonen vom Objektträger abgezogen, vom Voltalef Öl befreit und auf einen Filter geklebt. Diesen steckte man so weit in ein Futterglas, dass die Embryonen das Futter berührten. Die so präparierten Futtergläser wurden bei 25°C aufbewahrt. Frisch geschlüpfte Fliegen (F0-Generation) wurden je nach Konstrukt mit w^{1118} CS70 Fliegen des anderen Geschlechts rückgekreuzt und bei 25°C gehalten. Deren Nachkommen wurden auf die Augenfarbe hin untersucht. Erst in dieser F1-Generation konnte das entsprechende Markergen Mini-white des Transformationsvektors exprimiert werden. Transformanten besitzen rote Augen. Um nun getrennte Linien zu erhalten, wurden die F1-Transformanten weiter mit w^{1118} CS70 Fliegen gekreuzt. Im Falle der in dieser Arbeit verwendeten w^{1118} CS70 Fliegen wurde die nächste Generation F2 mit Fliegen eines Balancerstammes gekreuzt, um die chromosomale Lokalisation des P-Elements festzustellen.

2.2.2.5 Olfaktorisches Lernen bei *Drosophila melanogaster*

In dieser Arbeit wurden die Fliegen mit der von Tully & Quinn (Tully 1985) entwickelten Apparatur zur klassischen olfaktorischen Konditionierung trainiert. Bei der klassischen Konditionierung wird eine Assoziation zwischen den beiden Stimuli CS und US entwickelt. Bei der olfaktorischen Konditionierung von *Drosophila* wurden in dieser Arbeit zwei Düfte (Isoamylacetat und Pentylacetat in einer vorher ermittelten Konzentration) verwendet von denen bei dem aversiven Training in jedem Einzelexperiment jeweils ein Duft mit Elektroschocks bestraft wurde (CS+), der andere blieb unbestraft (CS-). Das Gedächtnis der Fliegen konnte dann nach 3 min oder 3 h, je nachdem welche Gedächtnisphase man testen wollte, abgerufen werden. Bei einem geglückten Experiment entschied sich die Mehrzahl der Fliegen für den unbestraften Duft. Beim appetitiven Training wurde anstelle des bestrafenden Elektroschocks ein Zuckerstimulus verabreicht. Hier wurde das Training bei jedem Einzelexperiment 2x durchgeführt.

2.2.2.5.1 Trainingsapparatur „T-maze“ nach Tully & Quinn

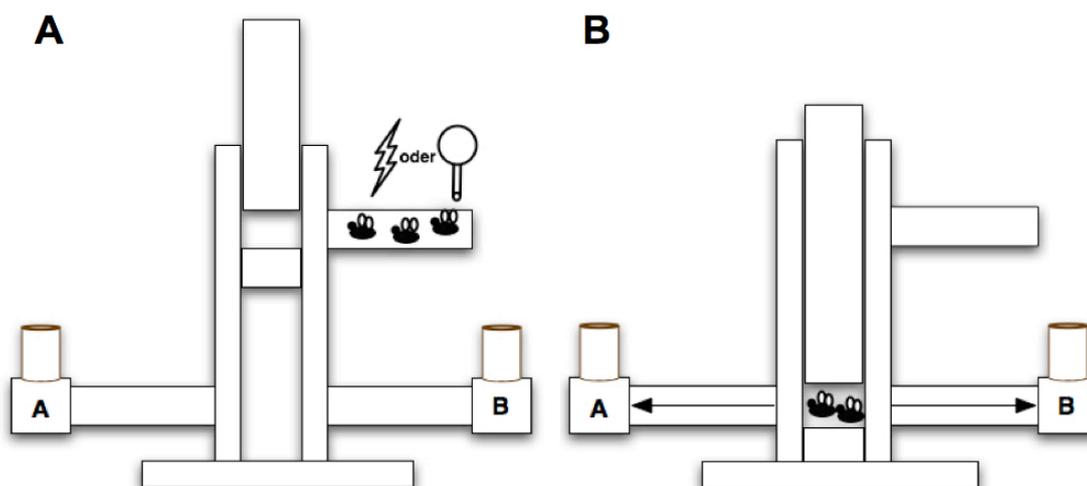


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Trainingsapparatur nach Tully & Quinn 1985. (A) Die Fliegen im Trainingsröhrchen werden einem Duft ausgesetzt und entweder mit Elektroschocks bestraft oder mit Zucker belohnt. Der andere Duft bleibt unbestraft. (B) Nachdem der Aufzug heruntergefahren wurde, können sich die Fliegen zwischen den beiden Düften entscheiden.

2.2.2.5.2 Versuchsdurchführung

Ungefähr 300 Fliegen wurden am Vortag des Experiments in frische Gläser mit wenig Fliegenfutter ohne Hefe und Filter gesetzt. Für ein Experiment wurden ca. 100 Fliegen in das Trainingsröhrchen gebracht. Dafür wurde eine selbstgebaute Vorrichtung zum Ansaugen der Fliegen aus den Gläsern verwendet: Über einen Plastikschauch wurden die Fliegen in ein Glasröhrchen (\varnothing etwa 5 mm) gesaugt, welches am hinteren Ende mit einem feinmaschigen Netz abgedichtet war. Von dort wurden sie vorsichtig in das Trainingsröhrchen geblasen. Im Trainingsröhrchen waren sie zu Beginn des Experiments für 10 sek frischer Luft ausgesetzt. Dann wurde eines der beiden gefüllten Duftkegel 60 sek lang auf das Fliegenröhrchen aufgesetzt und gleichzeitig Elektroschocks von 120 V für 1,25 sek alle 3,7 sek verabreicht. Im Standardexperiment werden 12 Elektroschocks gegeben. Nach einer 20 sek dauernden Periode mit Frischluft folgten weitere 60 sek mit dem anderen Duft, dieses Mal ohne Elektroschocks. Nach wiederum 20 sek Frischluft wurden die Fliegen durch Klopfen aus dem Trainingsröhrchen in den Aufzug überführt und dort zwischen dem Einfüll-Loch und der Testebene gefangen gehalten. Nun wurden die Duftkegel auf die Teströhrchen gesetzt und die Fliegen wurden an den Wahlpunkt zwischen den beiden Teströhrchen geschoben. Ab dem Zeitpunkt konnten sie sich 20 sek zwischen den beiden Düften entscheiden. Danach wurde der Aufzug nach oben geschoben, um die Fliegen in den jeweiligen Röhrchen gefangen zu halten und sie später zählen zu können. Die Fliegen wurden daraufhin mit CO₂ betäubt und gezählt. Eine Betäubung vor dem Experiment wurde vermieden, um das Verhalten der Fliegen nicht zu beeinflussen. Alle Experimente wurden in Dunkelheit durchgeführt. Nur eine Rotlichtquelle, für die Fliegen nicht sichtbar, war während des Trainings in Betrieb. Die durchschnittliche Raumtemperatur betrug 25 °C und die Luftfeuchtigkeit betrug ca. 80%. Die hohe Luftfeuchtigkeit erzeugt einen Feuchtigkeitsfilm in dem Trainingsröhrchen, welcher den Elektroschock wirksamer macht.

Das Gedächtnis wird im **Lernindex (Performance Index PI)** quantitativ erfasst:

$$PI = (A-B) / (A+B)$$

A = Anzahl der Fliegen, die den bestrafte Geruch vermieden haben

B = Anzahl der Fliegen, die den bestrafte Geruch nicht vermieden haben

Ein PI von 1 bedeutet, dass alle Fliegen gelernt haben. Ein Index von 0 bedeutet, dass keine Fliege gelernt hat. Ein Index von -1 besagt, dass sich alle Fliegen für den bestrafte Geruch entschieden haben. In dieser Arbeit wurde der ermittelte Lernwert mit 100 multipliziert, womit man den Lernwert in % erhielt.

Die Auswertung der olfaktorischen Konditionierung erfolgte mit Microsoft Excel und dem Statistikprogramm Systat (Windows). Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse (engl. = analysis of variance, ANOVA) mit einem Bonferroni-Test durchgeführt.

2.2.2.6 Präparation genomischer DNA aus Fliegen für PCR

Um genomische DNA für eine PCR herzustellen, wurden 1-2 Fliegen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 90 µl frisch zubereitetem „Squishing Buffer“ homogenisiert. Hierzu bedeckte man die Fliegen mit einigen Tropfen des Puffers und zerkleinerte sie mit Hilfe der Pipettenspitze. Anschließend gab man den Rest des Puffers hinzu und homogenisierte zusätzlich mit einem Ultraschall Desintegrator (Amplitude = 50%). Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Proteinase K mit einer 10 minütigen Inkubation bei 85°C abgestoppt. Vor dem Pipettieren der PCR wurde die fertige DNA herunter zentrifugiert und 1-2 µl als Template davon eingesetzt.

2.2.2.7 Histologische Paraffinschnitte

Die *Drosophila* Köpfe wurden auf speziellen „Krägen“ aufgereiht und immobilisiert. Nachdem alle herausragenden Beine herausgezupft waren, wurden die Köpfe 4 h in Carnoy-Lösung fixiert. Danach wurde 2 x 30 min in Ethanol abs. gewaschen und 2 x 30 min in Isopropanol abs. eingelegt. Nach einer 1 h Inkubation in 45°C warmem Isopropanol abs. und einer 1 h Inkubation bei 65°C in Isopropanol + Paraffin 1:1 wurden die Köpfe über Nacht in reines Paraffin gebettet. Am nächsten Morgen kamen die *Drosophila* Köpfe erneut für 2 h in frisches Paraffin, um sie am Ende auszublocken. Nachdem die Paraffinblöcke ausgehärtet waren, konnten die 7 µm Schnitte nach dem Ausblocken auf ein Hölzchen mit einem Mikrotom angefertigt und mit Hilfe eines Pinsels auf angefeuchtete Objektträger transferiert werden. Nachdem das H₂O vollständig auf der Wärmeplatte getrocknet war, wurden die Schnitte üN bei 65°C getrocknet, damit die beim Entparaffinieren nicht vom Objektträger rutschen. Nach einer 5 min Inkubation in Rotihistol wurden die Objektträger für jeweils 2 min in eine Ethanolreihe (96%, 90%, 80%, 70%, 50%) getaucht und anschließend 2 min mit H₂O und PBST gewaschen. Geblockt wurde mit PBST + 0,5% BSA + Natriumazid. Nach einer 20 min Inkubation in einer 1:1000 in Blockpuffer verdünnten Avidin-Lösung wurde 3 x 5 min mit PBST gewaschen, um danach eine 1:2000 in Blockpuffer verdünnte Biotin-Lösung aufzutragen. Danach wurde erneut 3 x 5 min mit 1x PBST gewaschen, der primäre Antikörper (in dieser Arbeit wurde ausschließlich der anti-TAU Antikörper in einer 1:000 Verdünnung eingesetzt) aufgetragen und 24 h bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper recycled und 3 x 5 min mit 1x PBST gewaschen, damit der sekundäre alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper in einer 1:400 Verdünnung aufgetragen werden kann. Dieser wurde nach einer 1,5 h Inkubation bei RT recycled und die Objektträger wieder 3 x 5 min gewaschen. Während dieser 1,5 h Inkubation konnte die NBT-BCIP Färbelösung angesetzt werden. Unmittelbar vor dem Färbvorgang wurden die beiden Komponenten gemischt und auf die Objektträger aufgetragen. Bei *Drosophila* Schnitten trat bereits nach einer 20 min Inkubation in einer zugedeckten Schale mit warmem Wasser eine deutliche Blaufärbung auf. Um den Färbvorgang zu stoppen wurde erneut 3 x 5 min mit 1x PBST gewaschen und die Schnitten „eingedeckt“. Nach einer jeweils 2 min Inkubation in Ethanol (50%,

70%, 80%, 96%, 100%) wurden die Objektträger 5 min in Rotihistol getaucht und mit Hilfe von Histokit und einem Deckglas fixiert. So konnten die fertigen Schnitte nun fotografiert oder über Jahre gelagert werden.

2.2.3 Untersuchungen an der Honigbiene *Apis mellifera carnica*

2.2.3.1 Vorbereitung der Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an Sammlerinnen der Honigbiene *Apis mellifera carnica* durchgeführt. Für jeden einzelnen Versuchsansatz wurden Bienen aus demselben Stock und zu derselben Tageszeit eingefangen, um Unterschiede zwischen Experimental- und Kontrollgruppen zu vermeiden. Die Bienen wurden einen Tag vor Beginn der Experimente beim Ausfliegen aus dem Stock in einer Plexiglaspyramide gefangen und auf Eis immobilisiert. Anschließend wurden die Bienen mit Klebestreifen in Metallröhrchen so fixiert, dass Antenne und Rüssel frei beweglich waren. Am Abend wurden die Tiere mit 1 M Zuckerwasser (Saccharose) bis zur Sättigung gefüttert und bis zum Beginn des Experiments in einem dunklen, feuchten Behälter aufbewahrt.

2.2.3.2 Injektion des Kompetitor-Peptids

Das Kompetitorpeptid sowie das Kontrollpeptid wurden mit spitz ausgezogenen 5 µl Kapillaren und einem Mikromanipulator (Zeiss) mit Druckluft zwischen die Ocellen der Tiere auf die Pilzkörper injiziert. Das eingesetzte Volumen betrug für beide Peptide 0,2 µl (1 µg) und die Lösungen wurden in 1x PBS angesetzt. Das jeweilige Peptid wurde 15 min vor dem Training oder der Präparation für die *in vitro* Untersuchungen injiziert.

2.2.3.3 Olfaktorische Konditionierung

Bei dieser Konditionierung wurde ein Duftreiz (CS) mit einem Zuckerwasserreiz (US) gepaart. Für den Duftreiz wurde Nelkenöl (Apotheke) benutzt, welches zunächst auf ein dünnes Kosmetikpapiertuch getropft, über eine Plastikspritze an beide Antennen geblasen und über ein Abzugrohr direkt hinter der Biene rasch abgesaugt wurde. Der US (1 M Zuckerwasser) wurde mit Hilfe eines sauberen Zahnstochers an eine oder an beide Antennen (Reizdauer 0,5 s) gegeben und direkt anschließend an die herausgestreckte Proboscis appliziert. Der CS wurde für ca. 4 s gegeben, während der US 2 s nach Beginn der CS-Gabe einsetzte und insgesamt ca. 5 s andauerte. Diese Art der Paarung führt erfahrungsgemäß zu der besten Lernleistung (Menzel, 1968; Menzel und Bitterman, 1983; Bitterman et al., 1983).

Für eine Konditionierungsprozedur wurden drei CS-US Paarungen mit einem zeitlichen Intervall von zwei Minuten durchgeführt. Exzitatorisches Lernen tritt nur bei der sogenannten Vorwärtspaarung (CS-US) und nicht bei der Rückwärtspaarung (US-CS) auf. Nach der Konditionierung wurden die Bienen zurück in den dunklen, feuchten Behälter gestellt. Die Auswertung der olfaktorischen Konditionierung erfolgte mit Microsoft Excel und dem Statistikprogramm Systat (Windows).

3. Ergebnisse

3.1 Hemmung der PKA-R2/AKAP Interaktion mittels eines Kompetitor-Peptids

Eine Störung der molekularen Lernprozesse mittels pharmakologischen (Drogen wie CMX etc.) und genetischen Werkzeugen in verschiedenen Spezies erbrachte den klaren Beweis dafür, dass die Gedächtnisbildung ein fortlaufender und dynamischer Prozess ist. Das Langzeitgedächtnis in Honigbienen kann zum Beispiel in eine frühe Phase (eLTM, 1–2 Tage), welche Proteinsynthese benötigt, und eine transkriptionsabhängige späte Phase (iLTM, ≥ 3 Tage) eingeteilt werden. Beide LTM Phasen scheinen von einem einzigen cAMP/PKA Prozess getriggert zu werden. Blockt man die PKA-Aktivität während der Trainingsperiode, so führt dies zu einem Verlust beider LTM Phasen.

Da die Rolle der PKA-R2/AKAP Ankerung im molekularen Prozess nicht mit pharmakologischen Mitteln untersucht werden kann, wurde für *Drosophila* ein Kompetitor-Peptid hergestellt, welches die PKA-R2/AKAP-Interaktion unterbrechen soll. Diese kann mittels einer ektopischen Expression dieses UAS-eCOPR2 Peptids gestört werden. Das eCOPR2 Kompetitor-Peptid besteht aus der Dimerisierungs- und Docking-Domäne der PKA-R2 und verhindert durch die Bindung an die Ankerproteine die Bindung der endogenen PKA-R2 an den AKAP-Komplex (Schema siehe Abbildung 7). Zudem wurde eine trunkierte Form des Kompetitor-Peptids hergestellt, welche wegen dem fehlenden Isoleucin nicht mehr an die Ankerproteine binden kann und somit die PKA-R2/AKAP-Komplexbildung nicht beeinflusst (Hausken et al., 1994).

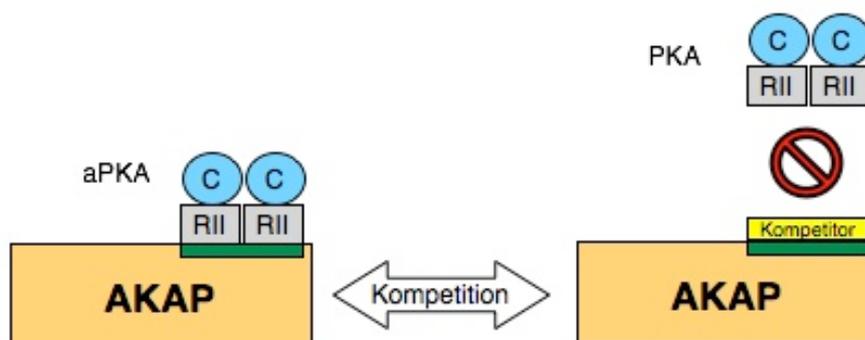


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des Kompetitor-Peptids. Die kontrollierte Expression des Kompetitor-Peptids verhindert die Bildung des PKA/AKAP-Komplexes. Das trunkeierte Peptid kann wegen dem fehlenden Isoleucin nicht an die Ankerproteine binden und interferiert somit mit der PKA-R2/AKAP-Bindung.

Um die „upstream activating sequence“ (UAS) - Expressionsvektoren mit den Kompetitor-Peptiden eCOPR2 und eCOPR2 Δ zu konstruieren, wurde der N-terminale Teil der endogenen *Drosophila* PKA-R2 Untereinheit (Park et al., 2000) aus der genomischen DNA von Wildtyp Canton-S Fliegen mittels proof reading PCR amplifiziert. Die ausgewählte Sequenz aus der R2 Untereinheit liegt in der Dimerisierungs- und Docking-Domäne, welche sich über die ersten 45 Aminosäuren erstreckt. Vergleicht man die Aminosäuresequenz der PKA-R2 von *Drosophila melanogaster* mit Maus (*Mus musculus*), Mensch (*Homo sapiens*) und Biene (*Apis mellifera*), so fällt eine hohe Homologie der Sequenzen auf (siehe Abbildung 8).

