



# **Der Einfluss der beiden cAMP Effektoren, PKA und EPAC, auf die Gedächtnisbildung bei *Drosophila melanogaster***

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von  
Antje Richlitzki  
aus Berlin  
2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 08.04.2010 bis 15.07.2014 an der Freien Universität im Institut für Neurogenetik in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Schwärzel angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Martin Schwärzel  
Freie Universität Berlin, Institut für Biologie, Neurogenetik
2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Sigrist  
Freie Universität Berlin, Institut für Biologie, Neurogenetik

Disputationstermin: 28.11.2014

---

# INHALTSVERZEICHNIS

## 1 EINLEITUNG

1.1	LERNEN UND GEDÄCHTNIS .....	1
1.1.1	Nicht-assoziatives und assoziatives Lernen.....	1
1.2	DER MODELLORGANISMUS <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	3
1.2.1	Assoziatives Lernen und die Gedächtnisbildung bei <i>Drosophila</i> .....	6
1.3	DAS OLFAKTORISCHE SYSTEM IN <i>DROSOPHILA</i> .....	9
1.3.1	Die anatomische Repräsentation des Duftes entlang der Riechbahn.....	9
1.3.2	Die anatomische Repräsentation der Bestrafung/Belohnung.....	11
1.4	GEDÄCHTNISSPUREN IN DEN EINZELNEN NEUROPILEN DES <i>DROSOPHILA</i> GEHIRNS.....	12
1.4.1	Gedächtnisspuren in den Antennalloben .....	12
1.4.2	Gedächtnisspuren im Pilzkörper .....	13
1.5	MOLEKULARE UND ZELLULÄRE MECHANISMEN DER GEDÄCHTNISBILDUNG – DER EINFLUSS VON cAMP .....	15
1.5.1	Die zwei cAMP Effektoren - PKA und EPAC .....	16
1.6	REGULATION DER PRÄSYNAPTISCHEN TRANSMITTERABGABE.....	20
1.6.1	Tomosyn .....	22
1.7	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT .....	24

## 2 MATERIAL UND METHODEN

2.1	FLIEGENHALTUNG .....	26
2.2	GENOTYPEN.....	26
2.3	OLFAKTORISCHE KONDITIONIERUNG.....	28
2.4	ANÄSTHESIE-RESISTENTES GEDÄCHTNIS (ARM).....	30
2.5	ANÄSTHESIE-SENSITIVES GEDÄCHTNIS (ASM) .....	30
2.6	TEST AUF REAKTIONSFÄHIGKEIT (DUFTVERMEIDUNG, SCHOCKVERMEIDUNG) .....	31
2.7	BESTIMMUNG DER PKA AKTIVITÄT .....	31
2.8	IMMUNHISTOCHEMIE .....	31
2.9	QUANTITATIVE REAL TIME-PCR .....	32
2.10	STATISTIK .....	32

## 3 ERGEBNISSE

3.1	PKA UND EPAC, ZWEI UNTERSCHIEDLICHE cAMP SENSOREN UND IHR EINFLUSS AUF DIE GEDÄCHTNISBILDUNG BEI <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	33
3.1.1	Eine graduelle Degradation der <i>DC0</i> Untereinheit von PKA führt zu einem progressiven Verlust des PKA Signals .....	33
3.1.2	Eine geringe PKA Aktivität beeinflusst mehrere Ebenen des olfaktorischen Signalweges: LNs, PNs und KCs.....	37
3.1.3	Die olfaktorischen LNs und die PNs sind an der Bildung des stabilen ARM beteiligt .....	40
3.1.4	Auf der Ebene der Kenyonzellen werden funktionell unterschiedliche PKA Signale benötigt .....	42
3.1.5	Akute vs. entwicklungsbedingte Auswirkungen einer stark reduzierten PKA Aktivität auf die Gedächtnisbildung .....	46

---

3.1.6	EPAC besitzt eine funktionelle Rolle bei der Bildung des STM und des labilen ASM .....	48
3.1.7	Gewebespezifische Manipulation von EPAC im <i>Drosophila</i> Gehirn .....	50
3.1.8	EPAC Signale beeinflussen die Bildung des STM und des labilen ASM innerhalb der KCs der MBs .....	51
3.1.9	EPAC Signale in den KCs der MBs sind für die Bildung des STM und des ASM hinreichend .....	53
3.1.10	Vergleichende Gegenüberstellung PKA-spezifischer und EPAC-spezifischer Signale bei der Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses.....	54
3.2	DER EINFLUSS DES SYNAPTISCHEN PROTEINS TOMOSYN AUF DIE GEDÄCHTNISBILDUNG BEI <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	55
3.2.1	Tomosyn wird für die Bildung des ASM benötigt.....	56
3.2.2	Tomosyn wird auf der Ebene der KCs für die Bildung des ASM benötigt .....	58
3.2.3	Tomosyn ist in den $\gamma$ Loben der KCs für die Bildung des labilen ASM ausreichend .....	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	
4.1	AKTIVITÄTSABHÄNGIGE PKA SIGNALE WERDEN INNERHALB DEFINIERTER NETZWERKE FÜR DIE GEDÄCHTNISBILDUNG BENÖTIGT.....	63
4.1.1	Akut vs. entwicklungsbedingte Auswirkungen einer stark herunterregulierten PKA Aktivität.....	65
4.2	EPAC BESITZT EINE FUNKTION BEI DER BILDUNG SPEZIFISCHER GEDÄCHTNIS-KOMPONENTEN .....	66
4.3	UNTERSCHIEDLICHE CAMP SIGNALE MODULIEREN DIE BILDUNG SPEZIFISCHER GEDÄCHTNIS-KOMPONENTEN .....	67
4.4	DIE INTEGRATION <i>RUTABAGA</i> -ABHÄNGIGER CAMP SIGNALE .....	68
4.4.1	<i>Rut</i> -abhängige Gedächtniskomponenten können innerhalb der KCs durch unterschiedliche Signalwege gebildet werden .....	68
4.4.2	<i>Rut</i> -abhängige Gedächtniskomponenten können durch unterschiedliche PKA Signale dissoziiert werden .....	70
4.4.3	Modell zur Bildung <i>rut</i> -abhängiger Gedächtniskomponenten.....	71
4.5	DIE INTEGRATION <i>RUTABAGA</i> -UNABHÄNGIGER CAMP SIGNALE.....	75
4.5.1	PKA unterstützt die Bildung des stabilen <i>rutabaga</i> -unabhängigen ARM auf mehreren neuronalen Ebenen.....	75
4.5.2	Die Bildung des <i>rut</i> -unabhängigen ARM – eine Modellvorstellung.....	76
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>107</b>
<b>12</b>	<b>EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>108</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Lernen und Gedächtnis

Lernen und Gedächtnisbildung sind zwei fundamentale Prozesse, die mit der Fähigkeit anhaltender Verhaltensänderungen einhergehen. Diese Verhaltensänderungen sind abhängig von gesammelten Erfahrungen und führen dazu, dass die erworbenen Informationen in vergleichbaren Zusammenhängen wieder abgerufen werden können. Somit stellt die Fähigkeit zu lernen eine Grundvoraussetzung dafür dar, sich adäquat der Umwelt anzupassen, was für das Überleben einer jeden Spezies notwendig ist. Die erworbenen Informationen werden während des Lernprozesses in sogenannte Gedächtnisspuren gespeichert und können später wieder aktiviert werden. Folglich ist das Lernen ein Prozess der Gedächtnisbildung, welcher eine Veränderung neuronaler Muster bedarf, die auf Modifikationen der Verbindungen einzelner Neurone zurückzuführen sind. Die aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung wird als synaptische Plastizität bezeichnet und stellt einen bedeutenden Mechanismus der Informationsspeicherung dar (Hebb, 1950; Kandel and Spencer, 1968; Milner et al., 1998). Demnach werden Gedächtnisse als wiederkehrende Muster neuronaler Aktivität repräsentiert, die einen dynamischen Charakter besitzen und komplexe Gedächtnisgebilde in bestimmten Arealen des Gehirns formen (Dubnau et al., 2003).

Neuronale Veränderungen, die beim Lernen und der Gedächtnisbildung hervorgerufen werden, wurden sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten umfangreich untersucht. Mit Hilfe einfacher Lernvorgänge wie Habituation, Sensitisierung und klassischer Konditionierung konnte gezeigt werden, dass es auf zellulärer und molekularer Ebene konservierte Eigenschaften der Lernmechanismen gibt, die selbst in den einfachsten Invertebraten vorhanden sind (Kandel, 2001).

### 1.1.1 Nicht-assoziatives und assoziatives Lernen

Einen wichtigen Ansatz bei der Untersuchung neuronaler Veränderungen während des Lernens und der Gedächtnisspeicherung stellte die Entwicklung einfacher Lernparadigmen dar, die sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten angewandt werden konnten. Dabei wurden auf molekularer und zellulärer Ebene Verhaltensänderungen untersucht, die entweder durch nicht-assoziatives oder durch assoziatives Lernen hervorgerufen werden konnten. Das nicht-assoziative Lernen bezieht sich auf eine Verhaltensänderung, die durch einzelne nicht zeitlich miteinander verknüpfte Reize hervorgerufen wird (Carew and Sahley, 1986). Habituation und Sensitisierung sind die bekanntesten Formen des nicht-assoziativen Lernens. Bei der

Habituation erfolgt eine Abnahme der Reizantwort auf einen wiederholt dargebotenen einzelnen neutralen Reiz, wohingegen die Sensitisierung einen gegenteiligen Prozess darstellt, d.h. bei einer wiederholten Darbietung eines meist schädlichen Reizes, erfolgt eine Zunahme der Reizantwort. Dementgegen wird beim assoziativen Lernen eine Verhaltensänderung durch eine Verknüpfung zweier gekoppelter Reize hervorgerufen.

Beim assoziativen Lernen unterscheidet man zwei Typen: die operante Konditionierung und die assoziative Konditionierung. Die operante Konditionierung beruht auf ein spontanes Verhalten, welches entweder positiv durch Belohnung oder negativ durch Bestrafung verstärkt oder unterdrückt werden kann (Skinner, 1938). Es wird folglich eine Assoziation zwischen einer gezeigten Reaktion und dessen Konsequenz erlernt. Im Gegensatz dazu wird bei der klassischen Konditionierung ein neutraler Reiz (konditionierter Stimulus, CS) mit einem biologisch relevanten Reiz (unkonditionierter Stimulus, US) verknüpft, der entweder positive oder negative Auswirkungen besitzen kann. Während der CS keine offensichtliche Reaktion hervorruft, löst der US häufig eine angeborene, unkonditionierte Reaktion (UR) aus. Bei einer zeitlichen Verbindung beider Reize werden diese miteinander assoziiert und rufen eine Verhaltensänderung hervor (konditionierte Reaktion, CR), die der UR entspricht. Die klassische Konditionierung wurde erstmals durch Ivan Pavlov 1927 beschrieben (Pavlov, 1927). Pavlov präsentierte einem Hund direkt vor der Futtergabe (US) einen Klingelton (CS). Der US führte zu einem erhöhten Speichelfluss (UR), während der Ton alleine keine Reaktion hervorrief. Eine mehrmalige zeitliche CS/US Assoziation führte dazu, dass der Hund bei einer alleinigen Präsentation des CS (Klingelton) einen erhöhten Speichelfluss aufwies (CR).

Aus diesen einfachen Formen des Lernens entwickelten sich brauchbare Modelle: bei Invertebraten beispielsweise der Kiemenrückzugreflex bei der Meeresschnecke *Aplysia* (Kandel and Spencer, 1968) oder das olfaktorische Lernen bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Quinn et al., 1974) und der Honigbiene *Apis mellifera* (Menzel and Erber, 1978). Obwohl Invertebraten verglichen mit Vertebraten eine geringere Anzahl Neuronen besitzen, ~20,000 im ZNS (zentrales Nervensystem) bei *Aplysia* und bis zu 100,000 in *Drosophila*, ist ihre Lernfähigkeit bemerkenswert, so dass sie eine gute Grundlage bieten, um die neuronalen Zusammenhänge beim Lernen und der Gedächtnisbildung auf molekularer und zellulärer Ebene zu erforschen. Insbesondere *Drosophila melanogaster* stellte sich als ein erfolgreiches Modellsystem heraus.