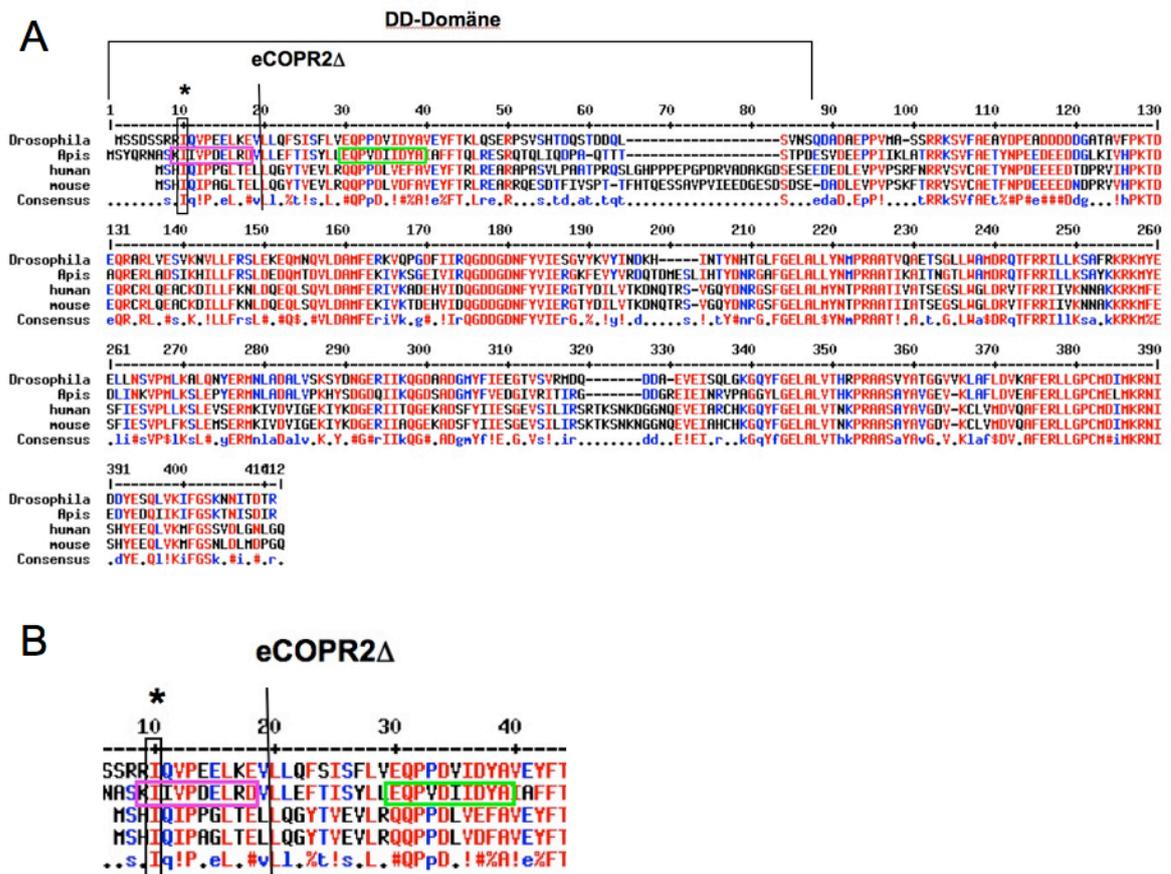


Abbildung 8: Aminosäuresequenzen der PKA-R2 Untereinheiten von *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Mus musculus* und *Homo sapiens*. (A) Rot gekennzeichnete Aminosäuren stellen eine hohe Homologie dar. Der Bereich der DD-Domäne wurde als Kompetitor-Peptid in *Drosophila* exprimiert. (B) Der Stern zeigt das für die Bindung an AKAPs zuständige Isoleucin. In einem lilafarbenen Rechteck ist die Aminosäuresequenz des Bienen-Kompetitor-Peptids angegeben. Hierzu auch im grünen Kasten das Bienen-Kontroll-Peptid, welches im trunktierten Bereich liegt und bei welchem, wie auch bei *Drosophila*, das für die Bindung an AKAPs wichtige Isoleucin fehlt.

Bei der trunktierten Version des Kompetitor-Peptids wurden die ersten 13 N-terminalen Aminosäuren deletiert. Mit Hilfe der jeweiligen R2-Primer wurde der Teil der R2 Untereinheit, der für die AKAP-Bindung zuständig ist, amplifiziert. Bei beiden Peptiden wurde der gleiche reverse Primer eingesetzt. Die PCR Produkte wurden in den pENTR-D TOPO (Invitrogen) kloniert und danach in den pUAST *Drosophila* Destination Vektor aus der Terrence Murphy's Gateway Vektor Kollektion (*Drosophila* Genomics Resource Center, Indiana University Bloomington, Bloomington, IN) überführt. Alle erforderlichen Schritte wurden strikt nach dem Hersteller-Protokoll

durchgeführt. Abbildung 9 zeigt ein Testgel, welches angefertigt wurde, um die Expressionsvektoren und die Reinheit der DNA zu überprüfen.

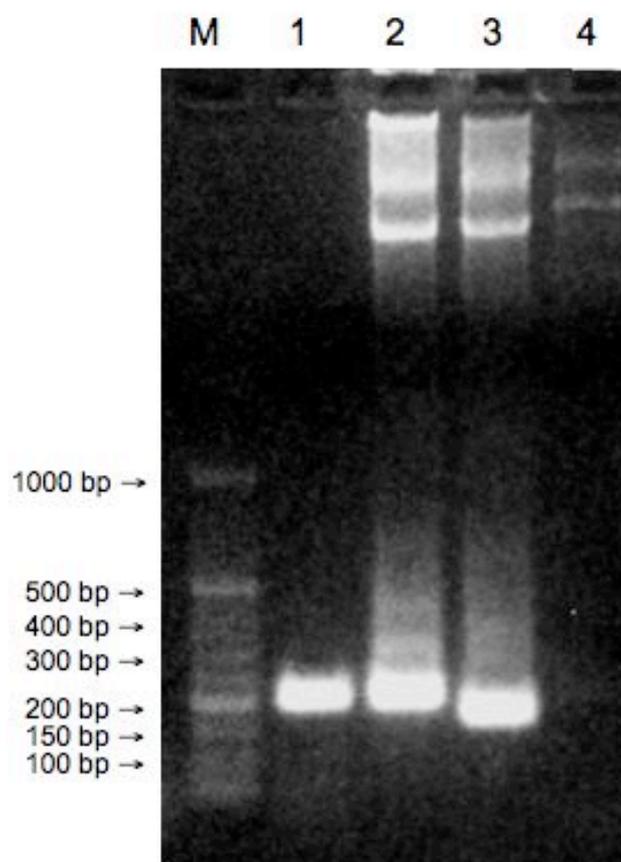


Abbildung 9: Testgel zur Überprüfung der Reinheit der Expressionsvektoren. Nach der PCR wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt, das 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt und ausgewertet. M: O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder (Fermentas), Spur 1: PKA-R2 aus genomischer DNA von Canton-S Fliegen (≈ 200 bp), Spur 2: PKA-R2 aus dem pTW Expressionsvektor (≈ 200 bp), Spur 3: PKA-R2 Δ aus dem Expressionsvektor pTW (≈ 160 bp), Spur 4: Kontrolle Leervektor pTW.

3.2 AKAP-gebundene PKA-R2 stützt eine deutlich abgrenzbare Gedächtnisphase nach dem aversiven Training

Die Verhaltensversuche in den Abbildungen 11, 13, 14, 15, 16, 17 wurden mit Dr. Martin Schwärzel durchgeführt. Die Ergebnisse wurden im „Journal of Neuroscience“ veröffentlicht (Schwärzel M., Jaeckel A., Müller U., 2007).

Um die Rolle von AKAP-gebundener PKA-R2 während der Gedächtnisbildung zu untersuchen, wurde das Kompetitor-Peptid im gesamten Nervensystem von *Drosophila* unter der Kontrolle einer pan neuronalen Treiberlinie *elav-Gal4* exprimiert. Abbildung 10 zeigt einen Paraffinschnitt eines *Drosophila*-Kopfes, welcher mit einem Anti-Tau-Antikörper und einer NBT-BCIP Färbung angefärbt wurde. Das Substrat BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) wird hierbei zu einem tiefblauen Niederschlag umgesetzt und NBT beschleunigt die Farbentwicklung.

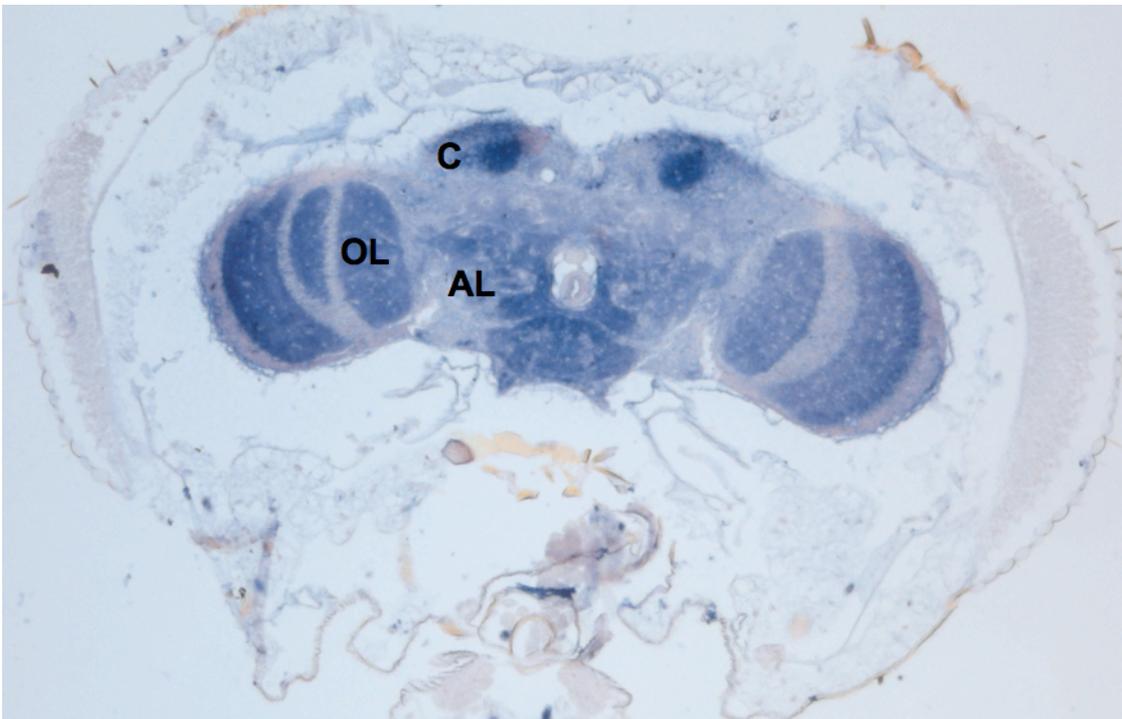


Abbildung 10: Anti-Tau-Antikörperfärbung an Paraffinschnitten einer *elav-Gal4* Treiberlinie. Zu erkennen ist eine pan neuronale Expression des Tau Proteins, unter anderem auch in den optischen Loben (OL), den Antennalloben (AL) und der Pilzkörper Calyx (C).

Man erkennt eine deutliche Blaufärbung des gesamten Gehirns. Die Gal4-Treiberlinie *elav* besitzt also in adulten Fliegen ein Expressionsmuster, welches sich über das komplette Gehirn erstreckt (pan neural). Exprimierte man nun das Kompetitor-Peptid mittels dieser *elav*-Gal4 Treiberlinie im ganzen Gehirn, so beobachtete man, dass die Gedächtnisleistung der *elav*-Gal4/UAS-eCOPR2 Fliegen wie bei den wildtypischen Fliegen bis zu 60 min normal war. Zwischen 60 und 120 min konnte man aber bei den Fliegen mit dem Kompetitor-Peptid einen starken Abfall des Gedächtnisses beobachten, welches am Ende in ein stabiles Plateau überging (siehe Abbildung 11). Dieser Lernwert betrug etwa die Hälfte der Gedächtnisleistung wie man sie bei den Kontrolltieren 2-3 h nach dem Training beobachtete. Die genetischen Kontrollen, die jeweils das Gal4 oder das UAS-eCOPR2 alleine enthielten (*elav*-Gal4/+ und UAS-eCOPR2), zeigten eine wildtypische Gedächtnisleistung, genau wie die Fliegen, die das trunkierte Peptid (*elav*-Gal4/UAS-eCOPR2 Δ) enthielten.

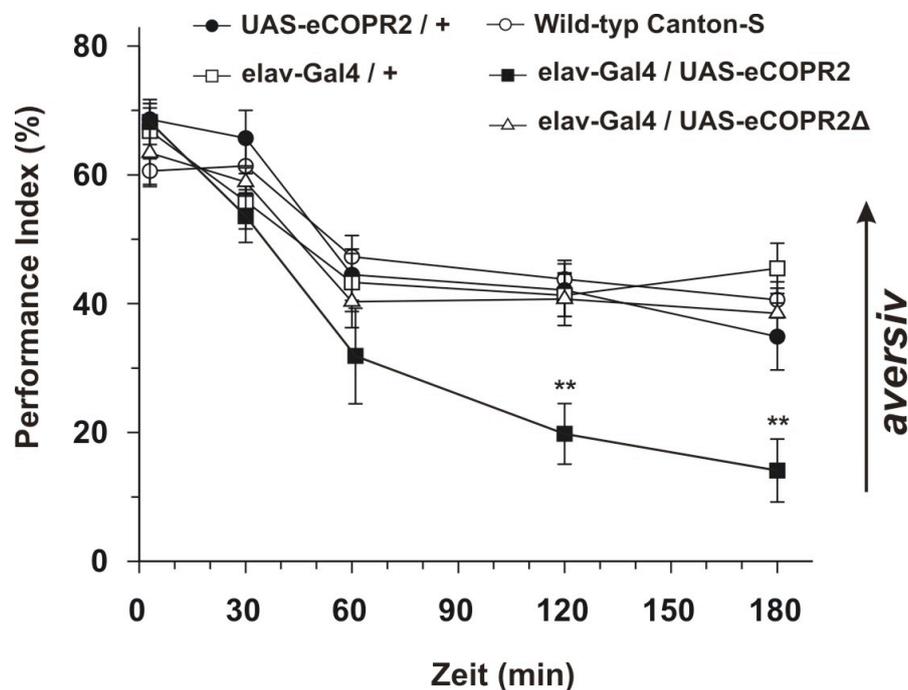


Abbildung 11: Gedächtniskinetik einiger Genotypen. Eine pan neurale Expression des Kompetitor-Peptids (*elav*-Gal4/UAS-eCOPR2) bewirkt eine Veränderung der Gedächtniskinetik: Das Gedächtnis wird bei allen Genotypen gleich gebildet, zwischen 60 min und 120 min beobachtet man allerdings bei den Fliegen mit dem Kompetitor-Peptid einen deutlichen Abfall, gefolgt von einem stabilen Plateau auf dem halben Level der wildtypischen Fliegen. Kontrollen, wie ein ungetriebenes Kompetitor-Peptid, die Gal4 Treiber alleine oder die trunkierte Version des Kompetitor-Peptids verhalten sich wie Wild-typ Canton-S. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; Wildtyp n = 9 und für alle anderen Gruppen n = 6; **p < 0.01.

Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass der Signalweg mittels AKAP-gebundener PKA-R2 nicht für die Bildung des Gedächtnisses benötigt wird. Bei den *elav-Gal4/UAS-eCOPR2*-Fliegen wurde das Gedächtnis wie bei allen anderen Genotypen in normalem Umfang erworben, was zeigt, dass die AKAP-gebundene PKA-R2 eine abgegrenzte Gedächtnisphase nach dem aversiven olfaktorischen Training unterstützt, mit einem im Zeitraum von 1-2 h erscheinenden Verhaltenseffekt.

3.3 AKAP-gebundenes PKA-R2 Gedächtnis ist in den Pilzkörpern lokalisiert

Mit dem Ziel die neuronalen Gebiete im *Drosophila*-Gehirn zu lokalisieren, in denen an AKAPs gebundene PKA-R2 benötigt wird, wurde die Expression des UAS-eCOPR2-Peptids räumlich eingeschränkt. Hierbei wurden Neuropile ins Auge gefasst, die mit der Prozessierung der olfaktorischen Information in Verbindung gebracht werden (Roman G. & Davis R.L., 2001). Der hier verwendete MB247-Gal4 Treiber steuert ~ 700 Zellen im Pilzkörper an. Abbildung 12 A zeigt eine schematische Darstellung des olfaktorischen Signalwegs im Gehirn von *Drosophila*. Die Pilzkörper sind neben den Antennalloben und den Projektionsneuronen die Gehirnstrukturen, über die die Signale des olfaktorischen Lernens vermittelt werden. Die Düfte werden von den olfaktorischen Rezeptoren in den Antennen aufgenommen und in die Glomeruli der Antennalloben projiziert. Die Projektionsneurone senden Axone zu den Calyces der Pilzkörper aus. In *Drosophila* und der Honigbiene ist die Typ 2 PKA der Hauptanteil der PKA und ist vor allem in den Pilzkörpern konzentriert (Müller, U., 1997). Abbildung 12 B zeigt einen Paraffinschnitt eines *Drosophila*-Kopfes, welcher mit einem Anti-Tau-Antikörper und einer NBT-BCIP Behandlung angefärbt wurde.

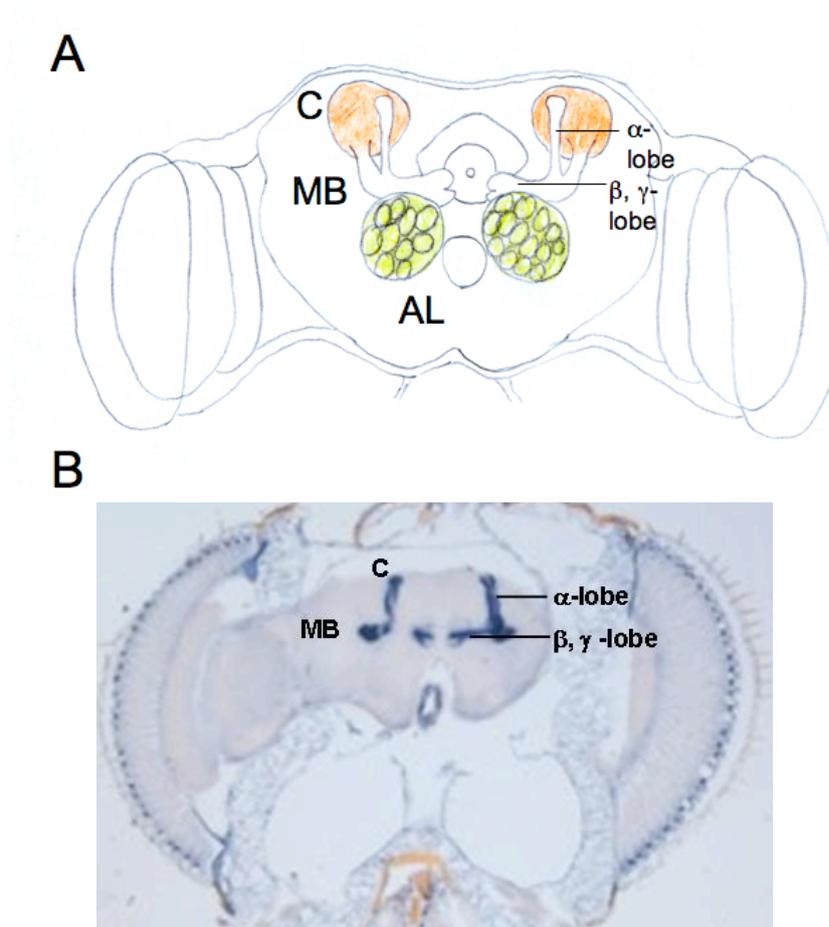


Abbildung 12: Schematische Zeichnung und Paraffinschnitt eines *Drosophila* Gehirns.

(A) Darstellung der Gehirnbereiche, die zum Signalweg des konditionierten Stimulus (CS) bei dem olfaktorischen Lernen von *Drosophila* zählen. Düfte werden von den olfaktorischen Rezeptoren in den Antennen aufgenommen und über den Antennalnerv in die Glomeruli der Antennalloben (grün; AL) projiziert. Die Projektionsneurone senden Axone zu den Calyces (orange; C) der Pilzkörper (Mushroombodies; MB) aus. (B) Anti-Tau-Antikörperfärbung an Paraffinschnitten einer MB247-Gal4 Treiberlinie. Zu erkennen ist eine Expression des Tau Proteins in allen Loben der Pilzkörper, inklusive der Calyces.

Die Färbung zeigt deutlich das Expressionsmuster der Gal4-Treiberlinie MB247 in allen Loben der Pilzkörper inklusive der Calyces. Die restlichen Gehirnbereiche bleiben ungefärbt.

Wurde nun das Kompetitor-Peptid eCOPR2 in diesen Zellen exprimiert, konnte man einen Verhaltenseffekt beobachten, der nicht von dem Effekt der pan neuronalen Expression zu unterscheiden war. Diese in Abbildung 13 gezeigten Ergebnisse führen nun zu der Schlussfolgerung, dass das PKA-R2/AKAP-abhängige Gedächtnis in den Pilzkörpern lokalisiert ist.

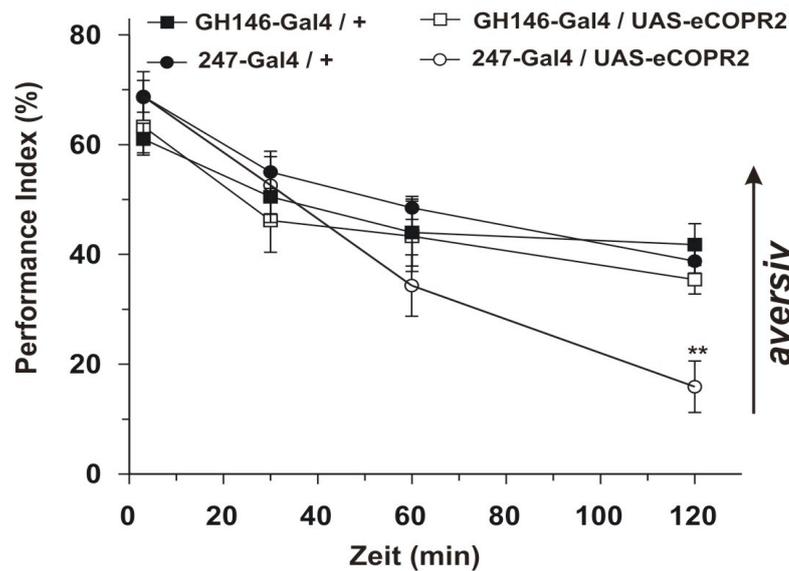


Abbildung 13: Expression des Kompetitor-Peptids in den Pilzkörpern oder den Projektionsneuronen. An AKAPs gebundene PKA-R2 wird in den Pilzkörpern benötigt (247-Gal4/UAS-eCOPR2), um das aversive Gedächtnis zu bilden. Nur bei einer Expression des UAS-eCOPR2 - Peptids in den Pilzkörpern ist der erwartete Verhaltenseffekt zu beobachten. Bei einer Expression des Kompetitor-Peptids in den Projektionsneuronen und bei den Kontrollen (Gal4 Treiber ohne Kompetitor-Peptid) ist kein Abfall des Gedächtnisses zu sehen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; Wildtyp $n = 9$ und für alle anderen Gruppen $n = 6$; ** $p < 0.01$.

3.4 Expression des UAS-eCOPR2 Kompetitor-Peptids im adulten Stadium

Um zwischen Effekten, die wirklich von der Störung der PKA-R2/AKAP - Interaktion verursacht werden und Entwicklungsdefekten, die möglicherweise durch die Expression des Kompetitor-Peptids zustande gekommen sind, unterscheiden zu können, wurde dieses zeitlich gesteuert exprimiert. Dies geschah mit Hilfe einer tub-Gal80^{ts} Treiberlinie, die es ermöglichte, die Expression in den Pilzkörpern 18 h vor dem Verhaltensexperiment zu induzieren (McGuire et al., 2003). Gal80^{ts} ist ein temperaturabhängiger Gal4-Repressor. Bei restriktiver Temperatur ist der Gal4-Repressor Gal80^{ts} aktiv und unterdrückt die Gal4 vermittelte Transkription des Gens, wohingegen ein Wechsel zur permissiven Temperatur das Gal80^{ts} Protein inaktiviert und die Expression aktiviert wird. Dieser Übergang kann innerhalb weniger Stunden geschaltet werden und erlaubt so eine räumlich-zeitlich kontrollierte Expression des Kompetitor-Peptids. Abbildung 14 zeigt bei einer restriktiven Expression des

Kompetitor-Peptids keinen Abfall der Gedächtnisleistung, im Gegensatz zu einer permissiven Expression. Diese Ergebnisse lassen einen durch die Expression des Kompetitor-Peptids hervorgerufenen Entwicklungsdefekt ausschließen.

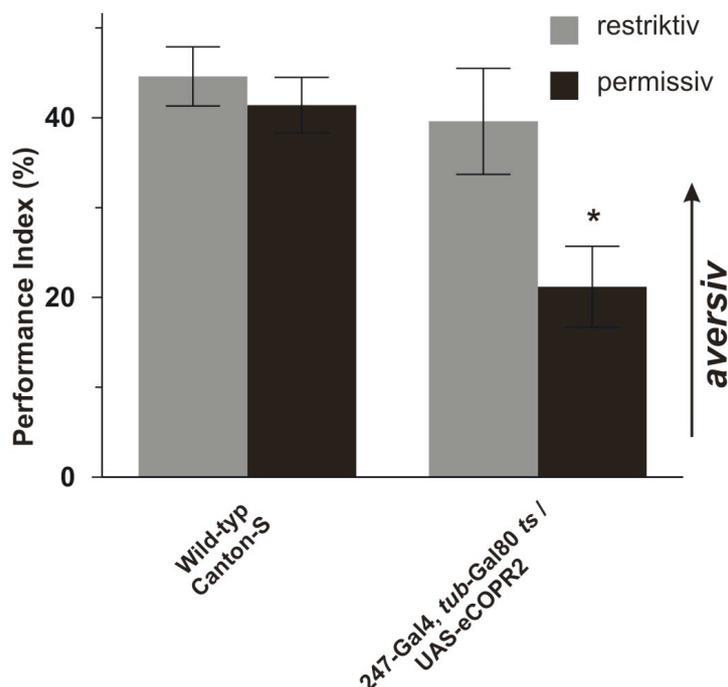


Abbildung 14: Zeitlich gesteuerte Expression des UAS-eCOPR2 Kompetitor-Peptids im adulten Stadium. Die zeitlich gesteuerte Induktion des Kompetitor-Peptids mit Hilfe eines konditionellen Blockers Gal80^{ts} erzeugt einen Verlust der 3 h Gedächtnisleistung vergleichbar mit der dauerhaften Expression. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; Wildtyp $n = 8$ und für alle anderen Gruppen $n = 6$; * $p < 0.05$.

3.5 AKAP-gebundene PKA-R2 stützt eine späte Phase des Kälte sensitiven aversiven Gedächtnisses

Nach der Beeinflussung des AKAP-gebundenen PKA-R2 Signalwegs ist ein Restgedächtnis zu beobachten, welches ohne eine zusätzliche Abnahme 2-3 h nach dem aversiven Training stabil bleibt. Um diese verbleibende Gedächtnisleistung weiter zu untersuchen, wurde eine Kältebehandlung angewendet, welche alle Formen von Kälte sensitiven olfaktorischen Gedächtnissen auslöscht (Quinn & Dudai, 1976). In der folgenden Abbildung 15 erkennt man, dass diese Behandlung in wildtypischen Fliegen einen signifikanten Abfall des 3 h Gedächtnisses verursacht, verglichen mit den unbehandelten Kontrollfliegen. Folglich besteht das

beobachtete Gedächtnis aus zwei verschiedenen Phasen: dem Kälte sensitiven Gedächtnis (ASM, anesthesia-sensitive-memory), welches nach der Kältebehandlung verloren geht und dem kälteresistenten Gedächtnis (ARM, anesthesia-resistant-memory), welches in der mit Kälte behandelten Gruppe übrig bleibt.

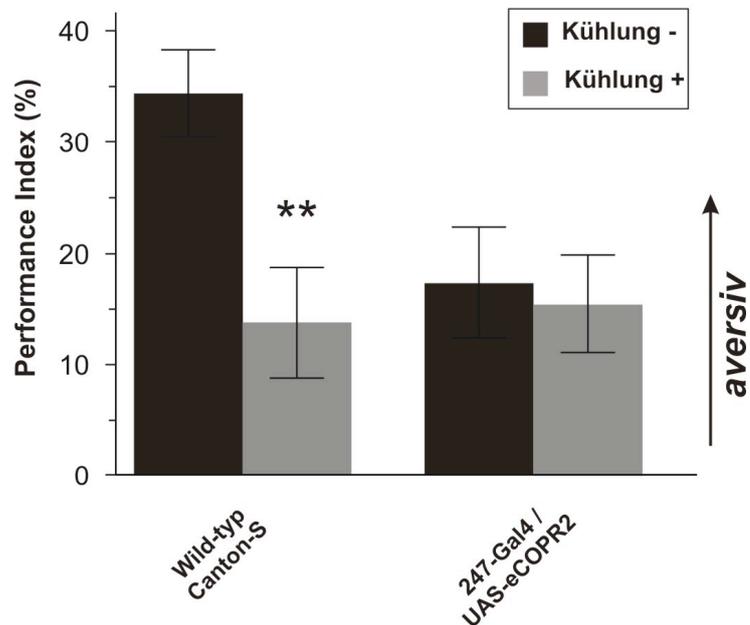


Abbildung 15: Kühlungsexperiment von Wildtyp und 247-Gal4/UAS-eCOPR2 Fliegen. Das 3 h Gedächtnis besteht aus zwei klar trennbaren Phasen, ASM und ARM. Eine Kältebehandlung führte zu einem signifikanten Abfall der Gedächtnisleistung in wildtypischen Fliegen. Die Grafik zeigt das bleibende ARM (grau) und ARM plus ASM (schwarz). In 247-Gal4/UAS-eCOPR2 Fliegen war das ASM komplett gelöscht, unabhängig von einer Kältebehandlung ($p > 0.05$). Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; Wildtyp $n = 8$ und für alle anderen Gruppen $n = 6$; ** $p < 0.01$.

Fliegen, die das Kompetitor-Peptid in den Pilzkörpern exprimierten, entwickelten ein Gedächtnis, welches vergleichbar mit dem ARM ist. Beide Lernwerte waren gleich groß, unabhängig von einer Kühlung. Dieses Ergebnis teilt das ASM in zwei funktionell unterschiedliche Phasen: ein frühes ASM, welches für die Prozessierung des STM benötigt wird und ein spätes ASM, welches mit ARM das MTM bildet. Das spätere ASM benötigt den AKAP gebundenen PKA-R2 Signalweg, wie der Gedächtnisverlust in der Kompetitor-Peptid exprimierenden Gruppe zeigt.

3.6 Der AKAP-gebundene PKA-R2 Signalweg wird im appetitiven Gedächtnis nicht benötigt

Abhängig vom Stimulus, welcher während des Trainings verwendet wird (Elektroschock oder Zucker), können aversive oder appetitive Gedächtnisse erworben werden. Beide Arten des Kurzzeitgedächtnisses sind in den Pilzkörpern lokalisiert und werden durch einen cAMP-abhängigen Signalweg erlangt (Schwärzel et al., 2003). Downstream des cAMP Signalwegs wird AKAP-gebundene PKA-R2 nicht für die Bildung des appetitiven Gedächtnisses benötigt (Abbildung 16). Weder eine pan neurale, noch eine räumlich begrenzte Expression des UAS-eCOPR2 Peptids in einigen Neuropilen, welche in der Prozessierung der olfaktorischen Information eine Rolle spielen, zeigten einen signifikanten Gedächtnisverlust bis zu 24 h.

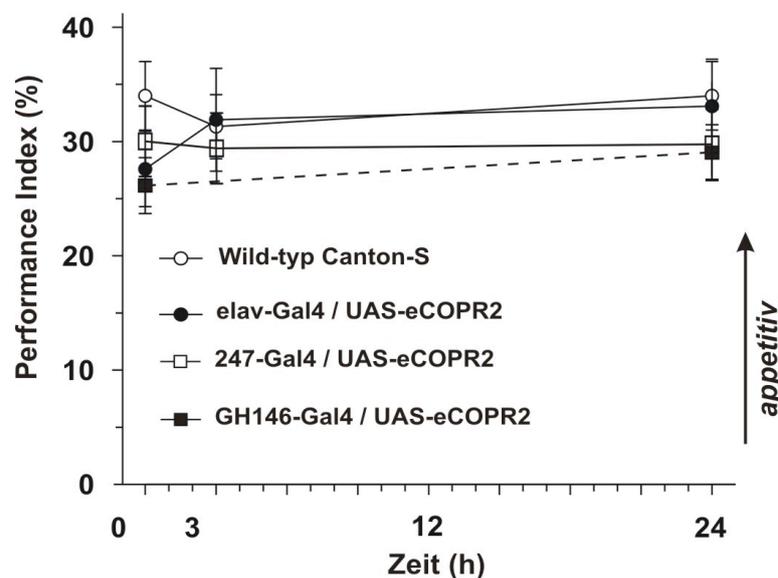


Abbildung 16: AKAP-gebundene PKA-R2 wird nicht für die Bildung des appetitiven Gedächtnisses benötigt. Weder eine pan neurale (*elav-Gal4/UAS-eCOPR2*), noch Pilzkörper spezifische (*247-Gal4/UAS-eCOPR2*) oder Projektionsneuron-spezifische Expression (*GH146-Gal4/UAS-eCOPR2*) beeinträchtigten die Gedächtnisleistung nach dem appetitiven Training bis zu 24 h (p Werte > 0.05). Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; Wildtyp $n = 9$ und für alle anderen Gruppen $n = 6$.

Das appetitive Gedächtnis besteht wie das aversive Gedächtnis aus ASM und ARM. Wildtyp Fliegen zeigten nach einer Kältebehandlung einen signifikanten Verlust des

3 h Gedächtnisses (siehe Abbildung 17). Der gleiche Gedächtnisverlust wurde in Fliegen beobachtet, welche das Kompetitor-Peptid im Nervensystem exprimierten und auch appetitiv trainiert wurden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass appetitives ASM unabhängig von AKAP-gebundener PKA-R2 ist.

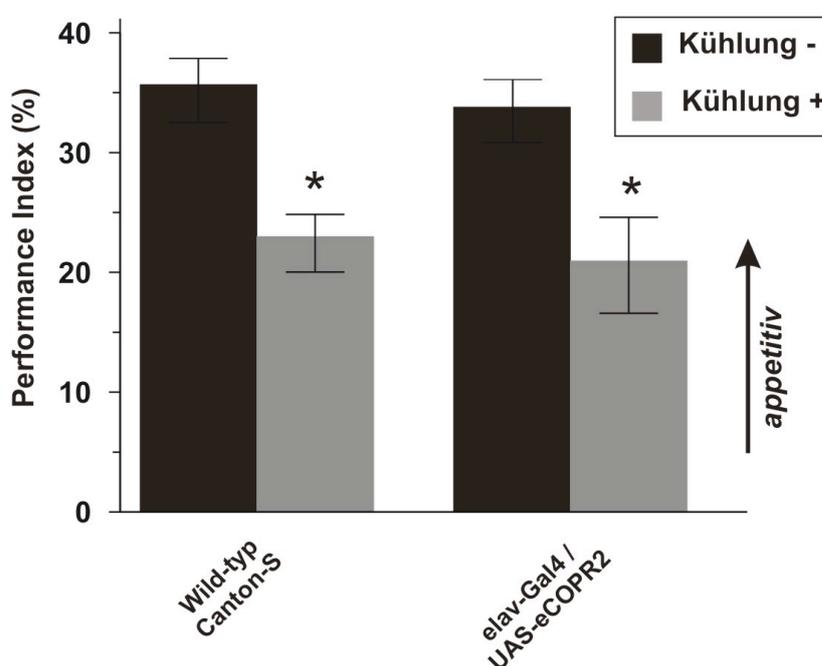


Abbildung 17: 3 h Gedächtnis von wildtypischen und *elav-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen nach einer Kältebehandlung. Wildtypische Fliegen zeigten einen signifikanten Gedächtnisverlust, verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren. Eine pan neurale Expression des Kompetitor-Peptids in *elav-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen zeigt eine Gedächtnisbildung, die nicht von wildtypischen Kontrolltieren zu unterscheiden ist. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; Wildtyp $n = 9$ und für alle anderen Gruppen $n = 6$; * $p < 0.05$.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass nur während der aversiven Konsolidierung eines olfaktorischen Mittelzeitgedächtnisses AKAP-gebundene PKA benötigt wird.

3.7 Benötigen die Signalwege zur Induktion des STM geankerte PKA?

Da die katalytische Funktion der PKA das Lernen und die Gedächtnisbildung beeinflusst, festigen diese Ergebnisse unter anderem die Idee, dass verschiedene PKA-Pools in der Verhaltensplastizität *in vivo* eine Rolle spielen. Um diese „organisierenden“ Prozesse während des Lernens und der Gedächtnisbildung näher zu charakterisieren, wurde die Trainings-Durchführung verändert. Bei der klassischen olfaktorischen Konditionierung von *Drosophila* Fliegen wurden bisher 12 Elektroschocks mit einem Inter-Trial-Intervall von 3,7 sek verabreicht.