## 1.2 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Neben der einfachen Handhabung, einem schnellen Generationszyklus von ~10 Tagen und einer hohen Fertilität besitzt *Drosophila* eine Reihe von Vorteilen, die es zu einem besonders guten Modellorganismus macht (Neckameyer and Argue, 2013). Verglichen mit dem komplexen neuronalen Netzwerk der Vertebraten besitzt *Drosophila* mit seinen ~100,000 Neuronen ein sehr viel kleineres Gehirn, wobei die grundlegenden neuronalen Vorgänge und Signalkaskaden konservierte Homologien zu denen der Vertebraten aufweisen (Mayford et al., 2012). Dennoch ist *Drosophila* in der Lage komplexe Verhaltensmuster zu erlernen, die Aufschluss über das Zusammenwirken molekularer, zellulärer und neuronaler Netzwerke geben. Die komplette Sequenzierung der vier Chromosomen des *Drosophila*-Genoms (Adams et al., 2000) ermöglicht eine funktionelle Analyse auf genetischer Ebene, was insbesondere bei der Erforschung menschlicher Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder Huntington eine große Rolle spielt (Feany and Bender, 2000). Das *Drosophila*-Genom besitzt eine hohe genetische Homologie zu dem der Vertebraten (Rubin et al., 2000). Ungefähr 77% der bekannten menschlichen Gene, die für eine Erkrankung verantwortlich sind, besitzen orthologe Gene in *Drosophila* (Reiter et al., 2001).

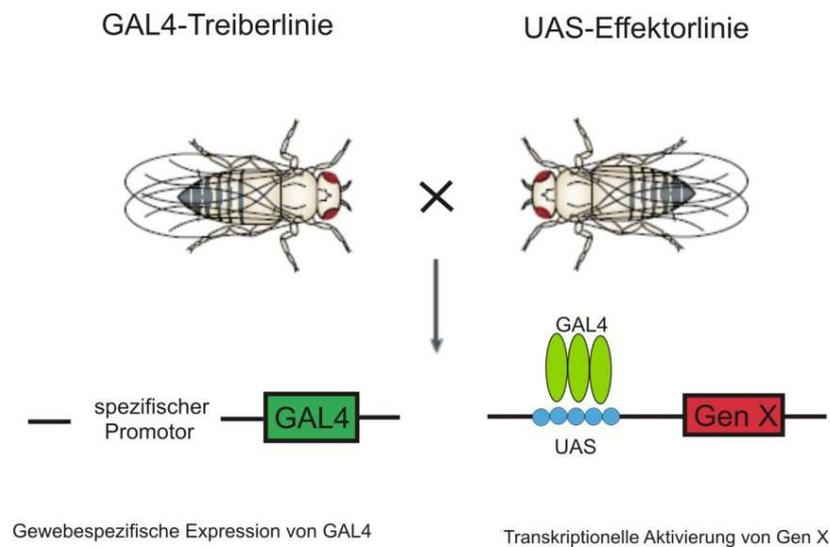
Ein großer Vorteil von *Drosophila* ist die Verfügbarkeit diverser Mutanten sowie eine Reihe genetischer Werkzeuge, die eine nähere Untersuchung einzelner Gene hinsichtlich ihrer Auswirkungen innerhalb diverser physiologischer Prozesse erlauben (Keene and Waddell, 2007; McGuire et al., 2005; Neckameyer and Argue, 2013). Bereits vor 40 Jahren wurden die ersten *Drosophila* Lernmutanten identifiziert, die eine Beeinträchtigung in ihrem Lernverhalten und in der Fähigkeit ein stabiles Gedächtnis zu bilden, besaßen (Dudai et al., 1976; Quinn et al., 1974). Seitdem wurden mit Hilfe mutagener Chemikalien oder durch direkte P-Element Insertionen eine große Vielzahl Mutanten generiert (Bellen et al., 1989; Hummel and Klambt, 2008; O'Kane and Gehring, 1987; Wilson et al., 1989). Mit Hilfe sogenannten Balancer Chromosomen können diese Mutationen innerhalb einer Population erhalten bleiben und von Generation zu Generation weitervererbt werden. Balancer Chromosomen verhindern nicht nur die Rekombination homologer Chromosomen, sondern besitzen zudem genetische Markierungen (Marker), die eine kontrollierte Identifizierung der Mutation während der Weitervererbung ermöglichen (Neckameyer and Argue, 2013).

Einen weiteren Vorteil bei der Arbeit mit *Drosophila* stellt das sogenannte GAL4/UAS System dar (Brand and Perrimon, 1993). Diese Methode ermöglicht eine zielgerichtete Genexpression in spezifischen Zelltypen oder Geweben. Bei dem GAL4/UAS System handelt es sich um ein binäres System. Ein Fliegenstamm (Treiberstamm), der den hefespezifischen

Transkriptionsfaktor GAL4 enthält, wird mit einem weiteren Fliegenstamm (Effektorstamm) verkreuzt, der eine für das GAL4-Protein spezifische Erkennungssequenz UAS (upstream activation sequence) besitzt. Der UAS ist ein bestimmtes Effektorgen nachgeschaltet, welches bei einer Bindung von GAL4 an die Erkennungssequenz transkribiert wird. Beide Komponenten werden in unterschiedlichen Fliegenstämmen generiert und erst die Nachkommen aus einer Kreuzung beider Parentalen, exprimieren das zu transkribierende Gen. Die Expression des GAL4-Proteins kann unter Kontrolle eines gewebe- oder zellspezifischen Promotors gebracht werden, der sich stromaufwärts des GAL4-Konstruktes befindet. Somit ist eine zielgerichtete Expression des Effektorgens in spezifischen Zelltypen oder Geweben möglich (Abb. 1).

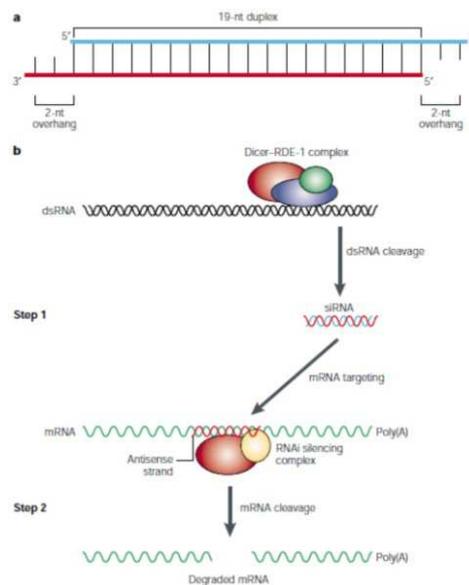
Das GAL4/UAS System kann vielseitig eingesetzt werden. So können beispielsweise Proteine gewebespezifisch über- oder herunterexprimiert werden, um die Auswirkungen dieser Proteine innerhalb bestimmter zellulärer Prozesse zu untersuchen. Des Weiteren bietet dieses System die Möglichkeit Rettungskonstrukte, genomische cDNA in einem Mutantenhintergrund, spezifisch zu exprimieren, wodurch die normale Funktion des Proteins wiederhergestellt werden kann. Durch die Verwendung eines temperaturabhängigen Repressors (GAL80<sup>ts</sup>) besteht neben einer gewebespezifischen Expression der Effektorgene die Möglichkeit einer zeitlichen Kontrolle der Expression. Der GAL80<sup>ts</sup> Repressor verhindert die Transkription des GAL4-Proteins bei einer restriktiven Temperatur von 18°C, indem er an das GAL4 bindet. Nur bei einer permissiven Temperatur von 30°C ist die Transkription des GAL4-Proteins und somit auch die Expression des Effektorgens möglich (McGuire et al., 2003). Dadurch kann eine gewebespezifische und eine zeitlich beschränkte Expression eines Proteins ermöglicht werden.

Neben den vielseitigen Vorteilen, die dieses System bietet, gibt es jedoch auch einige wichtige Beschränkungen. Da die Aktivität des GAL4-Proteins temperaturabhängig ist, kann die Expressionsstärke des Effektorgens negativ beeinflusst werden (Duffy, 2002). Es wurden zahlreiche GAL4-Linien generiert, die in den unterschiedlichsten Zellen und Geweben exprimieren. Dennoch fehlt diesen Linien häufig die Spezifität, so dass das Effektorgen möglicherweise nicht nur in den Zellen und Geweben, die von Interesse sind, exprimiert wird, sondern auch in anderen Zellpopulationen (Jenett et al., 2012). Des Weiteren ist in einigen Fällen die UAS Sequenz auch ohne Aktivierung durch das GAL4-Protein minimal aktiv, was zu einer ubiquitären Transkription des Effektorgens führen kann (Ito et al., 2003).



**Abbildung 1: Das GAL4/UAS System.** Das GAL4/UAS System besteht aus zwei Komponenten. Der eine Fliegenstamm (GAL4-Treiberlinie) enthält den hefespezifischen Transkriptionsfaktor GAL4 mit einem gewebespezifischen Promotor, der dem GAL4 vorgeschaltet ist. Ein zweiter Fliegenstamm (UAS-Effektorlinie) besitzt eine UAS Sequenz mit einem nachgeschalteten Effektorgen (Gen X). Bei einer Kreuzung dieser beiden Stämme werden beide Komponenten in den Nachkommen zusammengeführt und somit aktiv. Das GAL4-Protein bindet spezifisch an die UAS Sequenz, wodurch die Transkription des Effektorgens gewebespezifisch ermöglicht wird (adaptiert von St Johnston 2002).

Ein weiteres wichtiges Werkzeug, welches zusammen mit dem GAL4/UAS System verwendet werden kann, ist die RNA-Interferenz (RNAi). Die RNAi bietet die Möglichkeit, einen „loss-of-function“ Phänotyp zu generieren (Abb. 2). Dabei handelt es sich um eine posttranskriptionelle Genhemmung mittels doppelsträngiger RNA (dsRNA), die eine homologe Sequenz für das Gen, welches ausgeschaltet werden soll, besitzt. Die dsRNA wird zunächst durch einen Dicer, einem Mitglied der RNase III Familie der dsRNA spezifischen Ribonukleasen, in kleine ca. 19-21 Nukleotide lange siRNA Fragmente (small interfering RNAs) gespalten. Diese siRNAs binden schließlich an einen Nuklease Komplex (RNA-induced silencing complex, RISC) und werden in einzelsträngige RNAs gespalten, welche als Matrize für die zu degradierende mRNA dienen (Fire, 1999; Giordano et al., 2002; Hammond et al., 2001; McManus and Sharp, 2002). Die RNAi-Technik kann zusammen mit dem GAL4/UAS System eine gewebespezifische Herunterregulation eines Gens ermöglichen, was beispielsweise bei der Erforschung neuronaler Netzwerke einen großen Vorteil bietet.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz.** (A) Small interfering RNAs (siRNAs) bestehen aus zwei 21 Nukleotiden (nt) langen Einzelsträngen, die ein 19 nt Duplex mit einem 2 nt am 3'-Ende bilden (B) Zwei-Schritte Modell der RNA-Interferenz: Lange doppelsträngige RNA (dsRNA) wird durch einen Dicer in siRNAs gespalten (Schritt 1). Der anti-sense Strang der siRNA wird durch den RNAi silencing complex (RISC) genutzt, um die mRNA zu erkennen und zu degradieren (Quelle: McManus and Sharp, 2002).