Die Frage war nun was passiert, wenn man die Trainingsstärke reduziert und ein Kurzzeitgedächtnis konditioniert. Ein Konditionierungsdurchgang (1 Schock) führt nämlich bei *Drosophila* zu der Bildung eines dekrementalen und Zykloheximid (CXM = Proteinsynthese Inhibitor) insensitiven Gedächtnisses (Lu et a.. 2007). Um die Fliegen schwach zu trainieren, wurden neben den 12 Elektroschocks auch ein oder zwei Schocks angewendet. Benötigt der Signalweg, mit welchem das Kurzzeitgedächtnis induziert wird, auch geankerte PKA? Abbildung 18 zeigt schematisch die verschiedenen Trainingsparameter. Nach dem Start der Duftpräsentation folgen direkt wenige Sekunden danach die Elektroschocks. Bis auf die Veränderung der Elektroschockanzahl blieben alle anderen Parameter gleich.

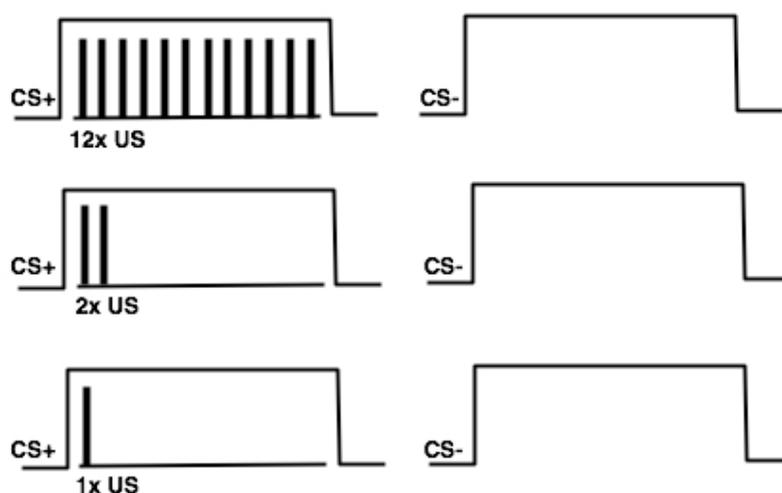


Abbildung 18: Schema der variierten Trainingsdurchführung. Bei der klassischen olfaktorischen Konditionierung werden den Fliegen während des CS+ 12 Elektroshocks mit einem Pausen-Intervall von 3,7 sek verabreicht. Bei der Variation des Trainings wurde nun kurz nach der Präsentation des Duftes ein oder zwei Elektroshocks gegeben. Der CS- blieb wie beim klassischen Training unbestraft.

3.8 Der Effekt der veränderten Trainingsparameter auf die Bildung des PKA-R2/ AKAP- abhängigen Gedächtnisses

Trainierte ich wildtypische Canton-S Fliegen schwach mit einem oder zwei Elektroshocks, konnte im 3 min Kurzzeitgedächtnis zwischen den beiden Trainingsformen kein Unterschied zwischen den Lernwerten festgestellt werden. Bei einer klassischen Konditionierung mit 12 Elektroshocks war ein signifikanter Unterschied zwischen dem 2 Schock und 12 Schock 3 min Gedächtnis zu beobachten (Abb. 19 A). Exprimierte ich das Kompetitor-Peptid pan neural in *elav-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen und trainierte sie mit 1, 2 und 12 Elektroshocks, dann führte dies zu den gleichen Lernereignissen wie bei den Canton-S Fliegen (Abb. 19 B). Anhand dieser Ergebnisse konnte nun gezeigt werden, dass AKAP-gebundene PKA-R2 auch bei einem schwachen Training nicht für die Bildung des 3 min STM benötigt wird.

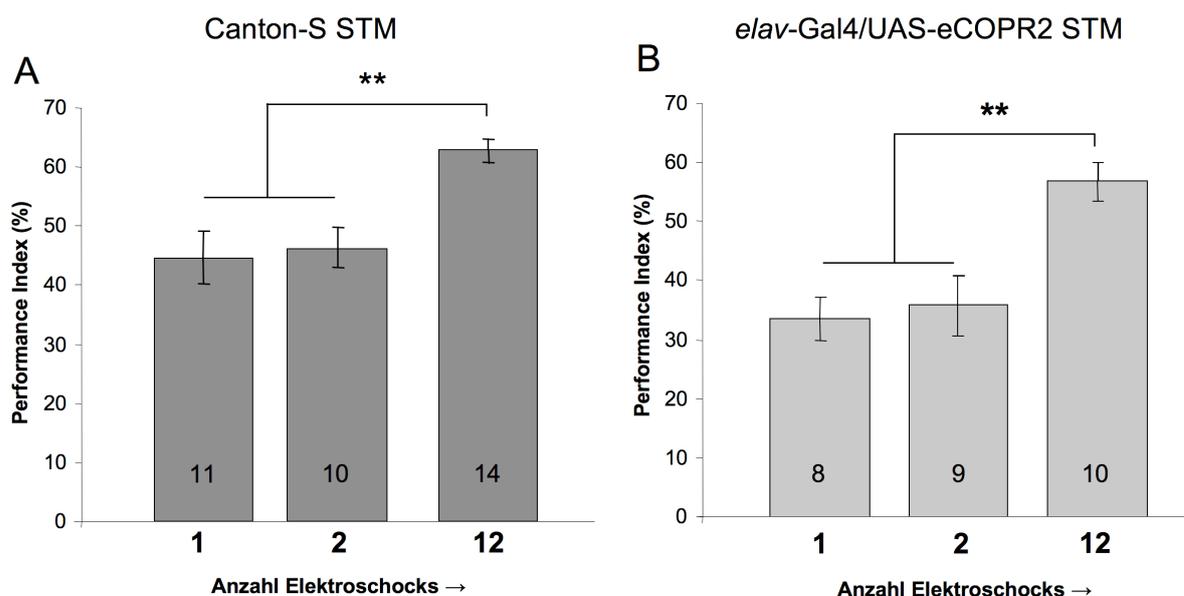


Abbildung 19: 3 min Kurzzeitgedächtnisse von wildtypischen und *elav-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen, welche mit 1, 2 oder 12 Elektroschocks trainiert wurden (A) Bei wildtypischen Canton-S Fliegen ist kein Unterschied zwischen dem 1 oder 2 Schock Gedächtnis zu erkennen. Verabreicht man aber die 12 Elektroschocks wie beim klassischen Training, dann ist ein merklicher Anstieg des Gedächtnisses zu beobachten. (B) Eine pan neurale Expression des Kompetitor-Peptids in *elav-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen zeigt das gleiche Lernereignis wie die Wildtyp-Fliegen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; die Anzahl n ist in den Balken angegeben; **p < 0.01.

Wurden die wildtypischen Fliegen nach 3 h auf ein bestehendes Mittelzeitgedächtnis getestet, war der Lernindex erwartungsgemäß niedriger als die Lernwerte im Kurzzeitgedächtnis. Zudem war ein Unterschied zwischen dem 1 Schock Gedächtnis und dem 2 Schock Gedächtnis zu beobachten. Zwischen dem 2 Schock und 12 Schock Gedächtnis gab es keinen Unterschied mehr, was darauf schließen lässt, dass das Gedächtnis parallel und nicht seriell prozessiert wird (siehe Abbildung 20 A). Das erworbene Gedächtnis ist also abhängig von der Konditionierungsart. Die Gedächtnisformen (STM, MTM, LTM) gehen folglich nicht auseinander hervor. Da der Lernindex nach einer Konditionierung mit einem Schock sehr gering ist, wurde von jedem Genotyp der Lernwert ohne Schockbehandlung (0 Schock) ermittelt. Bei allen Genotypen war der 0 Schock Lernwert signifikant unterschiedlich zu den 1, 2 und 12 Schock Lernwerten, was aussagt, dass auch bei

einer 1 Schock Behandlung ein Gedächtnis gebildet wird. Wurde das Kompetitor-Peptid nun pan neural in *eIav-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen exprimiert, gibt es keinen Unterschied mehr zwischen dem 1 und 2 Schock Gedächtnis. Wie erwartet beobachtete man einen Abfall des Gedächtnisses nach einer klassischen 12 Schock Konditionierung (Abb. 20 B). Den gleichen Effekt sah man nun auch bei dem 2 Schock Gedächtnis. Der Lernwert des 1 Schock Gedächtnisses ist aber identisch mit dem der wildtypischen Canton-S Fliegen (Abb. 20 A). Somit liegt die Vermutung nah, dass ab dem 2. Schock während der Konditionierung AKAP-gebundene PKA benötigt wird, um ein stabiles MTM mit dem Kälte resistenten und Kälte sensitiven Gedächtnis zu bilden.

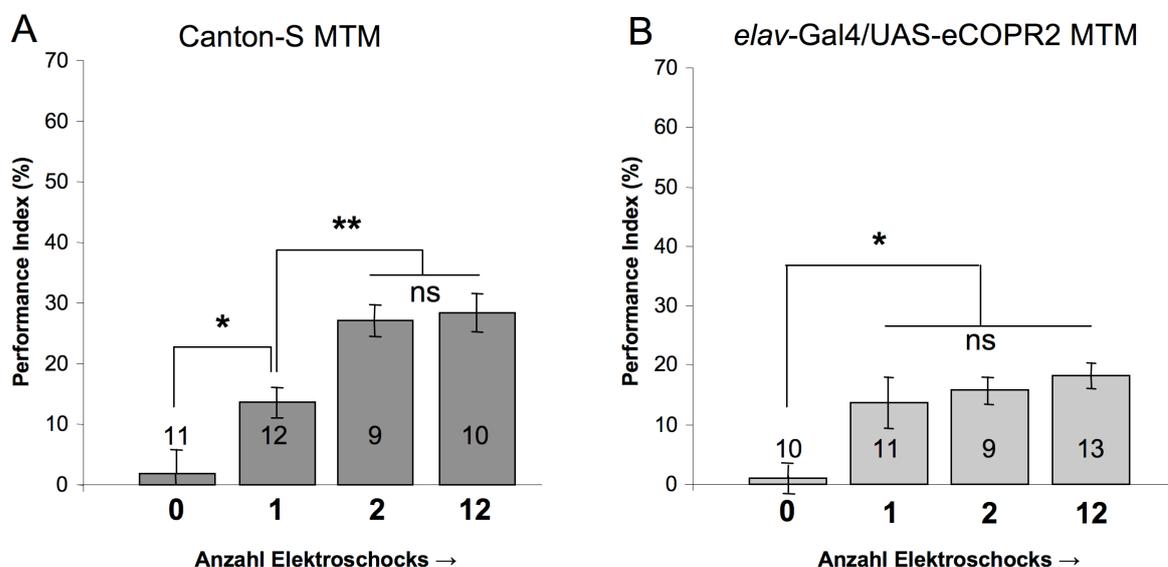


Abbildung 20: Abruf des 3 h Gedächtnisses von wildtypischen und *eIav-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen nach einer 1, 2, 12 Elektroschock Behandlung (MTM). (A) Bei dem Mittelzeit-Gedächtnis ist bei Canton-S Fliegen ein Unterschied zwischen dem 1 und 2 Schock Gedächtnis zu beobachten. Das 2 und 12 Schock Gedächtnis sind identisch. (B) Im Gegensatz zu den Canton-S Fliegen ist bei einer pan neuronalen Expression des Kompetitor-Peptids kein Unterschied zwischen den verschiedenen Schockbehandlungen erkennbar. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; die Anzahl n ist in den Balken angegeben; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.9 Das AKAP-gebundene PKA-R2 Gedächtnis wird ab dem 2. Schock in den Pilzkörpern benötigt

Da die vorangegangenen Ergebnisse gezeigt haben, dass das an AKAPs gebundene PKA-R2 Gedächtnis in den Pilzkörpern lokalisiert ist, wurden auch die Fliegen schwach trainiert, die das Kompetitor-Peptid nur in den Pilzkörpern exprimieren (247-Gal4/UAS-eCOPR2). Verwendet wurde auch hier wieder die MB247 Gal4 Treiberlinie (Abb 21 A). Die erhaltenen Lernereignisse sind identisch mit denen der Fliegen, die das Kompetitor-Peptid pan neural exprimierten (Abb 20 B). Somit kann man sagen, dass geankerte PKA ab einem 2. Schock in den Pilzkörpern benötigt wird. Als Kontrolle dienten 247-Gal4/+ Fliegen, die eine „ungetriebene“ MB247 Gal4 Treiberlinie exprimieren. Hier wurde die Gal4 Treiberlinie in einem wildtypischen genetischen Hintergrund exprimiert. Abbildung 21 B zeigt, dass alle Lernereignisse identisch mit den Lernereignissen der Canton-S Fliegen sind (Abbildung 20 A). Somit ist der Effekt ausschließlich auf das Kompetitor-Peptid zurückzuführen.

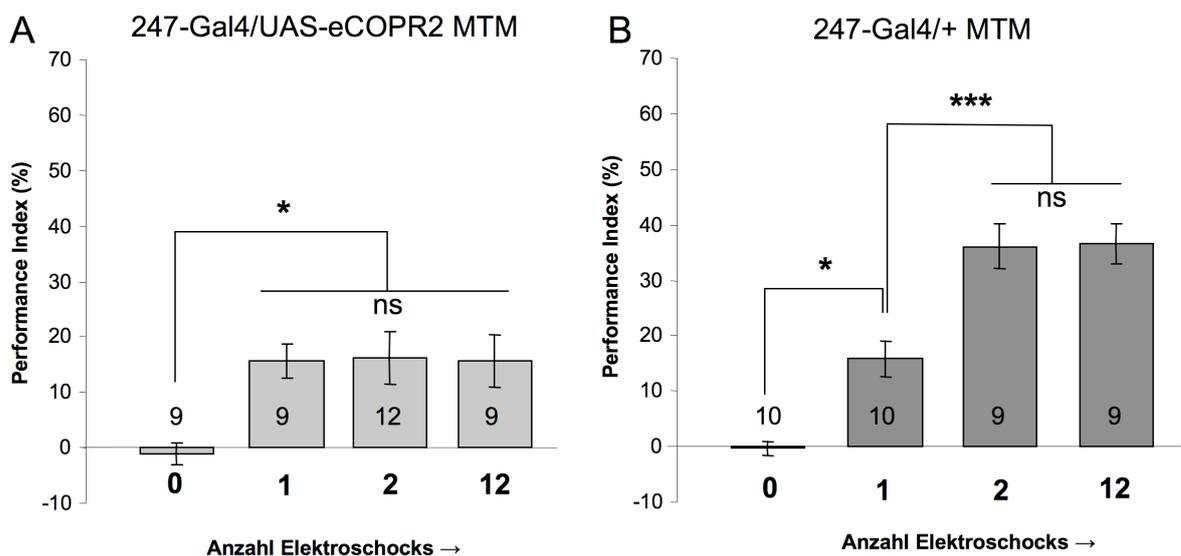


Abbildung 21: An Ankerproteine gebundene PKA-R2 wird in den Pilzkörpern benötigt, um das aversive 3 h Gedächtnis zu bilden. (A) Bei einer Expression des UAS-eCOPR2-Peptids in den Pilzkörpern sind die Lernwerte bei 1, 2 und 12 Schocks gleich groß. (B) Eine Expression der MB247 Gal4 Treiberlinie in einem wildtypischen genetischen Hintergrund (MB247/+) dient als Kontrolle und enthält nur die Gal4-Linie ohne das UAS-eCOPR2 Konstrukt. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; die Anzahl n ist in den Balken angegeben; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

3.10 Der erhaltene Lerneffekt ist allein auf das Kompetitor-Peptid zurückzuführen

Um zu zeigen, dass der Lerneffekt allein auf das Kompetitor-Peptid zurückzuführen ist, trainierte ich einige Kontrollen mit den gleichen Parametern und testete sie auf ein bestehendes MTM. So z.B. *e/av-Gal4/UAS-eCOPR2Δ* Fliegen, die die trunkierte Variante des Kompetitor-Peptids exprimierten und *UAS-eCOPR2Δ/+* Fliegen, welche die „ungetriebene“ Variante des Kompetitor-Peptids exprimieren (Abbildung 22). Bei beiden Kontrollen beobachtete man wie erwartet die gleichen Lernereignisse wie bei Canton-S Fliegen (Abbildung 20 A). Auch hier sind die 0 Schock Lernwerte signifikant unterschiedlich zu den 1, 2 und 12 Schock Lernwerten.

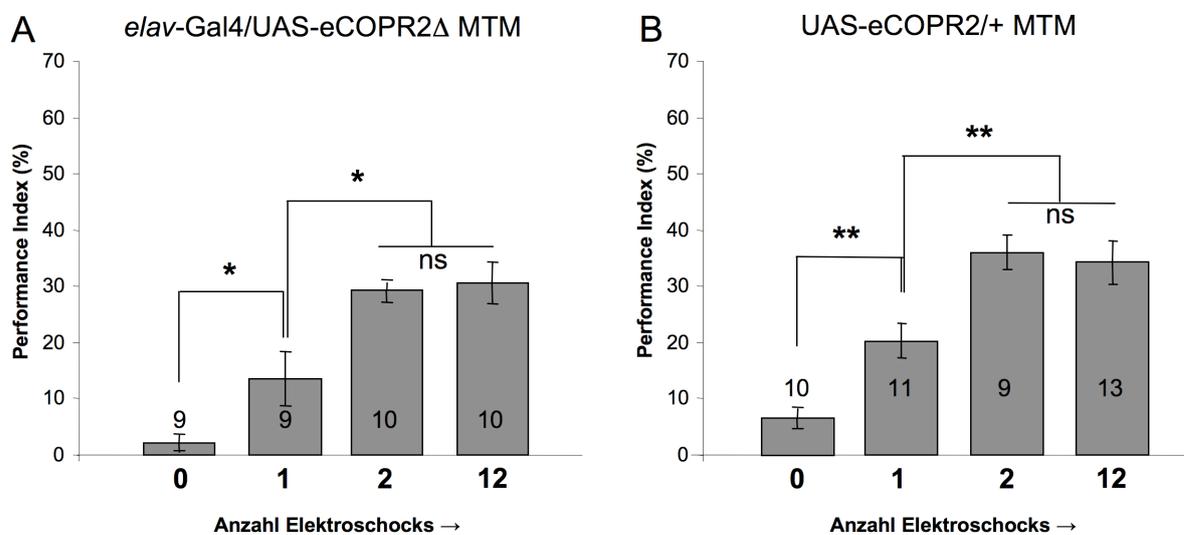


Abbildung 22: 3 h Mittelzeitgedächtnisse von Fliegen, in denen das trunkierte Peptid (*e/av-Gal4/UAS-eCOPR2Δ*) und die ungetriebene Variante des Kompetitor-Peptids als Kontrollen exprimiert wurden. (A) Bei der pan neuronalen Expression des trunkierten Kompetitor-Peptids (*e/av-Gal4/UAS-eCOPR2Δ*) sowie bei der (B) Expression des Kompetitor-Peptids in einem wildtypischen genetischen Hintergrund (*UAS-eCOPR2/+*) sind keine Unterschiede zwischen diesen Linien und Canton-S zu erkennen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; die Anzahl n ist in den Balken angegeben; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.11 Eine 1 Schock Konditionierung induziert ein Kälte resistentes Gedächtnis

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das mit 2 oder 12 Schocks induzierte 3 h Gedächtnis bei *Drosophila* aus dem Kälte sensitiven (ASM) und Kälte resistenten (ARM) Gedächtnis besteht. Eine Expression des Kompetitor-Peptids in *elav-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen und in *247-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen zeigte, dass im Mittelzeitgedächtnis ab dem 2. Schock AKAP-gebundene PKA-R2 benötigt wird. Das 1 Schock Gedächtnis blieb hingegen immer gleich hoch. Nullkontrollen zeigten, dass das 1 Schock Gedächtnis trotz geringem Lernindex auch wirklich ein Gedächtnis ist. Aber wie ist dieses Gedächtnis nun zusammengesetzt bzw. charakterisiert?