### 1.2.1 Assoziatives Lernen und die Gedächtnisbildung bei *Drosophila*

*Drosophila* ist fähig eine Reihe assoziativer Lernparadigmen zu erlernen, die olfaktorische, visuelle oder taktile Reize verwenden (Davis, 1996; Skoulakis and Grammenoudi, 2006; Sokolowski, 2001). Um die am Lernen und an der Gedächtnisbildung beteiligten neuronalen, zellulären und molekularen Mechanismen verstehen zu können, entwickelten sich mehrere Konditionierungsparadigmen. Dazu gehören beispielsweise die visuelle Konditionierung (Brembs and Heisenberg, 2000; Wolf and Heisenberg, 1991), die konditionierte Vermeidung des Balzverhalten (Kamyshev et al., 1999; Siegel and Hall, 1979), das „Hitze-Box“ Lernen (Putz and Heisenberg, 2002; Wustmann and Heisenberg, 1997) und die olfaktorische Duftkonditionierung (Tully and Quinn, 1985). Es zeigte sich, dass unterschiedliche sensorische Signalwege verschiedene Gedächtnisse innerhalb des Gehirns bilden, die auf molekularer und anatomischer Ebene überlappende Mechanismen besitzen (Zars, 2010). Das am häufigsten genutzte Lernparadigma ist die olfaktorische assoziative Duftkonditionierung.

Das assoziative Lernen wurde erstmals 1974 bei *Drosophila* angewandt. Es zeigte sich, dass *Drosophila* fähig ist ein assoziatives Gedächtnis zu bilden, das bis zu 24 Stunden andauern kann (Quinn et al., 1974). Dabei handelte es sich um eine operante Konditionierung, die durchaus stabile Lernwerte erzeugte, jedoch einige Beschränkungen wie beispielsweise eine starke phototaktische Reaktion von *Drosophila* während der Testphase hervorrief. Dies führte

zu der Entwicklung eines klassischen Konditionierungsparadigmas, der assoziativen olfaktorischen Konditionierung (Tully and Quinn, 1985). Dabei erhält eine Gruppe von Fliegen einen Duft A ( $CS^+$ ), der zeitgleich mit einem US (12 elektrische Schocks bei der aversiven Konditionierung oder Zucker bei der appetitiven Konditionierung) präsentiert wird. Nach einer kurzen Pause erhält diese Gruppe einen weiteren Duft B ( $CS^-$ ), der keine Assoziation beinhaltet. Anschließend werden diese Fliegen in eine Testapparatur (T-Maze) überführt, in der sie sich zwischen den beiden Düften ( $CS^+$  oder  $CS^-$ ) entscheiden müssen (ausführliche Beschreibung unter Punkt 2.3). Wildtypische Fliegen zeigen im Normalfall eine starke Vermeidung oder eine starke Anziehung gegenüber dem präsentierten  $CS^+$ . Dieses Verhalten steht in Abhängigkeit mit dem verwendeten US. Bei einer aversiven Konditionierung wird der  $CS^+$  mit 12 elektrischen Schocks assoziiert und bewirkt somit eine Vermeidung des Duftes. Bei der appetitiven Konditionierung wird der  $CS^+$  durch Zucker belohnt und bewirkt folglich eine Anziehung (Schwaerzel et al., 2003; Tempel et al., 1983; Tully and Quinn, 1985). Dieses Lernparadigma führt zu einem robusten assoziativen Gedächtnis, welches sich in der gezeigten Vermeidung oder Anziehung gegenüber dem  $CS^+$  widerspiegelt.

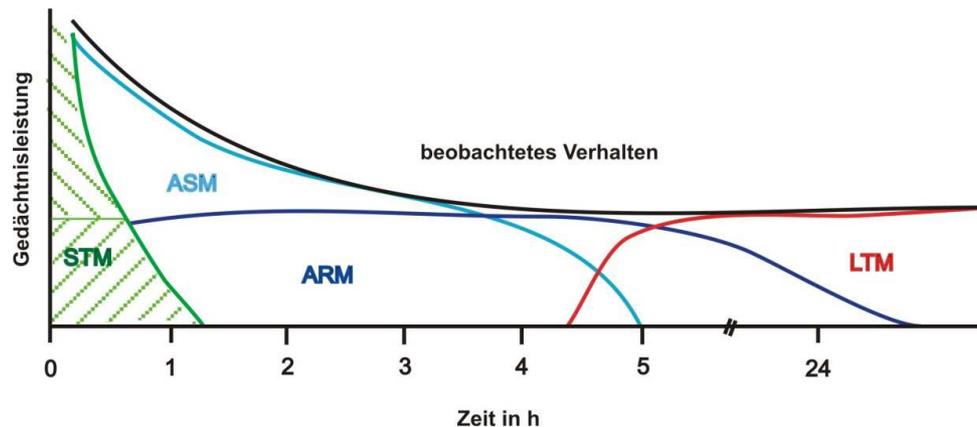
Das assoziative Gedächtnis besitzt einen zeitlich dynamischen Charakter und besteht aus mehreren unterscheidbaren Gedächtniskomponenten, die unterschiedliche Eigenschaften besitzen und über einen unterschiedlich langen Zeitraum existieren können (Abb. 3). Eine einzelne Trainingseinheit führt zur Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses (short-term memory, STM) und eines Mittelzeitgedächtnisses (middle-term memory, MTM). Diese Gedächtnisse benötigen für ihre Bildung keine Transkription und Translation neuer Proteine, sondern gehen mit Modifikationen bereits vorhandener Proteine einher (Blum et al., 2009a). Der frühestmögliche Zeitpunkt die Gedächtnisleistung zu testen, ist unmittelbar nach dem Training nach ~3 Minuten. Diese Gedächtnisleistung spiegelt das STM wieder und existiert für eine Dauer von ~1er Stunde (Margulies et al., 2005). Demnach ist ein direkter Einblick in die Akquise, dem eigentlichen Lernvorgang (LRN), nicht möglich, sondern wird anhand der gebildeten Gedächtniskomponente bewertet. Um Aufschluss über den tatsächlichen Lernvorgang zu erhalten, besteht jedoch die Möglichkeit mit Hilfe des temperatursensitiven Alleles *shibire*, die synaptische Übertragung während des Lernens zu blockieren (Kitamoto, 2001).

Das MTM existiert über einen längeren Zeitraum von ~1er bis 5 Stunden nach dem Training (Margulies et al., 2005). Es besteht aus verschiedenen Komponenten, die mittels einer amnestischen Behandlung voneinander getrennt werden können. Durch einen kurzen Kälteschock kann das MTM in seine zwei Bestandteile zerlegt werden, dem Anästhesie-resistenten Gedächtnis (anesthesia-resistant memory, ARM) und dem Anästhesie-sensitiven Gedächtnis

(anesthesia-sensitive memory, ASM). Das ASM gilt als eine labile Komponente, die durch eine Kälteschockbehandlung ausgelöscht werden kann, während das ARM eine stabile Komponente darstellt, die konsolidiert wird und dem Kälteschock gegenüber resistent ist (Isabel et al., 2004; Quinn and Dudai, 1976). In einem derzeitigen Model zur Dynamik des Gedächtnisses wird davon ausgegangen, dass die labile Gedächtniskomponente, ASM, direkt nach dem Training ausgebildet wird und über die Zeit graduell abnimmt, während sich die stabile Gedächtniskomponente, ARM, nach dem Training graduell entwickelt und über einen längeren Zeitpunkt stabil erhalten bleibt (Quinn and Dudai, 1976). Neuere Befunde konnten jedoch bereits beim STM eine labile (dynamische) und eine stabile (basale) Gedächtniskomponente identifizieren (Knappek et al., 2011; Scheunemann et al., 2013). Inwiefern diese Komponenten als Vorläufer der beiden MTM Komponenten zu verstehen sind, ist bislang unbekannt.

Das stabile ARM kann nicht nur nach einer einzelnen Trainingseinheit gebildet werden, sondern entsteht auch bei einem mehrfachen Training ohne Zwischenpause (massed training). Das so hervorgerufene ARM besitzt eine wesentlich höhere Gedächtnisleistung, ist jedoch ebenfalls Proteinsynthese-unabhängig (Tully et al., 1994).

Anästhesie-resistente Formen des Gedächtnisses werden nicht nur in *Drosophila* beschrieben, sondern existieren sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten (Erber, 1976; Galluscio, 1971; Weissman, 1967; Yamada et al., 1992). Ein mehrfaches Training mit einer kurzen Ruhepausen zwischen den einzelnen Trainingseinheiten (spaced training) führt zur Bildung eines Langzeitgedächtnisses (long-term memory, LTM), welches über mehrere Tage existiert und abhängig von der Synthese neuer Proteine ist (Tully et al., 1994). Das LTM ist sensitiv gegenüber einer pharmakologischen Inhibition der Proteinbiosynthese und benötigt eine durch CREB (cAMP response element-binding protein) vermittelte Gentranskription (DeZazzo and Tully, 1995; Yin et al., 1995). Die CREB-abhängige Genexpression während der Bildung des LTM ist ein konservierter Mechanismus, der in vielen Spezies beschrieben ist (Bourtchuladze et al., 1994; Guzowski and McGaugh, 1997; Yin and Tully, 1996). Eine genetische Trennung des CREB-abhängigen LTM und des CREB-unabhängigen ARM ist bisher nur in *Drosophila* beschrieben, folglich werden diese beiden genetisch und funktionell unterschiedlichen Gedächtniskomponenten parallel ausgebildet und existieren unabhängig voneinander (Dubnau et al., 2003).



**Abbildung 3: Das assoziative Gedächtnis besteht aus unterschiedlichen Gedächtniskomponenten.** Das beobachtete Verhalten nimmt über einen Zeitraum von mehreren Stunden bzw. Tagen kontinuierlich ab (schwarze Linie). Eine Untersuchung des Gedächtnisses zeigt verschiedene zeitliche voneinander unterscheidbare Gedächtniskomponenten. Das Kurzzeitgedächtnis (STM, grün) ist direkt nach dem Training messbar, hält jedoch nur über einen kurzen Zeitraum an. Neuere Befunde zeigen bereits im STM eine Unterteilung einer basalen Komponente und einer labilen Komponente. Das Mittelzeitgedächtnis (MTM) besteht aus zwei verschiedenen Komponenten, dem Anästhesie-resistenten Gedächtnis (ARM, dunkelblau) und dem Anästhesie-sensitiven Gedächtnis (ASM, hellblau), wobei nur das ARM bis zu 24 Stunden erhalten bleibt. Das Langzeitgedächtnis (LTM, rot) wird nach einem wiederholten Training mit einer kurzen Pause zwischen den einzelnen Trainingseinheiten gebildet (space training) und bleibt für mehrere Tage erhalten.

### 1.3 Das Olfaktorische System in *Drosophila*

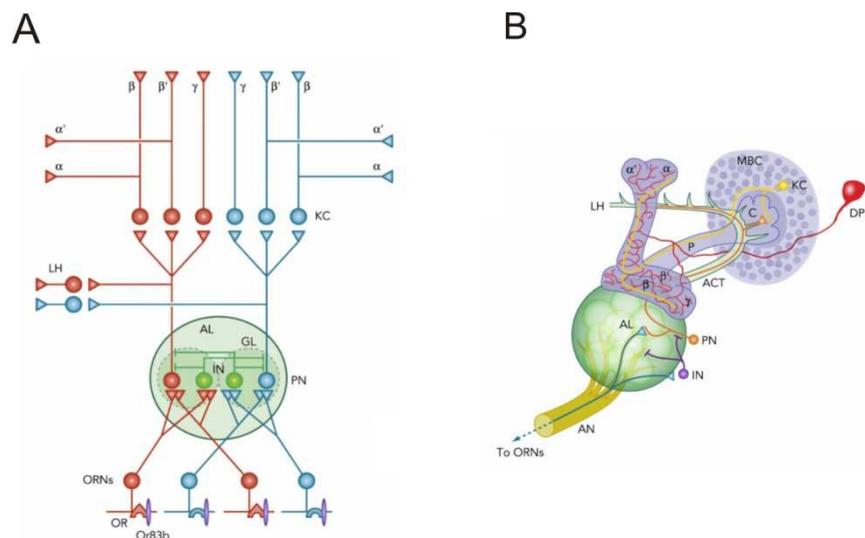
Das olfaktorische System in *Drosophila* zeigt große Ähnlichkeiten mit dem der *Mammalia*, wodurch es ein relevantes Modellsystem darstellt, um die Duftverarbeitung und die beteiligten Mechanismen, die bei der Gedächtnisbildung wirken, auch in komplexeren Organismen zu verstehen (Hildebrand and Shepherd, 1997; Roman and Davis, 2001; Vosshall et al., 2000). Dabei ist es notwendig die neuronalen Strukturen des olfaktorischen Systems, die bei der Gedächtnisbildung und der Gedächtnisspeicherung beteiligt sind, zu identifizieren. Bei der olfaktorischen Konditionierung wird eine Assoziation zwischen einem Duft (CS) und einem Elektroschock (US) erlernt, wobei diese Assoziation eine Veränderung im Verhalten auslöst. Diese Verhaltensänderung geht mit der Ausbildung verschiedener Gedächtnisspuren innerhalb des Gehirns einher. Demnach muss es dort bestimmte Strukturen geben, in denen die Informationen über den CS und den US konvergieren.