Um diese Frage zu beantworten, führte ich eine Kältebehandlung an wildtypischen Canton-S Fliegen durch, um zu sehen ob, das 1 Schock Gedächtnis einen Kälte sensitiven Teil besitzt (siehe Abbildung 23). Genetisch wurde dies schon mit *elav-Gal4/UAS-eCOPR2* Fliegen in Abbildung 20 B gezeigt. Die Fliegen, die das Kompetitor-Peptid exprimieren, können kein Kälte sensitives Gedächtnis (ASM) bilden (Schwärzel et al., 2007). Kühlt man Fliegen, die man mit 1 Schock, 2 Schock und 12 Schocks trainiert hat 30 min vor dem Testen auf ein Mittelzeitgedächtnis auf Eis, dann beobachtete man, dass die 1, 2 und 12 Schock Lernwerte gleich hoch sind. Bei dem 2 und 12 Schock Gedächtnis wurde durch die Kühlung das Kälte sensitive Gedächtnis gelöscht und nur das kälteresistente Gedächtnis blieb erhalten. Das 1 Schock Gedächtnis blieb allerdings unverändert.

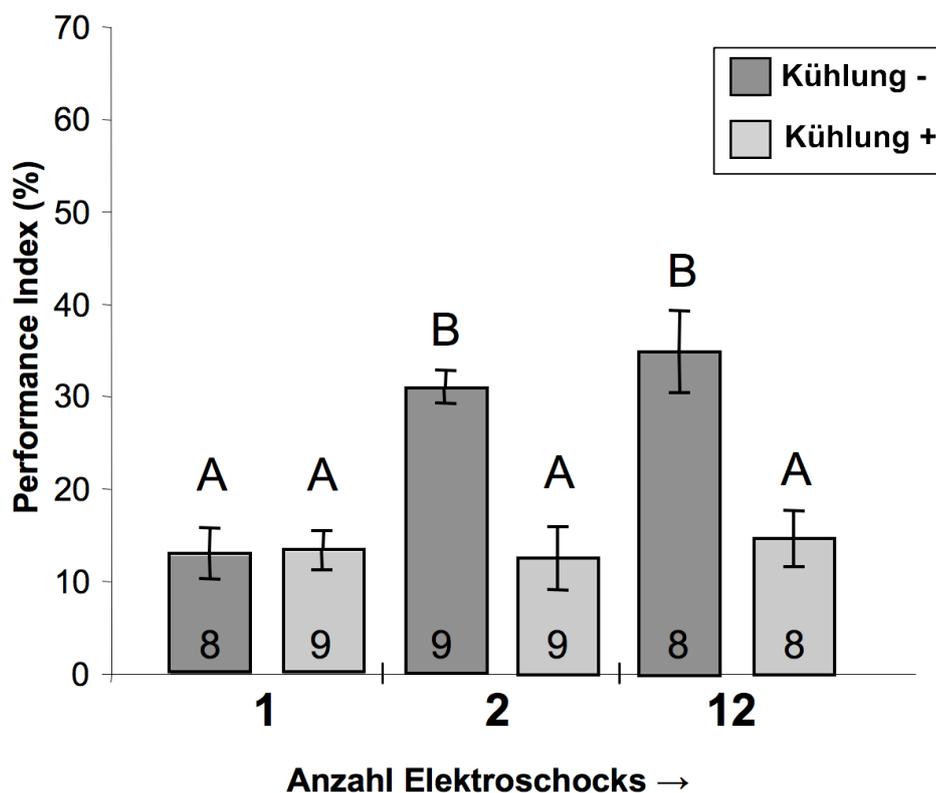


Abbildung 23: Lernwerte von mit Kälte behandelten Canton-S Fliegen, die mit 1, 2 oder 12 Schocks trainiert und auf ein 3 h Gedächtnis getestet wurden. Man beobachtete ein Fehlen des kältesensitiven Gedächtnisses bei dem 2 und 12 Schock Gedächtnis, aber keine Veränderung bei dem 1 Schock Gedächtnis. Die Zahlen in den Balken stellen die Anzahl der Versuche dar, Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM. Die Mittelwerte, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($p \leq 0.01$). Die Anzahl n ist in den Balken angegeben.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen in Abb. 20 B überein. Hier wurde bei dem 2 Schock und 12 Schock Gedächtnis mit Hilfe des Kompetitor-Peptids das Kälte sensitive Gedächtnis gelöscht und das Kälte resistente Gedächtnis blieb erhalten. Bei dem 1 Schock Gedächtnis hingegen war kein Unterschied zwischen Kühlung und ohne Kühlung zu beobachten. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass bei einer 1 Schock Konditionierung das Kälte resistente Gedächtnis gebildet wird, welches sich nicht löschen lässt. Erst bei einer 2 Schock Konditionierung wird das Kälte sensitive Gedächtnis gebildet.

3.12 AKAP-gebundene PKA-R2 stützt auch bei der Honigbiene (*Apis mellifera*) eine deutlich abgrenzbare Gedächtnisphase

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei *Drosophila* gezeigt werden, dass während der Konsolidierung eines olfaktorischen Mittelzeitgedächtnisses AKAP-gebundene PKA benötigt wird. Um die Rolle von an AKAPs geankerte PKA beim Lernen auch in anderen Spezies (z.B. Biene, Maus, Ratte) untersuchen zu können, bei denen eine genetische Überexpression des Kompetitor-Peptids nicht möglich ist, wurde eine andere Technik verwendet, um das Kompetitor-Peptid in die Zellen zu bringen. Bei der Honigbiene wurde das Kompetitor-Peptid via Injektion direkt in das Gehirn eingeschleust. Da Peptide an sich nicht in der Lage sind, Zellmembranen zu überwinden, wurde ein an Transfektionspeptide gekoppeltes Kompetitor-Peptid verwendet (siehe Abbildung 24). Der Vorteil daran ist, dass diese Technik auf jedes Versuchstier anwendbar ist, im Gegensatz zum genetischen Ansatz bei *Drosophila*. Dieses synthetische Transfektionspeptid besteht, wie das *Drosophila* Kompetitor-Peptid, aus einem Stück der regulatorischen Untereinheit der PKA und enthält das für die Bindung an Ankerproteine notwendige Isoleucin. Das Kontrollpeptid besteht aus einer Aminosäuresequenz, die wie auch bei *Drosophila* aus dem Bereich der regulatorischen Untereinheit besteht, welche wegen dem fehlenden Isoleucin nicht mehr an Ankerproteine binden kann. Zudem enthalten beide Peptide eine Bisulfitbrücke und eine Leadersequenz, die das Peptid in die Zellen schleust (Mochly-Rosen et al., 1991). Die Bisulfitbrücke wird innerhalb der Zelle reduziert und somit samt Leadersequenz abgespalten.

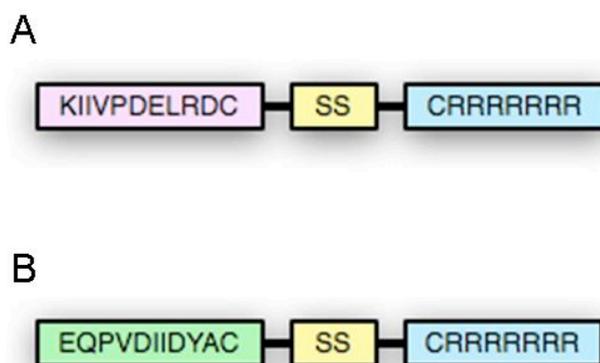


Abbildung 24: Schematische Darstellung des an Transfektionspeptide gekoppelten Kompetitor- und Kontroll-Peptids. (A) Kompetitor-Peptid (rosa) mit Transfektionspeptid (gelb = Bisulfitbrücke; blau = Leadersequenz). (B) Kontroll-Peptid (grün) mit Transfektionspeptid.

Ziel dieses Versuches war es, die bei *Drosophila* durchgeführten Untersuchungen auch bei einem zweiten Modell durchzuführen. Als Modell wurde die Honigbiene (*Apis mellifera*) ausgewählt.

1 µg Transfektionspeptid oder Kontroll-Peptid wurde mit Hilfe eines Mikro-manipulators zwischen die Ozellen injiziert. So gelangte das Peptid genau zu den Pilzkörpern der Honigbiene. Das schwache 1 und das starke 3 Trial Training wurde 15 min nach der Injektion durchgeführt, da in vorangegangenen Studien mit Hilfe von markierten Peptiden gezeigt wurde, dass die zelluläre Aufnahme der Peptide nach dieser Zeit stattgefunden hat. In der folgenden Abbildung 25 sind die Ergebnisse für Winterbienen und Sommerbienen dargestellt. Abbildung 25 A und B zeigen deutlich, dass die Störung der PKA-R2/AKAP-Interaktion bei der Honigbiene das appetitiv konditionierte frühe Langzeitgedächtnis (eLTM) beeinflusst. Man beobachtete nach einem Tag bei der Gruppe mit dem injizierten Transfektionspeptid einen Abfall des Gedächtnisses, im Gegensatz zu dem Gedächtnis der Bienen mit dem Kontroll-Peptid. Während des Trainings lernten beide Gruppen aber gleich, was einen Einfluss des Kompetitor-Peptids auf die Konsolidierung des Gedächtnisses ausschließen lässt.

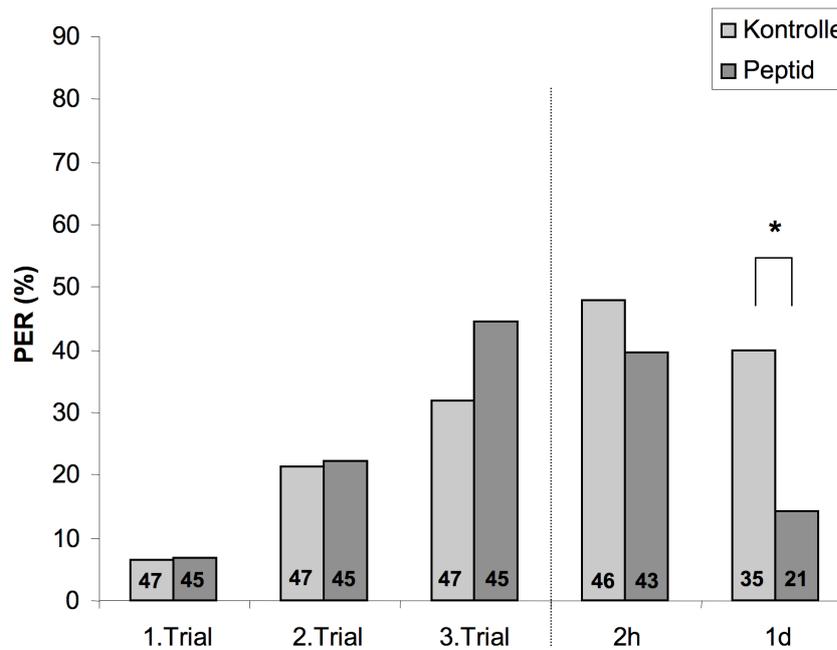
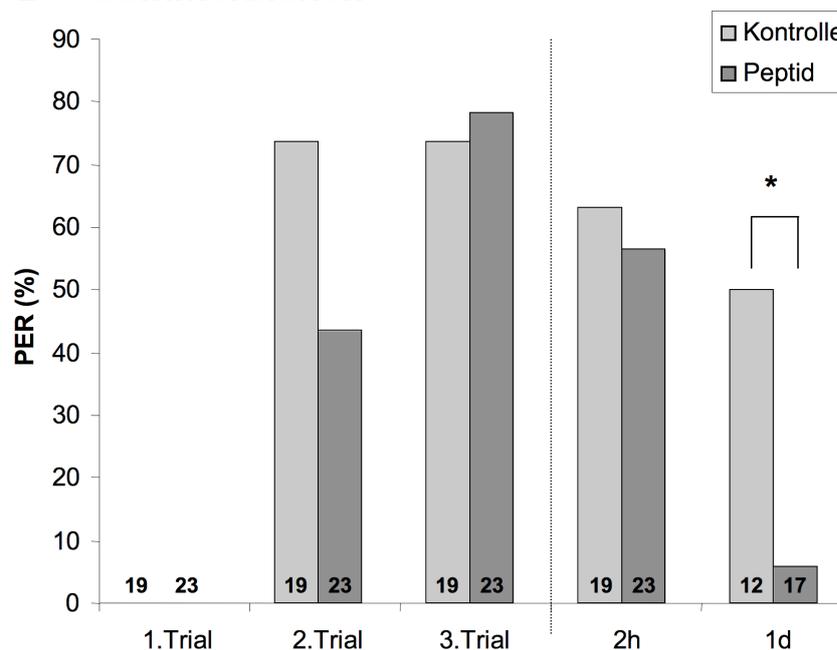
A Winterbienen**B Sommerbienen**

Abbildung 25: 3 Trial Konditionierung von Bienen mit dem Kompetitor-Peptid und von Bienen mit dem Kontroll-Peptid. Das Transfektions- oder Kontrollpeptid wurde 15 min vor dem Training in die Pilzkörper injiziert. Beide Gruppen lernten während des Trainings gleich, bei der Gruppe mit dem Kompetitor-Peptid wurde allerdings nach einem Tag ein Abfall des Gedächtnisses beobachtet. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD; * $p < 0.05$; die Anzahl der Tiere n ist in den Balken angegeben.

Bei *Drosophila* wurde gezeigt, dass die Störung der PKA-R2/AKAP Interaktion durch das Kompetitor-Peptid nur Einfluss auf das Mittelzeitgedächtnis nach einer aversiven Konditionierung hat. Auf das appetitive Gedächtnis hatte das Kompetitor-Peptid keinen Einfluss. Im Gegensatz zu *Drosophila* ist bei der Honigbiene das frühe Langzeitgedächtnis nach einer appetitiven Konditionierung betroffen.

3.13 Eine Störung des PKA/ AKAP-Komplexes führt zu einer Verbesserung des 1 Trial STM nach einem Tag

Um die schwache Konditionierung, die bei *Drosophila* mit 1 und 2 Schocks aversiv durchgeführt wurde nun mittels einem Trial bei der Honigbiene mit einem appetitiven Training durchzuführen, wurde den Honigbienen wie im vorangegangenen Versuch jeweils 1 µg Transfektionspeptid oder Kontroll-Peptid in die Pilzkörper injiziert. Nach 15 min wurden alle Bienen mit einem Trial konditioniert, so dass sie ein Gedächtnis bilden, welches nur einen Tag bestehen bleibt. Die Abbildung 26 zeigt, dass beide Gruppen bei einem Abruf nach 2 Stunden die gleiche Gedächtnisleitung besitzen, welche allerdings nicht so hoch ist wie bei einem 3 Trial Training (siehe Abbildung 25). Bei der Bildung eines 1 Trial 2 h Gedächtnisses wird folglich keine an Ankerproteine gebundene PKA benötigt. Wurde das Gedächtnis nach einem Tag abgerufen, so kann man deutlich erkennen, dass die Gruppe mit dem Transfektionspeptid ein signifikant höheres Gedächtnis gebildet hat, als die Gruppe mit dem Kontrollpeptid.

1 Trial Konditionierung

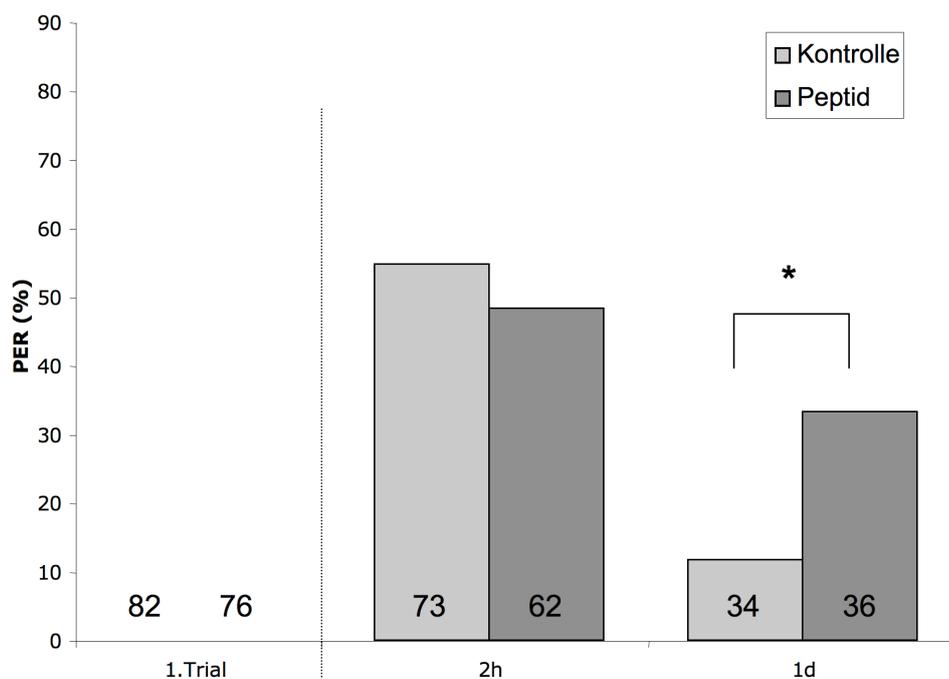


Abbildung 26: 1 Trial Konditionierung von Bienen mit Kompetitor-Peptid oder Kontroll-Peptid. AKAP-gebundene 1 μg des Transfektionspeptids wurde 15 min vor dem Training in die Pilzkörper injiziert. Bei der Gruppe mit dem Kompetitor-Peptid wurde nach einem Tag ein Anstieg des Gedächtnisses beobachtet. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD; * $p < 0.05$; die Anzahl n ist in den Balken angegeben.

4. Diskussion

Alle diese Ergebnisse zeigen, dass funktionell verschiedene Pools von PKA existieren müssen, um verschiedene definierte Funktionen während der Gedächtnisbildung zu steuern. Ich stellte in dieser Arbeit unter anderem ein funktionelles Modell auf, in welchem der cAMP Signalweg auf dem subzellulären Level mit Hilfe an AKAPs gebundene Pools von PKA eingeteilt wird.

4.1 Unterteilung des Gedächtnisses in spezifische Gedächtnisphasen mittels geankerter PKA

Mit Hilfe von Mutanten, welche verschiedene Elemente des cAMP-PKA Signalwegs beeinflussen, konnten in älteren Studien verschiedene Kälte sensitive Gedächtnisphasen (ASM) in der olfaktorischen Konditionierung bei *Drosophila* identifiziert werden. Mutanten, welche direkt den cAMP Level beeinflussen (z.B. *rutabaga* die Typ I Adenylatzyklase (Livingstone et al., 1984) oder *dunce* die cAMP spezifische Phosphodiesterase), stören die Bildung des ASM. Weiter downstream im Signalweg beeinflusst ein Allel der katalytischen Untereinheit der PKA DC0 X4 die Gedächtnisbildung bei 20 min bis 2 h nach dem Training (Li et al., 1996). Die *amnesiac* Mutante enthüllte ein kritisches Zeitfenster von 30 – 60 min kurz nach der Konditionierung (Quinn et al., 1979). Hier benötigt das olfaktorische Gedächtnis die Aktivität der dorsal gepaarten medialen (DPM) Neurone, um auf die Pilzkörperstruktur zu wirken und das ASM zu stabilisieren. Dieser Bedarf für *rutabaga*, *dunce*, DC0 X4 und *amnesiac* in einem bestimmten Zeitfenster nach der Konditionierung führt zu dieser Aufteilung des ASM im STM und MTM. Nach dieser Gliederung der Gedächtnisphasen mit Hilfe der verschiedenen Mutanten stellte man ein Schema auf. Abbildung 27 zeigt die serielle Prozessierung der Gedächtnisphasen nach Tully et al. 1994. Die Information, welche während des Lernens (LRN) erworben wird, wird in konsolidierte Gedächtnisse (ARM und LTM) prozessiert. Dabei durchlaufen sie sequentiell zwei frühere Gedächtnisphasen: STM und MTM. An diesem Punkt teilt sich der Weg laut Tully et al. parallel auf in das ARM und LTM.

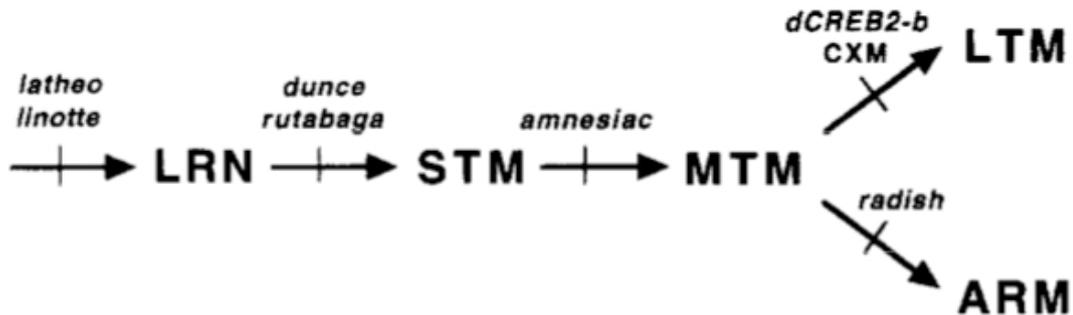


Abbildung 27: Schema der Prozessierung der verschiedenen Gedächtnisphasen von *Drosophila* nach Tully et al. 1994. Die Information, welche während des Lernens (LRN) erworben wird, wird in konsolidierte Gedächtnisse (ARM und LTM) prozessiert. Dabei durchlaufen sie sequentiell zwei frühere Gedächtnisphasen: STM und MTM (Tully et al., 1994).

Im Laufe der Jahre wurden im Bezug auf das Lernen und den cAMP Signalweg nur Untersuchungen mittels Mutanten oder pharmakologischen Mitteln durchgeführt, die den cAMP Signalweg störten. So beeinflusst z.B. *rutabaga* wie schon erwähnt die Typ I Adenylatzyklase (Livingstone et al., 1984) und damit die cAMP Bildung. Somit ist der Signalweg downstream der Adenylatzyklase gestört und folglich auch das Lernen. Durch den Einsatz eines Kompetitor-Peptids war es nun möglich, Teilbereiche des cAMP Signalwegs zu stören. Alle anderen Funktionen liefen normal ab. Diese Methode ermöglichte eine „feinere“ Beeinflussung des cAMP Signalwegs als andere Methoden. In unserem Fall war nur die Ankerung der PKA-R2 an Ankerproteine betroffen, aber nicht die PKA Aktivität selbst.

Wurde nun die PKA-R2/AKAP Interaktion mit dem Kompetitor-Peptid gestört, indem es in der Fliege überexprimiert wurde, lernten die Fliegen normal, zeigten aber zwischen 60 – 120 min (im MTM) einen starken Gedächtnisabfall. Meine Untersuchungen ergaben, dass dieses verlorene Gedächtnis das Kälte sensitive Gedächtnis (ASM) darstellt. Das Kälte resistente Gedächtnis (ARM) bleibt bestehen. Die durchgeführte Analyse machte nun deutlich, dass man das MTM noch weiter einteilen kann. Nämlich in eine frühe und eine späte Phase. Die frühe Phase des MTM benötigt den PKA Signalweg, wie das DC0 X4 Allel zeigt (Li et al., 1996). Außerdem ist diese frühe Phase unabhängig von der PKA-R2/AKAP-Bindung ist. Die spätere Phase des MTM allerdings benötigt an Ankerproteine gebundene PKA-R2

und unterstützt die Gedächtnisbildung ab 60 min nach der Konditionierung. Da die Bildung dieses späten MTM im Gegensatz zum frühen MTM komplett unterbunden wurde, kann angenommen werden, dass keine Redundanz auf dem molekularen Level existiert, um diese bestimmte späte Phase zu stützen. Vielmehr muss das frühe und späte MTM von verschiedenen PKA Pools unterstützt werden, die abgrenzbare Funktionen während der Zeit der Gedächtnisbildung besitzen. Die funktionelle Unterteilung der PKA in AKAP-gebundene und nicht gebundene Pools, welche hier angedeutet wurde, wird vom eCOPR2 Peptid hergeleitet. Dieses Kompetitor-Peptid stellt die AKAP-Bindestelle der endogenen *Drosophila* PKA-R2 dar. Basierend auf dem konservierten Mechanismus muss angenommen werden, dass eCOPR2 die Bindung der PKA-R2 an alle potentielle AKAPs verhindert.

Bisher gibt es nur eine Studie mit einem Kompetitor-Peptid bei Säugetieren, die die gleiche Verminderung des Gedächtnisses einige Stunden nach dem Training zeigten, wenn das so genannte Ht31 Peptid injiziert wurde. Das Ht31 Peptid ist ein spezifischer Kompetitor der PKA-R2/AKAP Interaktion (Moita et al., 2002; Wang et al., 2006). Zur Rolle der AKAPs oder zur näheren Charakterisierung wurde hierbei nichts gesagt. In *Drosophila* konnten wir die Effekte der AKAP-gebundenen PKA-R2 in der aversiven ASM Stabilisierung in den Pilzkörpern lokalisieren. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Pilzkörper notwendig für das assoziative olfaktorische Lernen sind (Heisenberg et al., 1985; Davis, 1993; deBelle & Heisenberg, 1994). Wir spekulieren nun, dass die Bildung des aversiven ASM vom STM in das frühe und späte MTM in den 700 Neuronen der Pilzkörper stattfindet. In anderen Studien wurde in Säugerzellen gezeigt, dass Ankerproteine an spezifischen subzellulären Orten der Signalintegration einschließlich synaptischen Vesikeln, ionotropischen und metabotropischen Rezeptoren, dem Cytoskelett oder an zellulären Organellen lokalisiert sind (Wong and Scott, 2004). Abhängig von dieser Lokalisation können die Ankerproteine den PKA Signalweg organisieren, indem sie spezifische Substrate am AKAP Komplex auswählen. Diese Ergebnisse können nun helfen, Substrate zu identifizieren, die bei der aversiven MTM Bildung von *Drosophila* beteiligt sind.

4.2 Die Gedächtnisphasen werden bei *Drosophila* wie bei *Aplysia* und der Honigbiene parallel prozessiert

Vorangegangene Untersuchungen zeigen, dass die steigende Anzahl der Schocks während dem Training einen Einfluss auf die Gedächtnisbildung hat. Ein einzelner assoziativer Lern-Trial (das kurze Protokoll), bestehend aus einem präsentierten Duft und 12 Elektroschocks, induziert drei zeitlich verschiedene Phasen des olfaktorischen Gedächtnisses: Das Kurzzeitgedächtnis STM und das Mittelzeitgedächtnis MTM, welche labil und abhängig sind vom cAMP Signalweg, und das Kälte resistente Gedächtnis ARM (Isabel et al., 2004; Davis, 1993). Diese drei Gedächtnisphasen werden auch nach einem intensiven Training beobachtet, bei welchem die Stimuli wiederholt präsentiert werden, ohne zwischen den Trials zu pausieren (massed Protokoll). Eine andere Gedächtnisphase, das Proteinsynthese-abhängige Langzeitgedächtnis (LTM) erscheint nach einem mehrfachen „spaced“ Training (langes Protokoll), bei welchem zwischen den einzelnen Trials jeweils 15 min pausiert wird (Tully et al., 1994). Jahrelang war man der Überzeugung, dass das kurze Protokoll und das massed Protokoll einen sequenziellen Signalweg induzieren, welcher mit dem Lernen beginnt, gefolgt von STM und MTM und bei einem ARM endet (siehe Abbildung 27). Das lange Protokoll hingegen generiert eine zusätzliche Phase: das LTM. Es wurde vermutet, dass ARM und LTM aus dem MTM hervorgehen und koexistieren (DeZazzo et al., 1995; Tully et al., 1994). Da *amnesiac* Mutanten ein nahezu normales ARM, aber ein defektes MTM zeigen, ist die These, dass ARM aus dem MTM hervorgeht fraglich (Tully et al., 1990; Folkers et al., 1993). Bei der Meeresschnecke *Aplysia* können im Falle der parallelen Prozessierung die verschiedenen Phasen der Faszilitation unabhängig voneinander aktiviert werden. Blockt man die Induktion einer zeitlichen Phase (z.B. der kurzzeitigen Faszilitierung, short-term-fascilitation: STF), so beeinflusst dies nicht die anderen Gedächtnisphasen wie z.B. die intermediäre Phase der synaptischen Faszilitierung (ITF) oder die langzeitige Faszilitierung (LTF) (Sherff & Carew, 2004; Emptage et al., 1993). Auch bei der Honigbiene verläuft die Induktion parallel und unabhängig während der wenigen Minuten der Konditionierung (Müller, U., 2002; Schwärzel, M. & Müller, U., 2006).

Während das Kurzzeitgedächtnis (STM) und das Mittelzeitgedächtnis (MTM) keine Proteinsynthese benötigen, ist das Langzeitgedächtnis (LTM) von der Proteinsynthese abhängig. Die in Abbildung 28 dargestellten Ergebnisse bei der Honigbiene zeigen, dass MTM und LTM parallel und unabhängig voneinander während der Trainingsperiode induziert werden. Das Mittelzeitgedächtnis (MTM) benötigt die Proteinkinase M (PKM), welche in einem schmalen Zeitfenster nach dem Training produziert wird, indem die Proteinkinase C (PKC) von Calpain gespalten wird. Das MTM wird unabhängig davon gebildet und parallel zum Langzeitgedächtnis (LTM). Das LTM kann in eine frühe Translations abhängige Phase (eLTM) und eine späte Phase (ILTM), welche transkriptionsabhängig ist, eingeteilt werden (Grünbaum et al., 1998; Menzel, 1999; Wüstenberg et al., 1998). Die Tatsache, dass ILTM in Abwesenheit des eLTM induziert werden kann, deutet auf die Existenz zweier paralleler Prozesse während der Konditionierung hin.

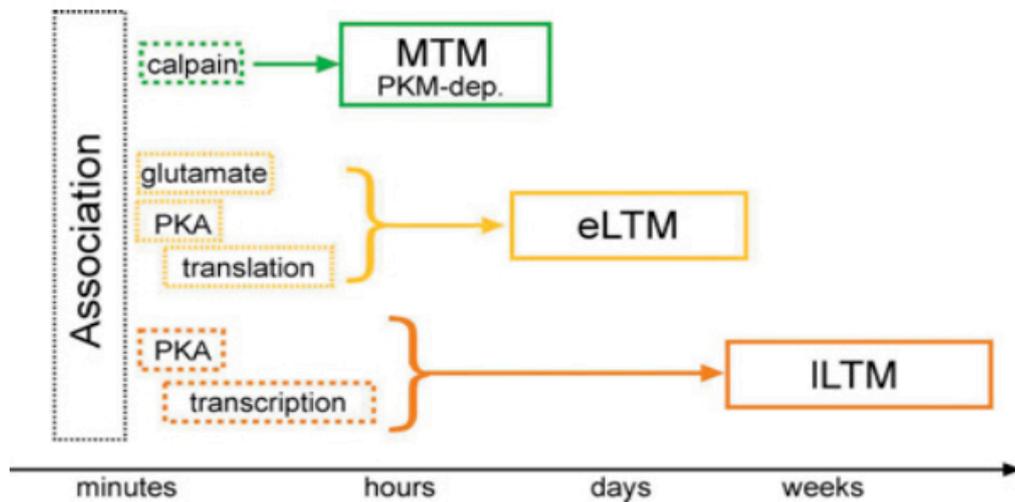


Abbildung 28: Parallele Gedächtnisphasen der Honigbiene. Das Schema zeigt die pharmakologisch unterscheidbaren Gedächtnisphasen der Honigbiene. Das Mittelzeitgedächtnis (MTM) benötigt Proteinkinase M (PKM), welche in einem schmalen Zeitfenster nach dem Training produziert wird, indem die Proteinkinase C (PKC) von Calpain gespalten wird. Das MTM wird unabhängig davon gebildet und parallel zum Langzeitgedächtnis (LTM). Das LTM kann in eine frühe translationsabhängige Phase (eLTM) und eine späte Phase (ILTM), welche transkriptionsabhängig ist, eingeteilt werden.

Die Ergebnisse meiner Verhaltensexperimente mit *Drosophila* stellen die alte These der seriellen Prozessierung von Tully et al. von 1994 in Frage. Bei der Biene wurde schon vor einiger Zeit gezeigt, dass nach einem Trainingsdurchgang (1 Trial) ein Kurzzeitgedächtnis (STM) ausgebildet wird, welches nach einem Tag wieder abklingt (Hammer & Menzel, 1995). Eine mehrfache Konditionierung (3 Trials) führt dagegen zur Bildung eines stabilen, lang anhaltenden (mehr als 4 Tage), transkriptions- und translationsabhängigen Langzeitgedächtnisses (Wüstenberg et al., 1998; Grünbaum & Müller, 1998). Da bei Tully et al. und in vielen anderen Studien bisher immer nur das klassische Konditionierungsprotokoll durchgeführt wurde, veränderte ich in meinem Verhaltensversuch die klassische Trainingsdurchführung: Statt der klassischen 12 Elektroschocks wurden den Fliegen während dem Training zusätzlich 1 und 2 Schocks verabreicht, um ein schwaches Training durchzuführen. Nun konnte man beobachten, dass das Lernereignis im STM für 1, 2 und 12 Schock ein anderes ist als im MTM.

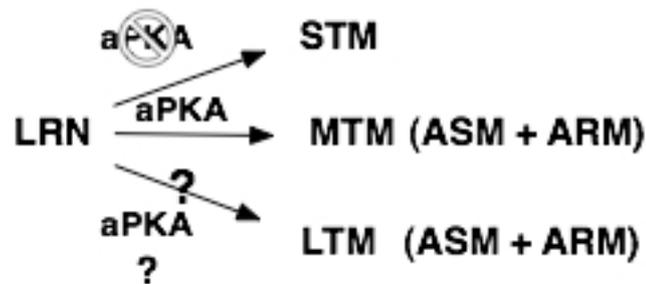


Abbildung 29: Darstellung der parallelen Prozessierung der Gedächtnisphasen bei *Drosophila*. Bei einer parallelen Prozessierung ist die jeweilige Gedächtnisphase abhängig von der Konditionierung. Das MTM ist im Gegensatz zum STM abhängig von geankerter PKA-R2 (aPKA) und besteht aus ASM und ARM. Ob das LTM auch geankerte PKA benötigt und parallel prozessiert wird ist noch unbekannt.

Wurden Canton-S Fliegen 1, 2 oder 12 Elektroschocks während der aversiven Konditionierung verabreicht und diese auf ein 3 min Gedächtnis getestet, so blieb das Gedächtnis bei 1 und 2 Schocks gleich, stieg aber weiter an, je mehr Schocks verabreicht wurden. Aufgrund dieser Beobachtung könnte man vermuten, dass jeder weitere verabreichte Elektroschock nach dem zweiten Schock einen höheren Lernwert induziert.

Um diese Frage zu beantworten, sind weitere Verhaltensexperimente nötig, bei denen die Lernwerte der zusätzlichen Stimuli zwischen dem zweiten und zwölften Elektroschock noch ermittelt werden müssen. Wurden nun Canton-S Fliegen mit 1, 2 und 12 Schocks trainiert und auf ein 3 h Gedächtnis getestet, dann konnte ich einen signifikanten Unterschied zwischen den Gedächtnissen beobachten, welche mit einem und zwei Schocks konditioniert wurden. Zwischen dem 2 und 12 Schock Gedächtnis war kein Unterschied mehr zu erkennen. Dieser Unterschied zu den Lernwerten im STM lässt darauf schließen, dass das Gedächtnis parallel und nicht seriell prozessiert wird. Das erworbene Gedächtnis ist folglich abhängig von der Konditionierung. Das Schema in Abbildung 29 soll meine Theorie noch weiter verdeutlichen. Das STM benötigt keine geankerte PKA. Das MTM besteht aus dem ASM und dem ARM, wird parallel prozessiert und sein ASM ist abhängig von geankerter PKA. Ob diese notwendig ist für die Prozessierung des LTM ist fraglich, da ich die Fliegen nicht auf ein LTM getestet habe. Folglich bleibt die Frage offen, ob das LTM auch parallel prozessiert wird.

Wie diese Ergebnisse zeigen, findet ab dem zweiten Schock während der Prozessierung der Gedächtnisse eine Veränderung statt. Das Kälte sensitive Gedächtnis, welches ab dem zweiten Schock gebildet wird, lässt sich neben der Beeinflussung durch das eCOPR2-Peptid auch mit einer Kältebehandlung löschen. Das durch einen Schock gebildete Gedächtnis ist allerdings durch keine Behandlung zu beeinflussen. Auch durch eine Kältebehandlung ist es nicht löschar. Man kann nun davon ausgehen, dass das 1 Schock Gedächtnis entweder nur aus ARM besteht, oder etwas ganz anderes darstellt.

Um diese These noch weiter zu erhärten, könnte man das 3 h Mittelzeitgedächtnis von *radish* Mutanten nach einer Konditionierung mit einem Elektroschock testen. Die *radish* Mutante besitzt kein ARM und repräsentiert den einzigen molekularen Weg, diese Gedächtniskomponente zu verstehen (Folkers et al., 1993; Folkers et al., 2006). Die *radish* Mutante wurde zwar von mir getestet, zeigte aber einen so schlechten Lernindex, dass man sie nicht für das besagte Experiment verwenden konnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Gedächtnisphasen bei *Drosophila* genau wie bei *Aplysia* und der Honigbiene parallel prozessiert werden. Mit der veränderten Trainingsprozedur ist es nun auch bei *Drosophila* möglich, mittels eines schwachen Trainings ein Gedächtnis zu erzeugen, was nicht so lange anhält.