#### 1.3.1 Die anatomische Repräsentation des Duftes entlang der Riehbahn

Die Duftverarbeitung in *Drosophila* ist bereits gut charakterisiert (Abb. 4). Die Duftinformation wird über die olfaktorischen Rezeptoren (OR) in den Antennen aufgenommen und durch die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs), die ihre Axone durch den Antennennerv in die Antennalloben (ALs) projizieren, weitergeleitet. Die ALs bestehen aus ~50 morphologisch

getrennten und synapsenreichen funktionellen Einheiten, den Glomeruli. ORNs, die den gleichen OR exprimieren, projizieren ihre Axone in den gleichen Glomerulus, so dass jede Duftinformation ein spezifisches Duftmuster hervorrufen kann (Fiala, 2007; Gao et al., 2000; Vosshall et al., 2000). Dort bilden sie synaptische Verbindungen mit zwei verschiedenen Neuronenklassen, den lokalen Interneuronen (LNs) und den Projektionsneuronen (PNs). Die meisten LNs sind GABAerge ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) inhibitorische Neurone, die weite multiglomeruläre Verzweigungen innerhalb der ALs bilden (Shang et al., 2007; Stocker et al., 1990; Wilson and Laurent, 2005). Sie dienen der Verrechnung der Duftinformation, die sie sowohl von den ORNs als auch von den PNs erhalten (Ng et al., 2002). Die PNs leiten die Informationen über den Duft an höhere Gehirnbereiche weiter. Ihre Axone projizieren über zwei verschiedene Trakte, dem inneren Antennocerebraltrakt (iACT) und dem medianen Antennocerebraltrakt (mACT). Die PNs des iACT bilden synaptische Verbindungen mit der Kalyx der Pilzkörper (mushroom bodies, MBs) und dem lateralen Horn (LH), während die PNs des mACT nur ins LH projizieren (Stocker et al., 1997). Die meisten PNs innervieren normalerweise nur einen einzelnen Glomerulus (Stocker et al., 1990) und erhalten somit eine direkte Duftinformation von den ORNs, die den gleichen OR exprimieren (Vosshall et al., 2000). Einige PNs innervieren jedoch mehrere Glomeruli und werden somit durch verschiedene Düfte aktiviert. Diese PNs projizieren direkt über den mACT ins LH (Masse et al., 2009; Stocker et al., 1990). Bisher ist wenig über die Funktion des LH bei der Duftverarbeitung bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass das LH bei der Integration und Bewertung der olfaktorischen Information eine Rolle spielen könnte (Gupta and Stopfer, 2012; Jefferis et al., 2007).

Die MBs sind bilaterale symmetrische Strukturen, die pro Hemisphäre aus ~2500 intrinsischen Kenyonzellen (KCs) bestehen. Ihre Dendriten formen die Kalyx, in der die Duftinformation der PNs projiziert wird. Die Axone der KCs leiten die Information durch den Pedunculus, wo sie schließlich in unterschiedliche Substrukturen, den Loben, verzweigen (Crittenden et al., 1998; Lee et al., 1999; Technau and Heisenberg, 1982). Je nach funktionellen und anatomischen Charakteristiken werden sie in  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  und  $\gamma$  Loben unterschieden. Die  $\alpha/\beta$  und  $\alpha'/\beta'$  Loben bilden zwei Verzweigungen, wobei die  $\alpha$  und  $\alpha'$  Neurone in vertikale und die  $\beta$  und  $\beta'$  Neurone in horizontale Loben verzweigen. Die  $\gamma$  Neurone formen horizontal die  $\gamma$  Loben (Davis and Giurfa, 2012). Die MBs spielen eine zentrale Rolle beim olfaktorischen Lernen und der Gedächtnisbildung, da sie sowohl die olfaktorischen Informationen sowie die sensorischen Informationen, die durch den US vermittelt werden, miteinander integrieren können.



**Abbildung 4: Schematische und anatomische Darstellung des olfaktorischen Systems.** (A) Jedes olfaktorische Rezeptorneuron (ORN) exprimiert nur einen Typ der olfaktorischen Rezeptoren (OR). Alle ORNs, die den gleichen OR exprimieren, projizieren in den gleichen Glomerulus (GL) der Antennalloben (ALs). ORNs bilden synaptische Verbindungen mit lokalen Interneuronen (LNs) und Projektionsneuronen (PNs). Die PNs projizieren ihre Axone in die Kenyonzellen (KCs) der Pilzkörper (MBs) und in das laterale Horn (LH). Man unterscheidet hauptsächlich 3 verschiedene Klassen MB Neurone:  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  und  $\gamma$  Loben. (B) Die ORNs erstrecken ihre Axone entlang des Antennennervs (AN) in die ALs. Die ORNs bilden synaptische Verbindungen mit den PNs und den LNs, deren Zellkörper in der Peripherie der ALs liegen. Die PNs projizieren ihre Axone in die Kalyx (K) über den Antennocerebraltrakt (iACT). Die Axone der KCs leiten durch den Pedunculus, wo sie schließlich in unterschiedliche Substrukturen, den Loben, verzweigen (Quelle: Busto et al. (2010)).

### 1.3.2 Die anatomische Repräsentation der Bestrafung/Belohnung

Das olfaktorische Konditionierungsparadigma benutzt entweder bestrafende Elektroschocks (aversive Konditionierung) oder belohnenden Zucker (appetitive Konditionierung) als unkontingierten Stimulus (US). Der durch den US aktivierte sensorische Signalweg ist bisher noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Es wird jedoch angenommen, dass der US monoaminerge modulatorische Neurone stimuliert, wobei insbesondere Dopamin (DA) und Octopamin (OA) eine wesentliche Rolle spielen (Davis, 2005). Dopaminerge Neurone repräsentieren Informationen über den aversiven US und octopaminerge Neurone vermitteln Informationen über den appetitiven US, wobei neuere Studien ebenfalls eine dopaminerge Funktion für den appetitiven Stimulus aufzeigen konnten (Krashes et al., 2009; Schwaerzel et al., 2003; Waddell, 2013).

In *Drosophila* wurden drei dopaminerge Zellcluster (PAM, PPL1 und PPL2a) identifiziert, die direkt zu den MBs projizieren und dort die verschiedenen Loben innervieren (Aso et al., 2012; Mao and Davis, 2009). Dopaminerge Neurone reagieren stark auf elektrische Reize (Riemensperger et al., 2005) und das Blocken der synaptischen Transmission in dopaminergen Neuronen während des Trainings führt zu einer Beeinträchtigung des aversiven Lernens,

wobei das appetitive Lernen unbeeinträchtigt bleibt (Schwaerzel et al., 2003). Octopaminerge Rezeptorgene werden vorrangig in den MBs exprimiert und sind an die Adenylatzyklase (AC) gekoppelt, was auf eine Beteiligung von OA bei der Gedächtnisbildung hindeutet (Han et al., 1998). Mutanten, denen das Enzym Tyramin- $\beta$ -hydroxylase (T $\beta$ H) fehlt und somit OA nicht synthetisieren können, zeigen eine Beeinträchtigung im appetitiven Lernparadigma, jedoch nicht beim aversiven Lernen. Dieser Effekt kann durch eine Fütterung von OA, direkt vor dem Training, gerettet werden (Schwaerzel et al., 2003). Diese Beobachtungen zeigen eine direkte Funktion der beiden biogenen Amine bei der Repräsentation des US während des olfaktorischen Lernens auf.

#### **1.4 Gedächtnisspuren in den einzelnen Neuropilen des *Drosophila* Gehirns**

Bei der Gedächtnisbildung treten eine Reihe Veränderungen innerhalb der Neurone auf, die die relevanten sensorischen Informationen verarbeiten. Diese Modifikationen werden als zelluläre Gedächtnisspuren bezeichnet und betreffen jegliche Aktivitätsänderungen dieser Neurone. Beispielsweise führt eine Modifikation in der Expression oder Funktion von Ionenkanälen dazu, dass sich die Neurone in ihren elektrischen Eigenschaften verändern und somit mehr oder weniger fähig sind, elektrische Signale weiterzuleiten (Davis, 2011). Mit Hilfe von optisch bildgebenden Verfahren (optical Imaging Techniken), die bestimmte Reporter-moleküle wie Synapto-pHluorin oder G-CaMP benutzen, ist es möglich die physiologischen Reaktionen auf eine Vielzahl verschiedener Stimuli im Gehirn darzustellen. Beispielsweise können *in vivo* Veränderungen, die während oder nach einem Lernprozess stattfinden, innerhalb einzelner Zellen oder Gewebe nachgewiesen werden. Dies können physiologische Prozesse wie die Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - oder cAMP-Konzentration, Transmitterausschüttungen oder Veränderungen der spannungsabhängigen Ionenkanäle sein (Miesenbock et al., 1998; Nakai et al., 2001; Ng et al., 2002). Der Gebrauch dieser Reporter-moleküle führte zu einer Identifikation verschiedener zellulärer Gedächtnisspuren, die vorrangig in den MBs aber auch in den ALs gefunden wurden.

##### **1.4.1 Gedächtnisspuren in den Antennalloben**

In den ALs konvergiert ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher Neuronentypen: die ORNs, die PNs und die LNs. Verschiedene Düfte rufen räumlich und temporär definierte Muster glomerulärer Aktivität hervor (Fiala et al., 2002; Marin et al., 2002; Vosshall et al., 2000). Somit werden die ALs in erster Linie als eine Struktur betrachtet, in der die olfaktori-

schen Informationen verarbeitet und an höhere integrative Verarbeitungszentren, wie den MBs, weitergeleitet werden.

Die erste zelluläre Gedächtnisspur konnte in den ALs der Honigbiene durch optisches Imaging nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass während des assoziativen Lernens die Duftrepräsentation innerhalb der ALs verändert wird. Zudem führte eine spezifische Blockierung der synaptischen Übertragung in der ALs, zu einer Beeinträchtigung der Gedächtnisbildung (Erber et al., 1980; Faber et al., 1999). Auch in *Drosophila* konnte kürzlich eine Gedächtnisspur in den ALs nachgewiesen werden (Yu et al., 2004). Düfte erzeugen ein spezifisches glomeruläres Aktivitätsmuster innerhalb der Antennalloben. Durch das Reportermolekül Synapto-pHluorin, welches die synaptische Aktivität in den PNs visualisiert, konnte gezeigt werden, dass sich unmittelbar nach einer Konditionierung dieses duftabhängige Aktivitätsmuster verändert, d.h. das während der Konditionierung zusätzliche PNs spezifisch aktiviert werden (Yu et al., 2004). Diese Veränderung ist jedoch nur von kurzer Dauer und stellt demnach eine frühe Gedächtnisspur dar. In kultivierten *Drosophila* Gehirnen konnte jedoch nach einer assoziierten Stimulation eine erhöhte synaptische Transmission zwischen den ALs und den MBs für mehr als 2 Stunden beobachtet werden (Ueno et al., 2013). Demnach scheinen die ALs nicht nur der Duftverarbeitung zu dienen, sondern besitzen möglicherweise auch eine entscheidende Rolle bei der Gedächtnisbildung.