4.3 Aversive und appetitive Gedächtnisse werden über verschiedene molekulare Mechanismen gebildet

Die Untersuchung der Zuckerbelohnung oder der Bestrafung mit elektrischen Schocks während des Trainings gibt Aufschluss über die Bildung der appetitiven und aversiven Gedächtnisse. Beide zeigen zahlreiche Ähnlichkeiten, wenn man die molekularen Netzwerke betrachtet, welche in das aversive und appetitive Gedächtnis involviert sind: Beide Gedächtnisarten werden im gleichen Bereich der 700 Pilzkörperneuronen mittels eines *rutabaga*-abhängigen Mechanismus im cAMP-abhängigen Signalweg erworben (Schwärzel et al., 2003). Zudem wird die Sekretion von den DPM - Neuronen zu den Pilzkörpern in den ersten 30 min nach dem Training benötigt. Diese unterstützt jeweils die Stabilisierung des aversiven und appetitiven ASM (Yu et al., 2005; Riemensperger et al., 2005; Keene et al., 2006). In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Neurotransmitter Dopamin und Octopamin die Bildung des Gedächtnisses verschieden beeinflussen, der Abruf oder die Konsolidierung von aversiven und appetitiven Gedächtnissen bleibt unbeeinflusst. Schaltet man die dopaminergen Neurone mit Hilfe des *Shi^{ts}* Transgens während der Trainingsphase aus, wird die Bildung des aversiven Gedächtnisses nahezu komplett verhindert. Das appetitive Gedächtnis bleibt unbeeinflusst. *shibire* (Kitamoto, 2001) codiert für das *Drosophila*-Dynamin, welches für die Endocytose von Vesikeln notwendig ist. Diese wird auch normal initiiert, aber die Abtrennung der eingeschnürten Vesikel findet nicht statt. Mutanten ohne den Neurotransmitter Octopamin (Monastirioti et al., 1996) können hingegen keine Assoziation nach einer Zucker Belohnung bilden, sind aber unbeeinflusst in der Bildung des aversiven Gedächtnisses (Schwärzel et al., 2003). Bisher wurde also gezeigt, dass die Bildung von aversiven und appetitiven Gedächtnissen von verschiedenen Neurotransmittern abhängig ist. Der cAMP Signalweg ist aber laut vorheriger Studien bei beiden Gedächtnissen gleich. Ich zeigte nun in dieser Arbeit, dass es downstream des

Schlüsselenzym PKA doch ein Unterscheidungskriterium gibt. Die Ergebnisse machen deutlich, dass an Ankerproteine gebundene PKA-R2 aversive und appetitive Gedächtnisse unterschiedlich induziert, da die Expression unseres Kompetitor-Peptids das appetitive ASM nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass verschiedene cAMP-abhängige Mechanismen das aversive und appetitive ASM unterstützen. Da ich davon ausgehe, dass das Kompetitor-Peptid eCOPR2 die Interaktionen zwischen PKA-R2 und den dazugehörigen AKAPs spezifisch blockiert, müssen zusätzliche ungebundene Pools von PKA die Bildung des appetitiven ASM unterstützen. Mit zusätzlichen Experimenten können nun lösliche PKA Pools oder alternative Ankermechanismen an Ankerproteine mittels der regulatorischen Untereinheit Typ I der PKA untersucht werden (Banky et al., 1998). Die Entdeckung, dass der cAMP-Signalweg mit verschiedenen downstream-Partnern gekoppelt ist, ist ein Thema, welches häufig im Tierreich beobachtet wird (Müller & Carew, 1998; Sherff & Carew, 2004; Reisner et al., 2006). In Neuronen von *Aplysia* ist das zeitliche Muster der Rezeptor Aktivierung ausreichend, um verschiedene zelluläre Antworten mittels Schwellenabhängigen „Sortierungsmechanismen“ zu triggern. Ähnliche Mechanismen können auch in der olfaktorischen Konditionierung von *Drosophila* vorkommen, wenn entweder Catecholamin-Rezeptoren und/oder DPM-Aktivität das Potential besitzen, verschiedene Schwellenabhängige Mechanismen der subzellulären Signaltrennung in den Pilzkörpern zu triggern (Abbildung 30). Diese sind in der Abbildung mit Hilfe der grauen Box dargestellt.

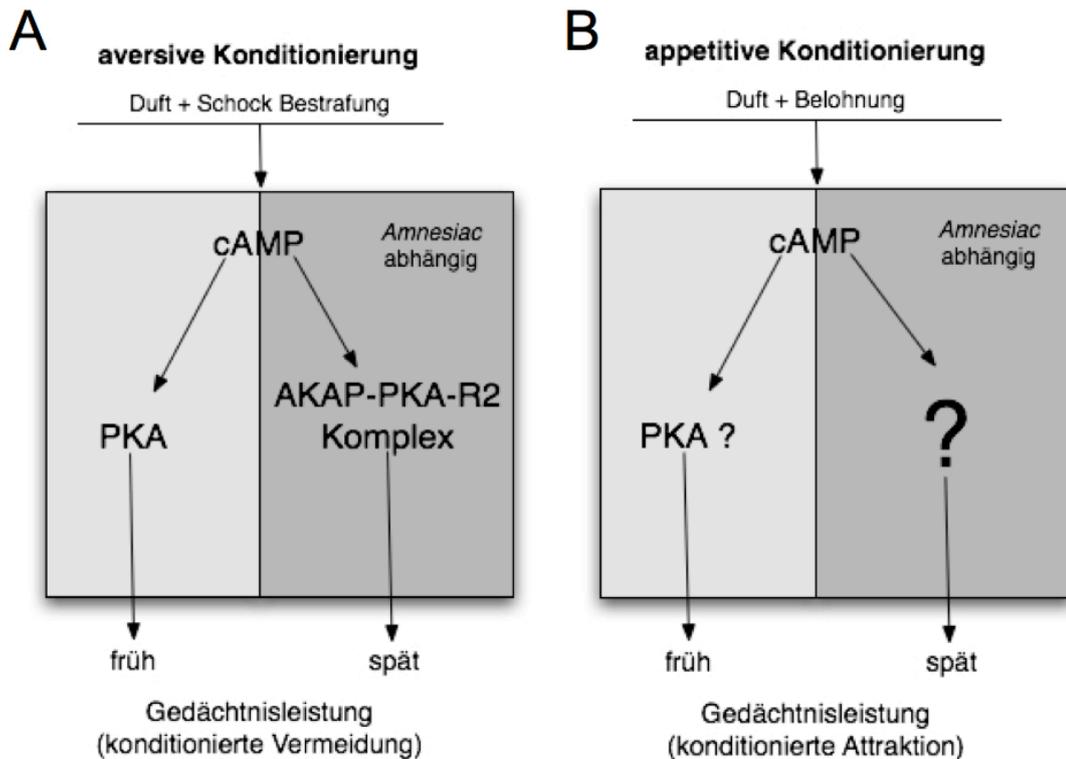


Abbildung 30: Modell der Unterschiede im cAMP-Signalweg bei der Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses in *Drosophila*. Aversive und appetitive olfaktorische Gedächtnisse werden in den Pilzkörpern gebildet (graue Box). (A) Bei dem aversiven Gedächtnis werden AKAP-gebundene PKA-R2 Signale exklusiv benötigt, um spätere Phasen der Gedächtnisleitung aufrecht zu erhalten. Ein anderer PKA Pool ist notwendig für die Gedächtnisleistung in früheren Abschnitten. (B) Das appetitive Gedächtnis ist unabhängig von dem an AKAPs gebundenen Pool der PKA-R2 und benötigt einen bis jetzt unbekanntem molekularen Mechanismus (Schwärzel et al., 2007).

Da das Lernen und die Gedächtnisbildung wie erwähnt in vielen Systemen gleich sind d.h. vom cAMP Signalweg und verschiedenen downstream-Partnern abhängig sind stellt sich nun die Frage, ob die PKA-Ankerung bei anderen Organismen während der Gedächtnisbildung oder Stabilisierung auch eine so wichtige Rolle spielt wie bei der aversiven Konditionierung in *Drosophila*.

4.4 Ankerproteine als organisierende Elemente während der olfaktorischen Konditionierung der Honigbiene

Bei der Identifikation neuer molekularer Signalkaskaden wurden bei allen Systemen in vorangegangenen Studien in einem Screeningverfahren Signalkaskaden identifiziert, welche für die Bildung des Langzeitgedächtnisses (LTM) notwendig sind. Dies wurde bisher mit verhaltens- und pharmakologischen Experimenten durchgeführt. Es stellte sich in den letzten Jahren heraus, dass die notwendigen Prozesse innerhalb weniger Sekunden bis zu vielen Stunden nach dem Lernen ablaufen. So wurde am Beispiel der cAMP-abhängigen PKA gezeigt, dass deren Aktivität nach dem Training notwendig für die Bildung des LTM ist. Blockt man die PKA-Aktivität während der assoziativen Konditionierung, verliert man das LTM ohne das Lernen und die Gedächtnisse im Stundenbereich zu beeinflussen (Müller, 2000; Müller, 2002). Wurde die PKA-R2/AKAP Interaktion bei der appetitiven Konditionierung mit 3 Trials gestört, so zeigte das Gedächtnis der Bienen einen Abfall des frühen Langzeitgedächtnisses (eLTM) nach einem Tag. Auch wenn die Lernindizes der beiden Gruppen beim zweiten Trial auf den ersten Blick unterschiedlich aussahen, so war aber statistisch kein signifikanter Unterschied festzustellen. Da die Bienen aufgrund schlechter Wetterverhältnisse nach einem Tag starben, konnte ich die Stabilität des Gedächtnisses über mehrere Tage nicht untersuchen. Des weiteren kann man nun das Zeitfenster der Peptidwirkung weiter untersuchen. In dieser Arbeit injizierte ich das Transfektionspeptid 15 min vor dem Training. Es wäre nun interessant zu untersuchen, wie das Peptid z.B. 15 min nach dem Training, vor dem Abruf oder während der Gedächtnisbildung wirkt.

Da der molekulare Mechanismus der in der Natur vorkommenden appetitiven Konditionierung bei der Honigbiene ein anderer sein muss als bei *Drosophila*, wäre es interessant zu untersuchen, ob geankerte PKA-R2 auch bei der aversiven Konditionierung der Honigbiene benötigt wird. Hierbei wird die Duftpräsentation mit Elektroschocks gepaart und auf einen Stachelreflex konditioniert (Vergoz et al., 2007).

Die Analyse der Gedächtnisphasen verschiedener Organismen ergab, dass verschiedene molekulare Prozesse zur Ausprägung paralleler und sequentieller Gedächtnisphasen beitragen (Squire, 1987; DeZazzo & Tully, 1996). Auch bei der Honigbiene ist die Zahl der Konditionierungs-Trials ausschlaggebend für die Art des Gedächtnisses, welches gebildet wird. Diese induzierten Gedächtnisse zeigen verschiedene Eigenschaften. So führen mehrere Konditionierungs-Trials (3 Trials mit einem Inter-Trial-Intervall von 2 min) zur Bildung eines Langzeitgedächtnisses, welches über Tage und Wochen stabil bleibt. Ein Trial hingegen führt zur Bildung eines Gedächtnisses, welches innerhalb von Tagen zerfällt (Müller, 2002). Auf der molekularen Ebene lässt sich die Bildung eines Langzeitgedächtnisses wie folgt beschreiben: Die aktivierten katalytischen Untereinheiten der PKA gelangen durch Diffusion zum Kern und phosphorylieren die CREB-1 Proteine. Diese binden dann an die DNA und schalten die Gene an, die für das Langzeitgedächtnis notwendig sind (Davis & Squire, 1984; Bailey & Kandel, 1993; Bailey et al., 1996; Silva et al., 1998). Doch das Langzeitgedächtnis lässt sich nicht nur an, sondern auch abschalten bzw. hemmen.

Der bedeutendste hemmende Faktor ist ein inhibitorischer Transkriptionsregulator (Repressor), der als CREB-2 bezeichnet wird (Abel et al., 1998; Chen et al., 2003). CREB-2 scheint CREB-1 zu hemmen und somit die Langzeitverstärkung zu blockieren, indem er sowohl an die CRE-Sequenz der DNA als auch an das CREB-1 Protein bindet (Adya et al, 1995; Bantignies, 1996). Die Regulierung von CREB-2 geschieht anders als bei CREB-1. CREB-2 wird nicht direkt von der PKA angeschaltet, sondern wie es scheint von einer anderen Proteinkinase mit dem Namen MAP (mitogen-aktivierte Proteinkinase) gesteuert. Um z.B. die Langzeitverstärkung bei *Aplysia* zu aktivieren, muss nicht nur CREB-1 aktiviert, sondern auch der repressive Einfluss von CREB-2 ausgeschaltet werden (Abel & Kandel, 1998). Seit bekannt ist, dass *Drosophila* auch ein Proteinsynthese abhängiges Langzeitgedächtnis bilden kann, indem man wiederholt trainiert, wurde auch hier mit CREB experimentiert. Man klonierte beide Formen der CREB und stellte transgene Fliegen her. Eine Überexpression des CREB-Repressors führte zu einer Blockierung des Langzeitgedächtnisses. Eine Überexpression der Aktivatorform der CREB bewirkte hingegen eine Reduktion der Trainingsdurchgänge die nötig waren, um ein Langzeitgedächtnis zu erzeugen (Yin et al., 1994; Yin et al.,

1995). So reichte ein einziger Trainingsdurchgang aus, um ein Langzeitgedächtnis zu erzeugen, welches tagelang anhielt. Nimmt man die Daten von *Aplysia* und *Drosophila* zusammen, dann liefern sie den molekularen Nachweis, dass es neben einer Aktivierung zum Anschalten des Langzeitgedächtnisses auch einen Repressor gibt, der die Speicherung der Informationen im Langzeitgedächtnis verhindert. Aufgrund meiner 3 Trial Ergebnisse mit dem Gedächtnisverlust nach einem Tag bei der Honigbiene untersuchte ich den Effekt des Kompetitor-Peptids während einer 1 Trial Konditionierung. Im Gegensatz zum Effekt nach einer 3 Trial Konditionierung nimmt die Gedächtnisleistung der Bienen mit dem Kompetitor-Peptid nach einem Tag bis auf das Dreifache Gedächtnis der Kontrollgruppe zu. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass während der Konditionierung verschiedene PKA-R2/AKAP Prozesse ablaufen. Induziert man mit 3 Trials ein Langzeitgedächtnis und unterbricht die PKA-R2/AKAP Interaktion, so findet die Proteinsynthese im Kern mittels CREB-1 nicht statt. Induziert man hingegen mit einem Trial ein Kurzzeitgedächtnis und blockt wieder die PKA-R2/AKAP Interaktion, scheint die MAPK kontrollierte CREB-2 nicht mehr als Repressor zu funktionieren und aktiviert die Proteinsynthese zur Induktion eines Langzeitgedächtnisses.

Aus diesem Grund war vermutlich die Gedächtnisleistung der Tiere mit dem Kompetitor-Peptid höher als die der Kontrolltiere. Es wäre nun interessant zu untersuchen, ob dies z.B. bei *Aplysia* auch zu beobachten ist, da ich vermute, dass dieser molekulare Mechanismus in vielen anderen Lebewesen konserviert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass es dennoch viele Unterschiede im Lernen und der Gedächtnisbildung bei *Drosophila* und der Honigbiene gibt. Der erste Unterschied zwischen den beiden Organismen ist, dass bei *Drosophila* während der appetitiven Konditionierung keine an Ankerproteine gebundene PKA-R2 benötigt wird, im Gegensatz zu der appetitiven Konditionierung der Honigbiene. Weitere Unterschiede erkennt man bei der Prozessierung des Kurzzeitgedächtnisses. Während bei *Drosophila* die Störung der PKA-R2/AKAP Interaktion keinen Einfluss auf das Kurzzeitgedächtnis hat, steigt bei der Honigbiene das Kurzzeitgedächtnis an. Auch das Zeitfenster der beiden Organismen unterscheidet sich, da bei *Drosophila* das Mittelzeit- und bei der Honigbiene das frühe Langzeitgedächtnis beeinträchtigt wurde. Diese Unterschiede machen deutlich,

dass es nicht einfach ist, die molekularen Lernmechanismen bei den verschiedenen Organismen zu verstehen. Des weiteren gaben die Ergebnisse Aufschluss darüber, dass der molekulare Signalweg abhängig ist von der Trainingsart. Weiter downstream der PKA sind die AKAPs die Organisatoren, die den weiteren molekularen Weg steuern. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Theorie auf höhere Organismen wie z.B. die Maus übertragen werden kann. Unterscheidet sich der Signalweg mit den AKAPs von der Honigbiene und *Drosophila*?

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die AKAPs als Organisatoren im PKA Signalweg beim assoziativen Lernen in den Modellorganismen *Drosophila* und der Honigbiene zu untersuchen. Als erstes wurde gezeigt, dass bei *Drosophila* geankerte PKA für die Stabilisierung des aversiven MTM notwendig ist. Wurde die PKA-R2/AKAP Interaktion unterbrochen, so konnte man ab 60 min einen starken Abfall des MTM beobachten, der dem Kälte sensitiven Anteil (ASM) des Gedächtnisses entspricht. Damit kann das ASM erstmals in zwei unterscheidbare Phasen eingeteilt werden: Eine frühe von Ankerproteinen unabhängige Phase und eine späte Phase die an AKAPs geankerte PKA-R2 in den Pilzkörpern benötigt. Mit veränderten Trainingsparametern konnte ich zeigen, dass die verschiedenen Gedächtnisphasen bei *Drosophila* nicht wie bisher angenommen nur seriell, sondern parallel prozessiert werden. Des weiteren zeigten die Untersuchungen an *Drosophila*, dass das ASM nach einer appetitiven Konditionierung diesen an Ankerproteine gebundenen Pool von PKA nicht benötigt. Beim appetitiven Lernen in der Biene ergab sich ein anderes Bild: Die Störung der PKA-R2/AKAP-Interaktion bei der Konditionierung mit 3 Trials führt zu einen starken Abfall des frühen Langzeitgedächtnisses (eLTM) nach einem Tag. Im Gegensatz dazu führt die Störung der PKA-R2/AKAP-Interaktion während der 1 Trial Konditionierung zu einer deutlichen Gedächtnisverbesserung nach einem Tag. Diese Untersuchungen zeigen erstmals, dass abhängig von verschiedenen Trainingsparametern PKA-R2/AKAP Interaktionen an unterschiedlichen, jedoch sehr spezifischen Funktionen der Gedächtnisbildung beteiligt sind.

6. Summary (Zusammenfassung in englischer Sprache)

In my thesis I addressed the function of protein kinase A anchor proteins (AKAPs) as organizers of PKA signaling in *Drosophila* and honeybee associative olfactory memory processing. First, I showed that in *Drosophila* anchored PKA is essential for the stabilization of aversive mid-term-memory. After disrupting PKA-R2/AKAP interaction mid-term-memory as measured 60 min after training is reduced by the fraction of the amnesia sensitive memory (ASM). Since memory measured at 3 min is intact, the ASM induced by aversive conditioning can now be separated into two distinct phases: an early phase that is independent of AKAP and a late phase that requires AKAP-bound PKA-R2 within the mushroom bodies.

By modifying the training procedure I showed, that the memory phases in *Drosophila* are processed in parallel pathways and not solely serially as proposed until now. Furthermore I demonstrated that formation of appetitive memory in *Drosophila* does not require the function of AKAP-bound PKA while appetitive learning in honeybees does. Disrupting PKA-R2/AKAP interaction during appetitive conditioning with 3 trials causes a decline of the early LTM (eLTM) after one day, while conditioning with only one trial leads to an improvement of the memory tested after one day. These studies provide first evidence that the PKA-R2/AKAP interaction is required for different but very specific functions of memory formation that strongly depend on the training parameters.

7. Literaturverzeichnis

- Abel, T., Martin, K.C., Bartsch, D., Kandel, E.R.: Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science*. **279(5349)**: 338-41 (1998).
- Abel, T., Kandel, E.: Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Rev*. **26(2-3)**: 360-78 (1998).
- Adya, N., and Giam, C.Z.: Distinct regions in human T-cell lymphotropic virus type I Tax mediate interactions with activator protein CREB and basal transcription factors. *J. Virol*. **69**: 1834–1841 (1995).
- Ashe, K.H.: Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learn Mem*. **8(6)**:301-8 (2001).
- Bacskai, B.J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S.R., Kaang, B.K., Kandel, E.R., Tsien, R.Y.: Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science*. **260(5105)**: 222-6 (1993).
- Bailey, C.H., Bartsch, D., Kandel, E.R.: Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93(24)**: 13445-52 (1996).
- Bailey, C.H., Kandel, E.R.: Structural changes accompanying memory storage. *Annual Review of Physiology* **55**: 397-426 (1993).
- Banky, P., Huang, L.J. & Taylor, S.S.: Dimerization/docking domain of the type I alpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. Requirements for dimerization and docking are distinct but overlapping. *J Biol Chem* **273(52)**: 35048-55 (1998).

- Bantignies, F., Rousset, R., Desbois, C., and Jalinot, P.: Genetic characterization of transactivation of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter: binding of Tax to Tax-responsive element 1 is mediated by the cyclic AMP-responsive members of the CREB/ATF family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2174–2182 (1996).
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., Yednock, T.: Peripherally administered antibodies against amyloid beta -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* **6**: 916-919 (2000)
- Beck, J.A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J.T., Festing, M.F. and Fisher, E.M.: Genealogies of mouse inbred strains. *Nat. Genet.* **24**: 23-25 (2000).
- Benfenati, F.: Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed.* 78 Suppl **1**: 58-66 (2007)
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., and Silva, A.J.: Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* **79**: 59–68 (1994).
- Brand, A.H., Perrimon, N.: Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415 (1993).
- Chen, A., Muzzio, I.A., Malleret, G., Bartsch, D., Verbitsky, M., Pavlidis, P., Yonan, A.L., Vronskaya, S., Grody, M.B., Cepeda, I., Gilliam, T.C., Kandel, E.R.: Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron.* **39(4)**: 655-69 (2003).

- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y.: Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**: 665-676 (2001).
- Colledge, M., Dean, R.A., Scott, G.K., Langeberg, L.K., Huganir, R.L. & Scott, J.D.: Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron* **27(1)**: 107-19 (2000).
- Colledge, M. & Scott, J.D.: AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol* **9(6)**: 216-21 (1999).
- Dash, P.K., Hochner, B., and Kandel, E.R.: Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* **345**: 718-721 (1990).
- Davis, R.L.: Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron* **11**: 1-14 (1993).
- Davis, H.P., Squire, L.R.: Protein synthesis and memory: A review. *Psychological Bulletin* **96**: 518-559 (1984).
- deBelle, J.S. & Heisenberg, M.: Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* **263**: 692-695 (1994).
- DeZazzo, J., and Tully, T.: Dissection of memory formation: from behaviorai pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci.* **18**: 212-218 (1995)
- Dodge, K. & Scott, J.D.: AKAP79 and the evolution of the AKAP model. *FEBS Lett* **476(1-2)**: 58-61 (2000).

- Dovey, H.F., John, V., Anderson, J.P., Chen, L.Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L.Y., Freedman, S.B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E.J.: Functional gamma -secretase inhibitors reduce beta -amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* **76**: 173-181 (2001).
- Emptage, N.J., Carew, T.J.: Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in Aplysia neurons. *Science*, **262 (5131)**: 253-256 (1993).
- Folkers, E., Drain, P., Quinn, W.G.: Radish, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(17)**: 8123-7 (1993).
- Folkers, E., Waddell, S., Quinn, W.G.: The *Drosophila* radish gene encodes a protein required for anesthesia-resistant memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103(46)**: 17496-500 (2006).
- Goodwin, S.F., Del Vecchio, M., Velinzon, K., Hogel, C., Russell, S.R.H., Tully, T., Kaiser, K.: Defective Learning in Mutants of the *Drosophila* Gene for a Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase. *J. Neurosci.* **17(22)**: 8817-8827 (1997).
- Grünbaum, L. and Müller, U.: Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J. Neurosci.* **18**: 4384–4392 (1998).
- Hausken, Z.E., Coghlan, V.M., Hastings, C., Reimann, E.M. & Scott, J.D.: Type II regulatory subunit (RII) of the cAMP-dependent protein kinase interaction with A-kinase anchor proteins requires isoleucines 3 and 5. *Journal of Biological Chemistry* **269(39)**: 24245-24251 (1994).
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S. and Byers, D.: *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J. Neurogenet.* **2**: 1–30 (1985).
- Heldmaier, Neuweiler: Vergleichende Tierphysiologie. *Springer* (2003).

- Ito, K., Sass, H., Urban, J., Hofbauer, A., Schneuwly, S.: GAL4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy and development of the *Drosophila* central nervous system. *Cell Tissue Res* **290**: 1 – 10 (1997).
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J.: A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**: 979-982 (2000).
- Kaang, B.K., Kandel, E.R., Grant, S.G.: Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*. **10(3)**:427-35 (1993).
- Kitamoto, T.: Conditional Modification of Behavior in *Drosophila* by Targeted Expression of a Temperature-Sensitive *shibire* Allele in Defined Neurons. *J. Neurobiol.* **47**: 81-92 (2001).
- Leon, D.A., Herberg, F.W., Banky, P. & Taylor, S.S.: A stable alpha-helical domain at the N terminus of the R1alpha subunits of cAMP-dependent protein kinase is a novel dimerization/docking motif. *J. Biol. Chem.* **272(45)**: 28431-28437 (1997).
- Li, W., Tully, T., Kalderon, D.: Effects of a conditional *Drosophila* PKA mutant on olfactory learning and memory. *Learn Mem* **2**: 320 –333 (1996).
- Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Ashe, K.H., Frautschy, S.A.: Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **20**: 5709-5714 (2000).
- Livingstone, M.S., Sziber, P.P. and Quinn, W.G. (1984) Loss of calcium/ calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* **37**: 205–215

- Lu, Y., Lu, Y.S., Shuai, Y., Feng, C., Tully, T., Xie, Z., Zhong, Y., Zhou, H.M.: The AKAP Yu is required for olfactory long-term memory formation in *Drosophila*. *Pnas* **104(34)**: 13792 – 13797 (2007).
- Martin, K.C., Casadio, A., Zhu, H., Yaping, E., Rose, J.C., Chen, M., Bailey, C.H., and Kandel, E.R.: Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* **91**: 927–938 (1997).
- McGuire S.E., Le P.T., Osborn A.J., Matsumoto K., Davis R.L.: Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**: 1765–1768 (2003).
- Menzel, R.: Learning, memory and “cognition“ in honey bees. *Neurobiology of Comparative Cognition*: 237-292. R.P. Kesner and D.S. Olten (Hrsg.), New York: Hillsdale (1990).
- Menzel, R., Müller, U.: Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci.* **19**: 379-404 (1996).
- Menzel, R.: Memory dynamics in the honeybee. *J. Comp. Physiol. A* **185**: 323–340 (1999).
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H. and Lopez, J.: Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88(9)**: 3997-4000(1991).
- Moita, M.A., Lamprecht, R., Nader, K., LeDoux, J.E.: A-kinase anchoring proteins in amygdala are involved in auditory fear memory. *Nat Neurosci* **5**: 837– 838 (2002).

- Monastirioti, M., Linn, C.E. Jr. and White, K.: Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J. Neurosci.* **16**: 3900–3911 (1996).
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D.: A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**: 982-985 (2000).
- Murphy, T.: The *Drosophila* Gateway Vector Collection. (2003)
- Müller, U.: Neuronal cAMP-Dependent Protein Kinase Type II Is Concentrated in Mushroom Bodies of *Drosophila melanogaster* and the Honeybee *Apis mellifera*. *J Neurobiol.* **33(1)**:33-44 (1997).
- Müller, U., Carew, T.J.: Serotonin induces temporally and mechanistically distinct phases of persistent PKA activity in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* **21**: 1423–1434 (1998).
- Müller, U.: Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* **27**: 159–168 (2000).
- Müller, U.: Learning in honeybees: from molecules to behaviour. *Zoology Review* **105**: 313-320 (2002).
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J.: A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**: 979-982 (2000).

- Keene, A.C., Krashes, M.J., Leung, B., Bernard, J.A., Waddell, S.: *Drosophila* dorsal paired medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Curr Biol* **16**: 1524–1530 (2006).
- Nagy, A. and Mar, L.: Creation and use of a Cre recombinase transgenic database. *Methods Mol. Biol.* **158**: 95–106 (2001).
- Papasozomenos, S.C., Binder, L.I.: Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton.* **8(3)**: 210–26 (1987)
- Pittenger, C., Huang, Y.Y., Paletzki, R.F., Bourtchouladze, R., Scanlin, H., Vronskaya, S., and Kandel, E.R.: Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* **34**: 447–462 (2002).
- Quinn, W.G., Sziber, P.P. and Booker, R.: The *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Nature* **277**: 212–214 (1979).
- Reisner, K.J., Shobe, J.L., Carew, T.J.: Molecular nodes in memory processing: insights from Aplysia. *Cell Mol Life Sci* 63:963–974 (2006).
- Riemensperger, T., Voller, T., Stock, P., Buchner, E., Fiala, A.: Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr Biol* **15**: 1953–1960 (2005).
- Roman, G., Davis, R.L.: Molecular biology and anatomy of *Drosophila* olfactory associative learning. *Bioessays.* **23(7)**: 571–81 (2001).
- Rubin, C. S. : A kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* **1224(3)**: 467–79 (1994).

- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K.: Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**: 173-177 (1999).
- Schwärzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., Heisenberg, M.: Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **23**:10495–10502 (2003).
- Schwärzel, M. and Müller, U.: Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 989-998 (2006).
- Schwärzel, M., Jaeckel, A., Müller, U.: Signaling at A-Kinase Anchoring Proteins Organizes Anesthesia-Sensitive Memory in *Drosophila*. *J Neurosci* **27(5)**: 1229 –1233 (2007).
- Sherff, C.M., Carew, T.J.: Parallel somatic and synaptic processing in the induction of intermediate-term and long-term synaptic facilitation in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7463–7468 (2004).
- Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., Kida, S.: CREB and memory. *Annu Rev Neurosci.* **21**: 127-48 (1998).
- Sindreu, C.B., Scheiner, Z.S., Storm, D.R.: Ca²⁺-Stimulated Adenylyl Cyclases Regulate ERK-Dependent Activation of MSK1 during Fear Conditioning. *Neuron.* **53(1)**:79-89 (2007).
- Smith, F.D., Langeberg, L.K., Scott, J.D.: The where's and when's of kinase anchoring. *TRENDS in Biochemical Sciences* (2006).
- Squire, L.R.: Memory and brain. New York/ Oxford: Oxford University Press (1987).
- Squire, L.R. & Kandel, E.R.: Gedächtnis - Die Natur des Erinnerns. *Spectrum*

- Steinberg, S.F. & Brunton, L.L.: Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 751-73 (2001).
- Thomas, U.: Die Rolle der Proteinkinase C bei der Bildung von Langzeitgedächtnis: Interaktion der PKC mit Ankerproteinen im Pilzkörper der Honigbiene *Apis mellifera*. *Dissertation* (2002).
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C., Del Vecchio, M.: Genetic Dissection of Consolidated Memory in *Drosophila*. *Cell* **79**: 35-47 (1994).
- Vergoz, V., Roussel, E., Sandoz, J.C., Giurfa, M.: Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PLoS ONE*. **2(3)**: e288 (2007).
- Wang, Y., Chen, Y., Chen, M., Xu, W.: AKAPs competing peptide HT31 disrupts the inhibitory effect of PKA on RhoA activity. *Oncol Rep.* **16(4)**: 755-61 (2006).
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An P., Antonarakis, S.E., [...]: Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520-562 (2002).
- Wong, W. & Scott, J. D.: AKAP signalling complexes: Focal points in space and time *Nature Reviews / Molecular Cell Biology* **5**: 959-970 (2004).
- Wüstenberg, D., Gerber, B.T. and Menzel, R.: Long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 2742–2745 (1998).
- Yin, J.C., Del Vecchio, M., Zhou, H., and Tully, T.: CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* **81**: 107–115 (1995)

Yin, J.C.P., Wallach, J.S., Del Vecchio, M., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G., and Tully, T.: Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *drosophila*. *Cell* **79**: 49–58 (1994).

Yu, D., Keene, A.C., Srivatsan, A., Waddell, S., Davis, R.L.: *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell* **123**: 945–957 (2005).

8. Liste der verwendeten Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase (Adenylat cyclase)
AKAP	PKA Ankerprotein (A-kinase anchoring protein)
AL	Antennalloben
aPKA	geankerte PKA (anchored PKA)
ATP	3'5' Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaare
C	katalytische Untereinheit der PKA
CaMK	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	zyklisches 3'5' Adenosinmonophosphat
CREB	cAMP Responsive Element Binding Protein
CS	konditionierter Stimulus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngige DNA
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
g	Gramm
°C	Grad Celsius
G-Protein	GTP bindendes Protein
h	Stunde (n)
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
LTM	Langzeitgedächtnis (long term memory)
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Molarität
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MB	Mushroom Body (Pilzkörper)
min	Minute (n)

Liste der verwendeten Abkürzungen

ml	Milliliter
mM	Millimolarität
MTM	Mittelzeitgedächtnis (mid-term-memory)
NBT	nitroblue Tetrazolium
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxyd
OD	optische Dichte (in nm angegeben)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PER	Proboscis Extension Response/Reflex
PKA	Protein Kinase A
R	regulatorische Untereinheit der PKA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
STM	Kurzzeitgedächtnis (short-term-memory)
UAS	upstream activator sequence
US	unkonditionierter Stimulus
UV	ultraviolette Strahlung
üN	über Nacht
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

9. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Uli Müller möchte ich mich als erstes für die interessante Fragestellung des Themas, die wertvollen Diskussionen und Anregungen für meine Arbeit, sowie das große Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Martin Schwärzel von der Emmy Noether Nachwuchsgruppe danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und das ebenfalls große Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. U. Walldorf für seine Bereitschaft, sich als Zweitkorrektor zur Verfügung zu stellen.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau A. Gardezi für die wertvollen Ratschläge bei den histologischen Techniken bedanken.

Herrn Dr. H. Kallenborn danke ich für die wertvollen Tipps und die Unterstützung am Mikroskop.

Herrn Dipl.-Ing. M. Glander danke ich ganz herzlich für die Hilfe, wenn es mit der Technik nicht so wirklich geklappt hat.

Danke an Herrn Dr. Alfred Wisser für all die wissenschaftlichen Diskussionen und die wertvollen statistischen Ratschläge.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Tina Martin und Thomas Laeger für das Korrekturlesen meiner Arbeit, die wertvollen Tipps und die schöne Zeit mit vielen netten Gesprächen (beruflich wie privat).

Frau I. Stein möchte ich für all die netten Gespräche und Ratschläge beruflich sowie privat bedanken. Vielen Dank auch für die Unterstützung, wenn ich in Sachen Papierkram nicht mehr weiter wusste.

Frau I. Fuchs möchte ich ganz herzlich für die nützlichen Tipps und die sehr netten Gespräche beruflicher und privater Natur danken. Danke für die „kuhle“ Zeit!

Besonders danken möchte ich auch den weiteren Doktoranden Jakob Hättig, Javaid Iqbal, Bärbel Heidtmann und der schon promovierten Eva Jost. Danke für die schöne Zeit, die wertvollen Diskussionen, die freundschaftlichen Gespräche und die schönen Abende.

Danke an unsere Diplomanden, Praktikanten und HiWis Katja, Katja, David, Heike, Anika, Kathy, Aline, Ute, Cornelia und Frank. Es war schön mit Euch!

Alles in allem: ein großes Dankeschön an meine Arbeitsgruppe für die schöne Zeit!

Danke auch an Petra Kaspar, die mir immer zur Seite stand.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an Carsten. Danke, dass es Dich gibt und dass Du mich während der Promotion so sehr unterstützt hast.

Ein ebenso herzliches Dankeschön geht an meine Eltern Norma & Manfred Jaeckel: Danke dass Ihr immer für mich da seid!

10. Lebenslauf

Name: Andrea Jaeckel
Geburtsdatum / -ort: 26.03.79, Saarbrücken

Schulbildung

1985 – 1989 Grundschule Saarbrücken – Russhütte

1989 – 1995 Willi-Graf-Realschule mit dem Abschluss „Mittlere Reife“

1995 – 1998 Willi-Graf-Gymnasium mit dem Abschluss „Allgemeine Hochschulreife“

Universitätsausbildung

01.10.98 - 25.02.04 Studium der allgemeinen Biologie an der Universität des Saarlandes

2000 Vordiplomsprüfung

2004 Abschluss des Studiums mit der Diplomprüfung

2004 Beginn der Promotion am Institut für Biowissenschaften, Zoologie / Physiologie bei Herrn Prof. Dr. U. Müller

Kongresse und Seminare

- 26.03.03 - 29.03.03 Teilnahme an der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie und der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, *Cell Biology and Development* - „CellBiD“ in Bonn
- 28.06.04 - 30.06.04 Teilnahme am Seminar „Proteomics“ der akademie4science in Saarbrücken
- 02.06.05 - 04.06.05 Teilnahme am 16. Neurobiologischen Doktorandenworkshop „Neuro-DoWo“ in Kaiserslautern
- 19.05.06 - 21.05.06 Teilnahme am 17. Neurobiologischen Doktorandenworkshop „Neuro-DoWo“ in Berlin
- 02.09.06 - 06.09.06 Teilnahme am „11th European *Drosophila* Neurobiology Meeting - Neurofly“ in Leuven (Belgien)
- 29.03.07 – 01.04.07 Teilnahme am „7th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society“ in Göttingen

Publikationen

Schwärzel, M., Jaeckel, A., Müller, U.: Signaling at A-Kinase Anchoring Proteins Organizes Anesthesia-Sensitive Memory in *Drosophila*. *J Neurosci* **27(5)**: 1229 –1233 (2007).

11. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, 2007

Andrea Jaeckel