#### **1.4.2 Gedächtnisspuren im Pilzkörper**

In erster Linie gelten die MBs als notwendige Strukturen, die an der CS/US Integration beteiligt sind. Genetische oder pharmakologische Eingriffe, die einen strukturellen Defekt oder einen kompletten Verlust der MBs verursachen, führen zu einer Beeinträchtigung des Lernens assoziativer Stimuli (Davis, 1996; de Belle and Heisenberg, 1994; Heisenberg et al., 1985). Viele Gene, die beim Lernen und der Gedächtnisbildung eine wesentliche Rolle spielen, werden vorzugsweise in den MBs exprimiert (Han et al., 1998; Nighorn et al., 1991; Skoulakis et al., 1993).

Die MBs bestehen aus mindestens 3 morphologisch und funktionell unterscheidbaren Zelltypen, den  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  und  $\gamma$  Loben, deren Dendriten zur Kalyx projizieren, wo die olfaktorische Information durch die PNs übertragen wird. Die olfaktorische Information aktiviert innerhalb des Lobensystems eine relativ kleine Population der KCs, so dass eine zelluläre Spezifität des Duftgedächtnisses entsteht (Honegger et al., 2011; Turner et al., 2008; Wang et al., 2008). Reversible Experimente mit dem temperaturabhängigen Allel *shibire* zeigen unterschiedliche zeitliche Notwendigkeiten in der neuronalen Übertragung innerhalb des Lobensystems. Das

*shi* Gen kodiert für das Protein Dynamin, das die Exozytose synaptischer Transmitter blockiert und somit die neuronale Transmission bei einer restriktiven Temperatur verhindern kann (Kitamoto, 2001). Mittels dieser Blockierung konnten unterschiedliche Gedächtnisspuren innerhalb der MBs nachgewiesen werden. Demnach wird angenommen, dass die  $\alpha'/\beta'$  Loben während der Akquise benötigt werden und für die Festigung einer frühen Gedächtnisspur verantwortlich sind. Sie sind jedoch nicht essentiell für die Speicherung des Gedächtnisses, da sie auf den Abruf keine Einfluss nehmen (Krashes et al., 2007). Die  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben werden dementsgegen eher für den Abruf und somit für die Speicherung benötigt, sind jedoch während der Akquise nicht erforderlich (Dubnau et al., 2001; Huang et al., 2012; McGuire et al., 2001; Schwaerzel et al., 2002; Xie et al., 2013). Dies führte zu einem Modell, bei dem davon ausgegangen wird, dass die Aktivität in den  $\alpha'/\beta'$  Neuronen die Bildung einer frühen Gedächtnisspur in den  $\gamma$  Neuronen fördert, die schließlich in den  $\alpha/\beta$  Neuronen konsolidiert wird (Cervantes-Sandoval et al., 2013). Dieses Modell ist konsistent mit Beobachtungen, die anhand optischer Imagingstudien aufgezeigt werden konnten. Die MBs zeigen bei einer CS/US Assoziation ein intrazellulär verändertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveau. Innerhalb der  $\alpha'/\beta'$  Neurone ist direkt nach einer Konditionierung eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu beobachten, was auf eine frühe zelluläre Gedächtnisspur hindeutet. Diese Gedächtnisspur hält für ~60 Minuten an und konnte nur in diesen Neuronen nachgewiesen werden (Wang et al., 2008). Dementgegen zeigen die  $\alpha/\beta$  und die  $\gamma$  Neurone eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung während des Abrufs einer länger anhaltenden Gedächtnisspur (Akalal et al., 2010; Cervantes-Sandoval et al., 2013; Yu et al., 2006).

Die MBs werden innerhalb des Fliegenhirns von verschiedenen exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen innerviert. Zwei MB assoziierte Neuronenpaare, die dorsal gepaarten medialen (DPM) Neurone und die anterior gepaarten lateralen (APL) Neurone, zeigen eine Beteiligung bei der Gedächtnisbildung. Die APL Neurone segregieren den inhibitorischen Neurotransmitter GABA in das Lobensystem und in die Kalyx der MBs. Eine Reduktion von GABA während einer Konditionierung führt zu einer Verbesserung der Akquise. Demzufolge stellen die APL Neurone einen inhibitorischen Signalweg dar. Nach einer CS/US Stimulation zeigen die APL Neurone eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und eine verringerte GABAerge Ausschüttung für ~5 Minuten, was auf eine trainingsinduzierte veränderte Plastizität der APL Neurone hindeutet (Liu and Davis, 2009; Liu et al., 2007).

Das zweite wichtige Neuronenpaar, das bei der Gedächtnisbildung eine wichtige Funktion einnimmt, wurde durch die Mutante *amnesiac* (*amn*) identifiziert. Das *amnesiac* Gen kodiert für ein Homolog des Wirbeltierneuropeptids PACAP (Hypophysen-Adenylatcyclase-aktivierendes Peptid) und wird vorrangig in den DPM Neuronen exprimiert, in denen es für

die Ausbildung einer intermediären Gedächtnisspur benötigt wird (Feany and Quinn, 1995; Waddell et al., 2000). *Amn* Mutanten zeigen direkt nach einer Konditionierung ein normales Verhalten, jedoch nimmt ihre Gedächtnisleistung mit fortschreitender Zeit rapide ab (Tully and Quinn, 1985). Eine CS/US Stimulation führt zu einer Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration nach ~30 Minuten, die bis zu ~90 Minuten anhalten kann (Yu et al., 2005). Diese *amn*-abhängige intermediäre Gedächtnisspur wurde in den DPM Neuronen gefunden, die die vertikalen Loben der MBs innervieren. Unklar ist bisher, inwiefern diese intermediäre Gedächtnisspur eine konsolidierte Form früherer Gedächtnisspuren darstellt oder ob sie unabhängig von diesen ausgebildet wird.

### 1.5 Molekulare und zelluläre Mechanismen der Gedächtnisbildung – Der Einfluss von cAMP

Die genetische Analyse der einzelnen Gedächtniskomponenten wurde erstmals 1973 durch Seymour Benzer eingeführt. Er schlussfolgerte, dass ein einzelnes mutiertes Gen bestimmte Verhaltensweisen negativ beeinflussen könnte. Anhand dieser Verhaltensänderungen sei es möglich, die Funktion und Wirkungsweise dieses Gens hinsichtlich der Gedächtnisbildung und der dazugehörigen Prozesse näher zu untersuchen (Benzer, 1973). Dies führte dazu, dass eine Vielzahl an Mutanten identifiziert wurde, die bei der olfaktorischen Duftkonditionierung Defizite beim Lernen und der Gedächtnisbildung aufwiesen. Diese Defizite betrafen selektiv verschiedene Gedächtniskomponenten.

Die ersten Einzelgen-Mutanten, die identifiziert und charakterisiert wurden, waren *dunce* (*dnc*) und *rutabaga* (*rut*) (Aceves-Pina and Quinn, 1979; Dudai et al., 1976; Livingstone et al., 1984). Beide kodieren für Gene, die den cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) Signalweg beeinflussen und vorrangig in den KCs der MBs exprimiert werden (Han et al., 1992; Nighorn et al., 1991). cAMP ist ein ubiquitärer sekundärer Botenstoff, der mehrere Effektoren aktiviert und dessen Signalwirkung die synaptische, strukturelle und funktionelle Plastizität während des Lernens und der Gedächtnisbildung moduliert. *Dnc* kodiert für eine cAMP-spezifische Phosphodiesterase Typ 2 (*dnc*-PDE), die cAMP degradiert, *rut* hingegen kodiert für eine  $Ca^{2+}$ / Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase Typ 1 (*rut*-AC), die cAMP aus ATP synthetisiert (Byers et al., 1981; Dudai et al., 1976; Livingstone et al., 1984). Obwohl beide Mutanten gegenteilige Auswirkungen auf das intrazelluläre cAMP Niveau besitzen, zeigen sie beim olfaktorischen Lernen ein Defizit bei der Bildung des STM und des MTM, wobei *dnc* für die Bildung des stabilen ARM benötigt wird, während *rut* die Bildung des labilen ASM unterstützt (Scheunemann et al., 2012). Konsistent mit ihrer Rolle beim Lernen und der Ge-

gedächtnisbildung werden *rut* und *dnc* vorzugsweise in den MBs exprimiert, wobei sie jedoch funktionell unterschiedliche cAMP Signale bedienen, die in verschiedenen Neuronenpopulationen benötigt werden. Während *rut*-abhängige cAMP Signale innerhalb der KCs in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben für die Bildung des STM und des labilen ASM benötigt werden (Akalal et al., 2006; Scheunemann et al., 2012; Zars et al., 2000), werden *dnc*-abhängige cAMP Signale in zwei unterschiedlichen olfaktorischen Neuropilen, den KCs und den lokalen Interneuronen der ALs, für die Bildung des STM und des stabilen ARM benötigt (Scheunemann et al., 2012). Die *rut*-AC besitzt in den KCs eine spezielle Funktion bei der CS/US Integration, da sie als sogenannter „Koinzidenzdetektor“ fungiert. Einerseits wird sie in Folge eines erhöhten  $Ca^{2+}$  Niveaus durch die  $Ca^{2+}$ / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) aktiviert (CS-Signalweg), andererseits durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (US-Signalweg), der seinerseits durch Neuromodulatoren wie DA oder OA aktiviert wird (Gervasi et al., 2010; Livingstone et al., 1984; Tomchik and Davis, 2009). Eine Mutation in der Rezeptoruntereinheit  $G\alpha_s$ , die eine dauerhafte Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors in den KCs bewirkt, führt zu einer Beeinträchtigung des olfaktorischen Lernens (Connolly et al., 1996). Folglich wird die G-Protein Signalwirkung für die Gedächtnisbildung benötigt.

### **1.5.1 Die zwei cAMP Effektoren - PKA und EPAC**

Neben *rut* und *dnc*, die einen direkten Einfluss auf das intrazelluläre cAMP Niveau ausüben, gibt es eine Reihe durch cAMP aktivierte „downstream“ Effektoren, die eine Beteiligung beim Lernen und der Gedächtnisbildung zeigen. Einer dieser Effektoren ist die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA), die ebenfalls vorrangig in den Loben und der Kalyx der MBs exprimiert wird (Müller, 1997; Skoulakis et al., 1993). PKA bildet in einem nicht aktivierten Zustand eine heterotetramere Struktur, die aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten besteht. In Gegenwart von cAMP binden 4 cAMP Moleküle an die regulatorischen Untereinheiten, was eine Dissoziation der beiden katalytischen Untereinheiten zur Folge hat. Die beiden katalytischen Untereinheiten können nun weitere Proteine innerhalb der Zelle oder des Zellkerns phosphorylieren (Foster et al., 1984; Kalderon and Rubin, 1988). Ein durch PKA phosphoryliertes Zielprotein ist beispielsweise der Transkriptionsfaktor CREB, der für die Bildung des Proteinbiosynthese abhängigen LTM notwendig ist. Eine Aktivierung von PKA reguliert verschiedene synaptische Prozesse. Beispielsweise führt eine Phosphorylierung durch die katalytische Untereinheit von PKA zum Schließen von Kaliumkanälen, einer ausgedehnten Depolarisation und einer erhöhten Transmitterausschüttung (Castellucci et al., 1980; Klein and Kandel, 1980). Eine Beteiligung von PKA bei der Gedächtnisbildung in

*Drosophila* konnte zunächst durch den Proteinkinase Inhibitor, PKI, gezeigt werden. PKI bindet an die regulatorischen Untereinheiten von PKA und verhindert somit eine cAMP abhängige Aktivierung der katalytischen Untereinheit. Eine daraus resultierende Erniedrigung der PKA Aktivität führt zu einer Beeinträchtigung bei der Bildung des STM und des MTM (Drain et al., 1991). Mutationen in der katalytischen Untereinheit (*DCO*) oder in der regulatorischen Untereinheit verdeutlichten die Funktion von PKA beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung. Dabei zeigte sich, dass der Expressionsgrad von PKA entscheidende Auswirkungen auf die Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses besitzt. Demnach sind bei einer geringeren PKA Expression die Auswirkungen auf die Gedächtnisbildung am größten, wobei nicht nur eine Verschlechterung der Gedächtnisleistung gezeigt werden konnte, sondern auch eine Verbesserung (Goodwin et al., 1997; Horiuchi et al., 2008; Li et al., 1996; Skoulakis et al., 1993). Eine geringfügige Reduktion der PKA Aktivität zeigt keine bzw. eine minimale Beeinträchtigung bei der Gedächtnisbildung, wohingegen eine verbleibende PKA Aktivität von ~25% das Lernen und somit die Gedächtnisleistung negativ beeinflusst. Eine weitere Reduktion der PKA Aktivität auf ~16% verursacht einen rapiden Abfall der Gedächtnisleistung, wobei mehrere Gedächtniskomponenten betroffen sind (Li et al., 1996). Zwei Mutanten konnten jedoch identifiziert werden, die trotz einer 50%igen Reduktion der PKA Aktivität eine verbesserte Gedächtnisleistung bei der Bildung der konsolidierten Gedächtnisphase ARM aufweisen (Horiuchi et al., 2008). Diese beiden Mutanten zeigen zudem einen positiven Einfluss auf die altersbedingte Verschlechterung der Gedächtnisleistung (Yamazaki et al., 2010; Yamazaki et al., 2007). Demnach ist die Gedächtnisbildung sehr empfindlich gegenüber der vorhandenen PKA Aktivität. Offensichtlich scheint es bestimmte PKA Schwellenwerte zu geben, die die einzelnen Gedächtniskomponenten entweder positiv oder negativ beeinflussen können.

Die intrazelluläre Lokalisation von PKA erfolgt durch A-Kinase Ankerproteine (AKAPs), mit deren Hilfe eine bestimmte Spezifität und Effektivität innerhalb der Signalwege sicher gestellt werden kann. AKAPs besitzen ein amphipathisches Helix Motiv, welches mit einer hohen Affinität an den N-Terminus der regulatorischen Untereinheiten von PKA bindet (Dell'Acqua et al., 2006; Herberg et al., 2000). Durch eine AKAP-PKA Bindung ist eine räumliche sowie eine zeitliche Kontrolle des PKA Signalweges möglich. PKA ist somit fähig, intrazellulär in direkter Nähe ihrer Zielsubstrate zu wirken. Neben der Verankerung der PKA besitzen AKAPs die Fähigkeit verschiedene Kinasen und Enzyme zu binden, wobei sie innerhalb der Zelle komplexe lokale Netzwerke ausbilden können (Pawson and Scott, 1997; Rubin, 1994; Wong and Scott, 2004). So können AKAPs als Gerüstproteine fungieren, die das intrazelluläre cAMP Niveau regulieren, in dem sie beispielsweise neben PKA auch PDEs und ACs integrie-

ren. Eine Akkumulation von cAMP ist intrazellulär auf spezifische Bereiche beschränkt, die räumlich und zeitlich durch ACs und PDEs reguliert werden können (Houslay and Adams, 2003; Willoughby and Cooper, 2007; Zaccolo et al., 2002). In *Mammalia* bildet das AKAP Yotiao (AKAP9), welches im Herz und im Gehirn für die Regulation von K<sup>+</sup>-Ionenkanälen benötigt wird, einen Multiproteinkomplex, der unter anderem eine PDE und eine AC integriert, um die cAMP abhängige PKA Aktivität zu regulieren (Piggott et al., 2008; Terrenoire et al., 2009). Auch das mAKAP $\beta$ , das für die Genregulation in kardialen Myozyten benötigt wird, wurde als ein AKAP identifiziert, welches beide Proteine miteinander vereint, um die cAMP Mikrodomänen intrazellulär zu regulieren (Dodge et al., 2001; Kapiloff et al., 2009; Kapiloff et al., 1999).

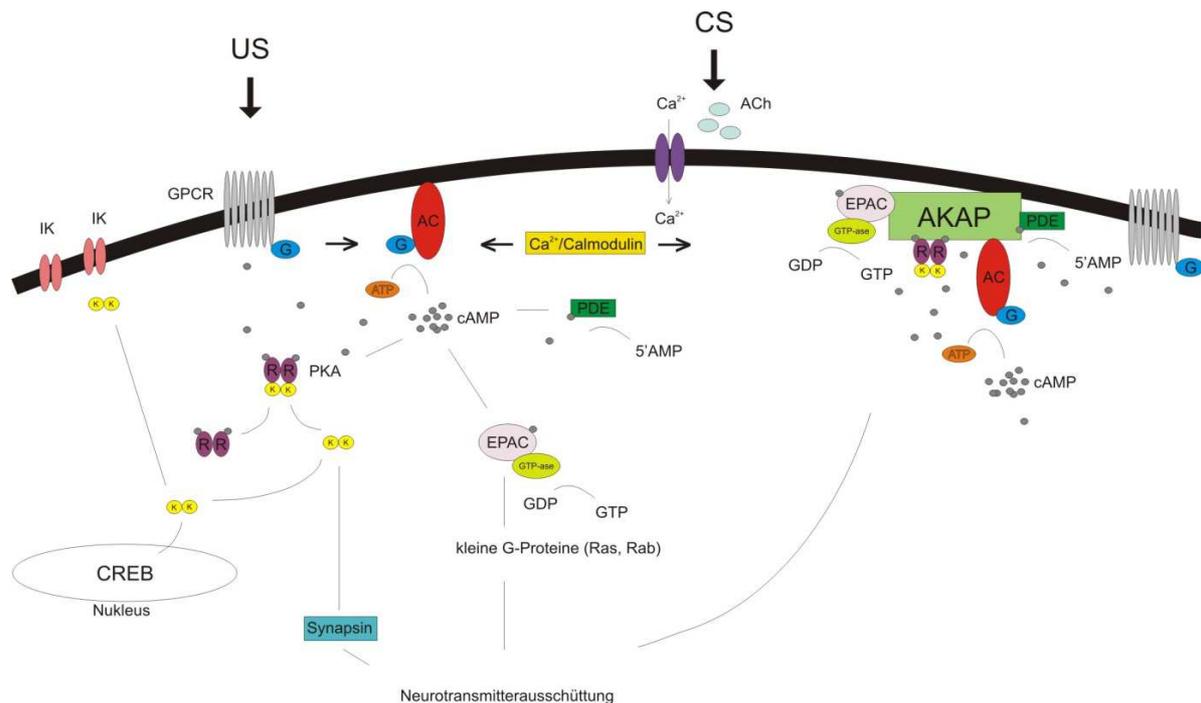
AKAPs sind durch ihre Interaktion mit PKA an der Gedächtnisbildung beteiligt. In *Drosophila* führt eine Störung der AKAP-PKA Interaktion durch das Kompetitorpeptid eCOPR2 zu einer Beeinträchtigung bei der Bildung des labilen ASM (Scheunemann et al., 2013; Schwaerzel et al., 2007). Die AKAP Mutante *yu* zeigt eine Beeinträchtigung in der Bildung des LTM, wobei frühere Gedächtniskomponenten normal ausgebildet werden (Lu et al., 2007) und das AKAP *rugose* zeigt einen Einfluss bei der Bildung des STM (Volders et al., 2012).

Es wird angenommen, dass die Gedächtnisbildung hauptsächlich von der cAMP abhängigen PKA reguliert wird, da sie eine Vielzahl von stromabwärts gelegenen Kinasen und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, die für die Gedächtnisbildung erforderlich sind. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass ein weiteres durch cAMP aktiviertes Effektorprotein einen Einfluß auf die Gedächtnisbildung besitzt. "Exchange Protein directly activated by cAMP" kurz EPAC wirkt als ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factors, GEF) für kleine G Proteine wie z.B. Rap1 und Rap2 der RAS Superfamilie (Bos, 2003; de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). EPAC besteht aus mehreren Domänen und besitzt am N-Terminus eine regulatorische Region, die eine cAMP Bindedomäne enthält und am C-Terminus eine katalytische Region, die in Anwesenheit von cAMP kleine G Proteine wie Rap aktivieren kann, in dem sie den Austausch von GDP zu GTP vermittelt (Breckler et al., 2011; Harper et al., 2008).

Bisherige Arbeiten deuten darauf hin, dass EPAC an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt ist, die unter anderem für die synaptische Plastizität benötigt werden. In glutamatergen Synapsen erhöht EPAC die Ausschüttung von Neurotransmittern (Cheung et al., 2006; Gekel and Neher, 2008; Sakaba and Neher, 2003; Zhong and Zucker, 2005) und in zerebralen Granulazellen kann EPAC die neuronale Exzitabilität modulieren (Ster et al., 2007). Hinweise für eine Rolle von EPAC beim Lernen und der Gedächtnisbildung sind bis-

her sehr limitiert. In Vertebraten konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Aktivierung von EPAC im Hippocampus von Mäusen zu länger anhaltenden Langzeitpotenzierungen und zu einer Verbesserung bei der Ausbildung des LTM führt (Gelinas et al., 2008; Ma et al., 2009). Eine Herunterregulation der Expression von EPAC zeigt eine Verschlechterung beim Abruf eines 72 Stunden Gedächtnisses (Ostroveanu et al., 2010) und EPAC Knockout-Mäuse weisen Defizite beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung auf (Yang et al., 2012). In Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase defizienten Mäusen wird eine Coaktivierung beider cAMP Effektoren benötigt, um einen Gedächtnisdefekt zu retten (Ouyang et al., 2008).

EPAC und PKA werden oft innerhalb der gleichen biologischen Prozesse benötigt. Dabei können sie entweder unabhängig voneinander, synergistisch oder entgegengesetzt agieren (Bos, 2006; Cheng et al., 2008). Eine Möglichkeit der Regulation beider cAMP Effektoren scheint unter anderem durch AKAPs gegeben zu sein. In Herzmuskelzellen neugeborener Ratten wurde ein AKAP identifiziert, welches fähig ist, sowohl PKA als auch EPAC zu binden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der einzelnen cAMP Effektoren abhängig von der vorhandenen cAMP Konzentration ist (Dodge-Kafka et al., 2005). Das neuronale Plasmamembran-assoziierte AKAP79/150 wurde ebenfalls als ein AKAP identifiziert, welches beide cAMP Effektoren strukturell integrieren kann. Über dieses AKAP wird der PKB/AKT Signalweg reguliert, wobei PKA die Phosphorylierung und Aktivierung von PKB unterdrückt, während eine Aktivierung von EPAC zu einer Erhöhung der PKB Phosphorylierung führt (Mei et al., 2002; Nijholt et al., 2008).



**Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der molekularen Mechanismen der aversiven Gedächtnisbildung.** Die Information des CS wird über die PNs zu den KCs der MBs projiziert. Die PNs entlassen Acetylcholin (ACh) an den synaptischen Verbindungen der KCs, wodurch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aktiviert werden. Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin gebundenen Aktivierung der Adenylatcyclase (AC). Die US Information wird durch Neurotransmitter wie DA präsentiert und stimuliert die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR). Das G-Protein (G) bindet an die AC, die als Koizidenz Detektor für die Integration beider Stimuli (US und CS) fungiert. Dies führt zu einer synergistischen Synthese von cAMP, welches verschiedene Effektoren wie die Proteinkinase A (PKA) oder EPAC aktivieren kann. PKA wiederum kann mehrere Zielproteine innerhalb der Zelle phosphorylieren, wodurch verschiedene synaptische Prozesse moduliert werden können. Beispielsweise phosphoryliert PKA den Transkriptionsfaktor CREB im Nucleus, der für die Bildung des LTM erforderlich ist, präsynaptische Proteine wie Synapsin, die an der synaptischen Neurotransmitterausschüttung beteiligt sind oder Ionenkanälen (IK), die auf das intrazelluläre Milieu wirken. EPAC wirkt als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF), der kleine G-Proteine wie Rab und Ras aktivieren kann, indem es den Austausch von GDP zu GTP vermittelt. Rab und Ras wirken unter anderem ebenfalls auf die synaptische Transmitterausschüttung, in dem sie beispielsweise den vesikulären Transport regulieren. PKA und EPAC können unabhängig voneinander agieren, oder zusammen mit anderen Proteinen durch A-Kinase Ankerproteine (AKAPs) komplexe Netzwerke bilden. Phosphodiesterasen (PDEs) regulieren die intrazelluläre cAMP Konzentration, indem sie cAMP zu 5'AMP degradieren.

## 1.6 Regulation der präsynaptischen Transmitterabgabe

Um sensorische Informationen innerhalb neuronaler Netzwerke weiterzugeben, ist eine effiziente synaptische Übertragung notwendig. Diese steht im Zusammenhang mit einer veränderten Aktivität der prä- und postsynaptischen Elemente eines Neurons. In chemischen Synapsen induziert ein in der Präsynapse ankommendes Aktionspotential einen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom, der zu einer exozytotischen Neurotransmitterabgabe in den synaptischen Spalt führt. Der synaptische Spalt befindet sich zwischen dem Axon eines Neurons (Präsynapse) und dem Dendriten eines weiteren Neurons (Postsynapse). Die abgegebenen Neurotransmitter binden an Rezeptoren

des postsynaptischen Neurons, was zu einem unmittelbaren Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  führt. Durch diese Prozesse wird eine Übertragung der Information von einem Neuron zum anderen Neuron ermöglicht.

Neurotransmitter werden durch eine Fusion der synaptischen Vesikel (SV) mit der präsynaptischen Plasmamembran in den synaptischen Spalt abgegeben. Dies beinhaltet mehrere komplexe Prozesse wie die Rekrutierung der SVs vom Reserve Pool zur aktiven Zone der Plasmamembran, das Anhaften der SV an die Plasmamembran, das Vorbereiten „Priming“ der SV zur Fusion mit der Plasmamembran und schließlich die Fusion der SV mit der Plasmamembran (Sudhof, 2000). Bei diesen Prozessen sind eine Reihe verschiedener Proteine beteiligt, die zwischen den Membranen der SV und der präsynaptischen Plasmamembran interagieren (Li and Chin, 2003; Richmond and Broadie, 2002; Sudhof, 2013). Eine wesentliche Schlüsselrolle bei der SV Exozytose nimmt die Bildung eines heterotrimeren SNARE [soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein (SNAP) receptor] Komplexes ein, der aus den SNARE-Plasmamembranproteinen, Syntaxin-1a und SNAP-25 (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein), und dem SNARE-Vesikelmembranprotein Synaptobrevin besteht (Fasshauer et al., 1998; Sollner et al., 1993; Sudhof, 1995). Diese SNARE Proteine sind innerhalb der Phyla eine hoch konservierte Gruppe membrangebundener Proteine, die eine 60 bis 70 bp große konservierte Sequenz, sogenannte SNARE Motive, besitzen (Weimbs et al., 1997). Eine Interaktion dieser SNARE Motive führt zur Bildung des stabilen SNARE Komplexes, der die SV in direkte Nähe zur Plasmamembran bringt und dort deren Fusion zur Abgabe der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt katalysiert (Lonart and Sudhof, 2000; Sutton et al., 1998). Die Anzahl der fusionskompetenten Vesikel und die Menge der bei der synaptischen Exozytose abgegebenen Vesikel, korreliert mit der Fähigkeit SNARE Komplexe zu bilden (Lonart and Sudhof, 2000; Xu et al., 1999)

Eine präzise Regulation der Neurotransmitterausschüttung ist essentiell für die Funktion neuronaler Netzwerke. Die Bildung des SNARE Komplexes und die darauffolgende Fusion der SV mit der Plasmamembran wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Es wurde eine Vielzahl verschiedener Proteine identifiziert, die bei der synaptischen Exozytose eine modulierende Funktion einnehmen. Beispielsweise interagiert das SV-Membranprotein Synaptotagmin direkt mit dem SNARE Komplex und dient als  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor für die Auslösung der synaptischen Transmitterabgabe (Chapman, 2002), Synapsin reguliert die Anzahl der für die Transmitterausschüttung zur Verfügung stehenden Vesikel, in dem es den Übergang der synaptischen Vesikel aus dem Reserve Pool (RP) zum unmittelbar zur Verfügung stehenden Vesikelpool (Ready Releasable Pool, RRP) reguliert (Ferreira and Rapoport, 2002) und

Munc13 bildet zusammen mit verschiedenen Rab Proteinen einen Komplex, der direkt mit dem SNARE Komplex interagiert, ihn stabilisiert und reguliert (Richmond and Broadie, 2002). Während der Anstieg in der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration das wesentliche Signal für die synaptische Transmitterausschüttung darstellt, sind weitere intrazelluläre Signalmoleküle für die Regulation der Exozytose bedeutend (Seino and Shibasaki, 2005). Einige der genannten Protein-Protein Interaktionen werden durch cAMP reguliert. Dies kann einerseits über die cAMP abhängige PKA vermittelt werden, die relevante Proteine wie Synapsin (Jovanovic et al., 2001), Tomosyn (Baba et al., 2005) oder SNAP-25 (Hepp et al., 2002; Risinger and Bennett, 1999) phosphoryliert. Andererseits kann cAMP die Transmitterausschüttung über EPAC regulieren, welches als Guaninnukleotid-Austauschfaktor auf die bei der Regulation beteiligten Rab Proteine wirken kann (Ozaki et al., 2000). Folglich reguliert und moduliert cAMP die synaptische Transmitterausschüttung durch PKA-abhängige und PKA-unabhängige Mechanismen.

### 1.6.1 Tomosyn

Das präsynaptische Protein Tomosyn ist maßgeblich an der Regulation des SNARE Komplexes beteiligt. Bisher wurden zwei Gene für Tomosyn im *Mammalia* Genom identifiziert, *tomosyn-1* und *tomosyn-2*, die in 7 alternativen Isoformen translatiert werden können. Einige Isoformen werden ubiquitär exprimiert, während andere gehirnspezifisch lokalisiert sind (Groffen et al., 2005; Yokoyama et al., 1999). Ursprünglich wurde Tomosyn als ein an Syntaxin-1a bindendes Protein bei einem Protein-Protein Interaktionsassay im zerebralen Cytosol von Ratten identifiziert (Fujita et al., 1998). Nähere Untersuchungen zeigten jedoch, dass Tomosyn als ein negativer Regulator bei der synaptischen Neurotransmitterausschüttung fungiert. Durch ein C-terminales Synaptobrevin-ähnliches SNARE Motiv ist Tomosyn fähig, zusammen mit den beiden SNARE Plasmamembranproteinen, Syntaxin und SNAP-25, einen „Tomosyn“ SNARE Komplex zu bilden, der eine Bindung des Vesikelmembranproteins Synaptobrevin verhindert (Fujita et al., 1998; Hatsuzawa et al., 2003; Pobbati et al., 2004). Dieser „Tomosyn“ SNARE Komplex reduziert die Bildung von SNARE Komplexen, wodurch eine Anheftung der SV an die Plasmamembran und eine Fusion der SV mit der Plasmamembran inhibiert wird (Gracheva et al., 2006; Gracheva et al., 2007; McEwen et al., 2006).

Eine genetische Ablation von Tomosyn in Mäusen und *Caenorhabditis elegans* führt dementsprechend zu einer erhöhten synaptischen Transmitterausschüttung, wohingegen eine Überexpression von Tomosyn in kultivierten superioren zervikalen Ganglien die Neurotransmitterausschüttung inhibiert (Baba et al., 2005; Gracheva et al., 2006; McEwen et al., 2006;

Sakisaka et al., 2008). Neben dem SNARE Motiv am C-Terminus besitzt Tomosyn eine Linker-Domäne und eine N-terminale Domäne, die sogenannte WD-40 Domäne, welche die inhibitorische Aktivität von Tomosyn strukturell regulieren können (Yizhar et al., 2007). Die Linker-Domäne kann reziprok intramolekular an die WD-40 Domäne und an das SNARE Motiv binden (Yamamoto et al., 2009). Eine Bindung der Linker-Domäne an die WD-40 Domäne führt zur Formation des „Tomosyn“ SNARE Komplexes und demzufolge zu einer Inhibition der Transmitterausschüttung. Wohingegen eine Bindung der Linker-Domäne an das SNARE Motiv die Bildung eines „Tomosyn“ SNARE Komplexes verhindert, wodurch die inhibitorische Aktivität von Tomosyn herabgesetzt wird (Yamamoto et al., 2009). Die N-terminale WD-40 Domäne ist ebenfalls für eine wirksame Inhibierung der Neurotransmitterausschüttung notwendig. Die WD-40 Domäne besteht aus einer ~40 bp langen konservierten Kernsequenz, die N-Terminus mehrfach wiederholt vorliegt. WD-40 Proteine falten sich zu  $\beta$ -propellerartigen Strukturen zusammen, die mit anderen Proteinen reversible Komplexe bilden können (Ashery et al., 2009). Dies ermöglicht eine sequenzielle oder simultane Interaktion verschiedener Proteine innerhalb dieses Komplexes (Neer et al., 1994; Smith et al., 1999). In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  interagiert die WD-40 Domäne von Tomosyn mit dem als  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor fungierenden SV-Membranprotein Synaptotagmin. Synaptotagmin katalysiert die SNARE Komplex vermittelte Membranfusion. Durch eine Bindung an Tomosyn wird diese Aktivität erheblich eingeschränkt und es kommt zu einer Inhibition der Transmitterausschüttung (Yamamoto et al., 2010). Des Weiteren konnte in *tomosyn* Mausmutanten gezeigt werden, dass die WD-40 Domäne die Bildung von SNARE Komplex Oligomeren fördert, was auf einen weiteren Mechanismus hindeutet, der die Bildung fusionskompetenter SNARE Komplexe beschränkt (Sakisaka et al., 2008).

Tomosyn wird durch die cAMP abhängige PKA reguliert. Eine PKA katalysierte Phosphorylierung von Tomosyn fungiert dabei als „off“ Schalter, um die inhibitorische Funktion von Tomosyn bei der Bildung der SNARE Komplexe zu unterbinden. Dadurch wird die Menge der zur Verfügung stehenden synaptischen Vesikel moduliert, was zu einer erhöhten Neurotransmitterabgabe führt (Baba et al., 2005). Die Beteiligung des cAMP/PKA Signalweges bei der Regulierung von Tomosyn lässt auf eine Beteiligung beim Lernen und der Gedächtnisbildung schließen. Hinweise darauf sind jedoch sehr limitiert. Die einzige bisher bekannte Studie zeigt, dass eine Überexpression von Tomosyn im Hippocampus von Mäusen zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernen und der Gedächtnisbildung führt (Barak et al., 2013). Jedoch konnte bei verschiedenen präsynaptischen Proteinen, die den SNARE Komplex regulieren oder an der Regulation einzelner Prozesse der synaptischen Neurotransmitterabgabe betei-

ligt sind, ein Einfluss auf das Verhalten gezeigt werden. So zeigen *munc13* defiziente Mäuse beispielsweise eine gestörte Fähigkeit, komplexe motorische Aufgaben zu erlernen (Augustin et al., 2001) und *rab3a* defiziente Mäuse weisen eine Störung beim Umkehrlernen im Morris Wasserlabyrinth und bei der Bildung eines Arbeits- und Referenzgedächtnisses auf (D'Adamo et al., 2004). Ein Verlust des präsynaptischen Proteins Synapsin führt zu einer Beeinflussung des Lernens und der Gedächtnisbildung bei Vertebraten und bei *Drosophila* (Godenschwege et al., 2004; Knappek et al., 2010; Silva et al., 1996).

## 1.7 Zielstellung der Arbeit

PKA und EPAC sind zwei Effektoren, die direkt durch cAMP aktiviert werden und deren Einfluss auf das Lernen und die Gedächtnisbildung näher untersucht werden soll.

Mit Hilfe genetischer Manipulationen, die gezielt die Expression der katalytischen Untereinheit von PKA herunterreguliert, soll der Einfluss verschiedener PKA Aktivitäten auf die Bildung unterschiedlicher olfaktorischer Gedächtniskomponenten (STM, MTM, ARM und ASM) untersucht werden. Des Weiteren wird ein besonderer Fokus auf die Lokalisation neuronaler Bereiche innerhalb des Gehirns gelegt, in denen PKA für die Ausbildung dieser olfaktorischen Gedächtniskomponenten benötigt wird. Neben PKA ist EPAC ein weiterer Effektor, der direkt durch cAMP aktiviert wird. Demnach stellt sich die Frage, inwiefern EPAC einen Einfluss auf die Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses besitzt und in welchen neuronalen Bereichen des Gehirns diese Funktion notwendig und/oder hinreichend ist. PKA und EPAC sind intrazellulär häufig an den gleichen biologischen Prozessen beteiligt, können entweder unabhängig voneinander, synergistisch oder entgegengesetzt agieren. Dementsprechend ist es sinnvoll, die gewonnenen Erkenntnisse nebeneinander liegend zu betrachten. Durch einen Vergleich ist es möglich, eine unterschiedliche oder gemeinsame Beteiligung bei der Bildung einzelner Gedächtniskomponenten zu identifizieren, wobei eine Lokalisation neuropiler Bereiche Aufschluss über eine räumliche Notwendigkeit dieser beiden Effektoren geben soll.

Tomosyn, das bei der Regulation der Neurotransmitterausschüttung und somit bei der synaptischen Plastizität eine wichtige Rolle einnimmt, wird nicht direkt durch cAMP aktiviert, gilt jedoch als ein Zielsubstrat der cAMP abhängigen PKA. Eine Beteiligung des cAMP/PKA Signalweges während der Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses ist bereits bekannt und verschiedene präsynaptische Proteine wie Synapsin, Munc13 und Rab3 zeigen einen Einfluss bei der Bildung von Gedächtnissen. Dies lässt vermuten, dass Tomosyn möglicherweise ein wichtiger Effektor der PKA-abhängigen Plastizität darstellt. Demzufolge soll in dieser Arbeit

die funktionelle Bedeutung von Tomosyn bei der Gedächtnisbildung untersucht werden. Dabei werden die einzelnen Gedächtniskomponenten, die eine Tomosyn bedingte Funktion benötigen, näher betrachtet werden, wobei auch hier eine neuronale Zuordnung innerhalb des Gehirns untersucht werden soll.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Fliegenhaltung

Die verschiedenen Fliegenstämme wurden bei einer Temperatur von 24°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% in einem 12:12 Tag/Nachtzyklus auf einem Maismehl basierendem Futter (Würzburg Rezept) aufgezogen und gehalten (Guo et al., 1996). Genetische Kreuzungen wurden nach Standardprozedur durchgeführt.

Kreuzungen, die ein RNAi-Konstrukt enthielten, wurden bei 30°C aufgezogen, um das RNAi-Konstrukt am effektivsten zu exprimieren. Kreuzungen, die einen Gal80<sup>ts</sup> Repressor (McGuire et al., 2003) enthielten, wurden bei einer zulässigen Temperatur von 18°C aufgezogen und 24 Stunden vor Beginn der Verhaltensexperimente auf 30°C gehalten, um den Gal80<sup>ts</sup> Repressor zu inaktivieren. Die Verhaltensexperimente wurden mit 1-4 Tage alten F1-Nachkommen aus homozygoten Parentallinien durchgeführt. Bei Kreuzungen, deren Parentale einen Balancer enthielten, wurden die F1-Nachkommen im Anschluss der Verhaltensexperimente gegen den jeweiligen Balancer selektiert. Je nach Experiment wurde für die Berechnung der Gedächtnisleistung entweder eine gemixte Population bestehend aus Männchen und Weibchen, oder nur Weibchen bzw. nur Männchen benutzt.

### 2.2 Genotypen

Je nachdem in welchem Wildtyphintergrund sich die jeweiligen Effektorstämme befanden, wurden für alle Verhaltensexperimente der Wildtyp Canton-S (CS) oder *white*<sup>1118</sup> (W1118) als Kontrollstamm benutzt. Die genetischen Linien wurden nicht in einen spezifischen genetischen Hintergrund gekreuzt.

Für die PKA Experimente wurden die drei homozygoten RNAi-Konstrukte UAS-PKA<sup>pWIZ</sup> (X), UAS-PKA<sup>ds</sup> (III) sowie eine Kombination aus beiden RNAi-Konstrukten, UAS-PKA<sup>pWIZ</sup>; UAS-PKA<sup>ds</sup> (X, III), verwendet. Diese Effektorlinien regulieren gezielt die Expression der katalytischen Untereinheit, *DCO*, in *Drosophila* durch RNA Interferenz herunter. Die Expression der UAS-PKA<sup>ds</sup> (UAS-PKA-C1-RNAi (v6993); Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC)) reduziert das PKA Transkript und das Protein Level um mindestens 70% (Efetova et al., 2013; Iijima-Ando et al., 2009). Das RNAi-Konstrukt UAS-PKA<sup>pWIZ</sup> wurde in unserem Labor basierend auf dem RNAi Vektor pWIZ kloniert. Dazu wurden die folgenden Primer verwendet: Vorwärts AGA GAG TCT AGA GCA GGG GCC CCT CGT GAG CA (62°C); Rückwärts AGA GAG TCT AGA GGT AGG GCA GCG AGA CGA GG (60°C).

Für die Experimente mit dem temperaturabhängigen GAL80<sup>ts</sup> Repressor wurde die Linie *elav;;tubGal80<sup>ts</sup>* benutzt, die mit dem doppelten RNAi-Konstrukt UAS-PKA<sup>PWIZ</sup>; UAS-PKA<sup>ds</sup> gekreuzt wurde. *TubGal80<sup>ts</sup>* ist bei einer restriktiven Temperatur (18°C) aktiv und unterdrückt die Expression des Transgens; ein Wechsel zur permissiven Temperatur (30°C) inaktiviert den GAL80<sup>ts</sup> Repressor und die Expression wird aktiviert. Als Kontrolle diente eine Gruppe von Fliegen, die bis zum Experiment konstant bei einer Temperatur von 18°C gehalten wurde. Dementsprechend blieb der GAL80<sup>ts</sup> Repressor aktiv und eine Expression des Transgens konnte nicht erfolgen. Die genetischen Kontrollen wurden mit dem Wildtypstamm CS verkreuzt. Bei allen Verhaltensexperimenten wurden sowohl männliche als auch weibliche F1-Nachkommen getestet; zur Berechnung der Gedächtnisleistung wurden jedoch aufgrund der genetischen Begebenheiten nur die Weibchen gewertet.

Für die Verhaltensanalyse von EPAC wurden die Mutanten *epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>* (II) und *epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ2</sup>* (II) verwendet. Diese Mutanten wurden in unserer Arbeitsgruppe mittels des FRT-derived deletion (FDD) Systems generiert (Efetova et al., 2013). Dabei handelt es sich um transkriptionelle Nullmutanten, die spezifisch für das *Drosophila epac* Gen (CG34392) sind. Das UAS-*epac RD<sup>+</sup>* (III) Transgen enthält eine wildtypspezifische cDNA der *epac RD* Isoform, die das Epac Protein unter Kontrolle einer UAS exprimiert (Efetova et al., 2013). Dieses Transgen wurde in den *epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>* Mutantenhintergrund gekreuzt (*epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>*; UAS-*epac RD<sup>+</sup>*/MKRS). Zusätzlich wurden die GAL4-Promotorlinien *elav* (III), eine panneural exprimierende Treiberlinie, und *mb247* (III), eine in den Kenyonzellen des Pilzkörpers exprimierende Treiberlinie, in den *epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>* Mutantenhintergrund (*epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>*; *mb247* und *epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>*; *elav*) gekreuzt, um dort das UAS-*epac RD<sup>+</sup>* gewebespezifisch exprimieren zu können (*epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>*; *mb247/UAS-epac RD<sup>+</sup>* und *epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>*; *elav/UAS-epac RD<sup>+</sup>*). Für die gezielte Herunterregulation des Epac Proteins wurde eine über den sichtbaren Balancer MKRS (III) markierte UAS-*epac RNAi* (III) verwendet. Genetische Kontrollen und GAL4-Linien wurden mit dem Wildtyp W1118 gekreuzt. Bei den Verhaltensexperimenten wurden alle Nachkommen der F1-Generation getestet, jedoch anschließend gegen den Balancer MKRS selektiert.

Für die Verhaltensexperimente mit Tomosyn wurden zwei RNAi-Konstrukte, UAS-*tomosyn RNAi<sup>2</sup>* (II) und UAS-*tomosyn RNAi<sup>3</sup>* (III) vom Vienna *Drosophila RNAi* Center (VDRC) verwendet. Die RNAi Transgene tragen eine UAS und beeinflussen das letzte Exon von *tomosyn*. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Janet E. Richmond wurde eine Tomosynmutante  $\Delta 924$  (X) generiert. Die Charakterisierung dieser Mutante auf Transkriptebene wird der-

zeit durchgeführt, ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Das UAS-*tomosyn*<sup>+</sup> (III) Transgen enthält eine tomosynspezifische cDNA, die das Tomosyn Protein unter Kontrolle einer UAS exprimiert. Dieses Transgen wurde in den Tomosynmutantenhintergrund ( $\Delta 924$ ; UAS-*tomosyn*<sup>+</sup>) gekreuzt. Da die Mutante auf dem X. Chromosom lokalisiert ist, wurden für die Verhaltensexperimente alle Nachkommen der F1-Generation getestet, jedoch nur die Männchen für die Berechnung der Gedächtnisleistung verwendet.

Für die gewebespezifische Expression der einzelnen Transgene entlang des olfaktorischen neuronalen Weges des *Drosophila* Gehirns wurden verschiedene GAL4-Promotorlinien verwendet (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten GAL4- Linien**

exprimiert in	Genotyp	Referenzen
Olfaktorische Rezeptorneurone	<i>white;OR83b</i> ; (II)	(Vosshall et al., 2000)
Lokale Interneurone im Antennallobus	<i>white;;GH298</i> (III) <i>white,NP2426</i> ; (X)	(Stocker et al., 1997) (Das et al., 2008)
Projektionsneurone	<i>white;GH146</i> ; (II) <i>white;NP225</i> ; (II)	(Stocker et al., 1997) (Tanaka et al., 2004)
APL Neuron	<i>white;NP2631</i> ; (II)	(Tanaka et al., 2008)
Pilzkörper $\alpha/\beta$ , $\alpha'/\beta'$ , $\gamma$ loben Pilzkörper $\alpha/\beta$ , $\gamma$ loben Pilzkörper $\alpha/\beta$ loben Pilzkörper $\gamma$ lobe Pilzkörper $\alpha'/\beta'$ lobe	<i>white;OK107</i> (IV) <i>white;;mb247</i> (III) <i>white;17d</i> ; (II) <i>white;c739</i> ; (II) <i>white;NP1131</i> ; (II) <i>white;c305a</i> ; (II)	(Connolly et al., 1996) (Connolly et al., 1996) (Zars et al., 2000) (Yang et al., 1995) (Tanaka et al., 2008) (Krashes et al., 2007)

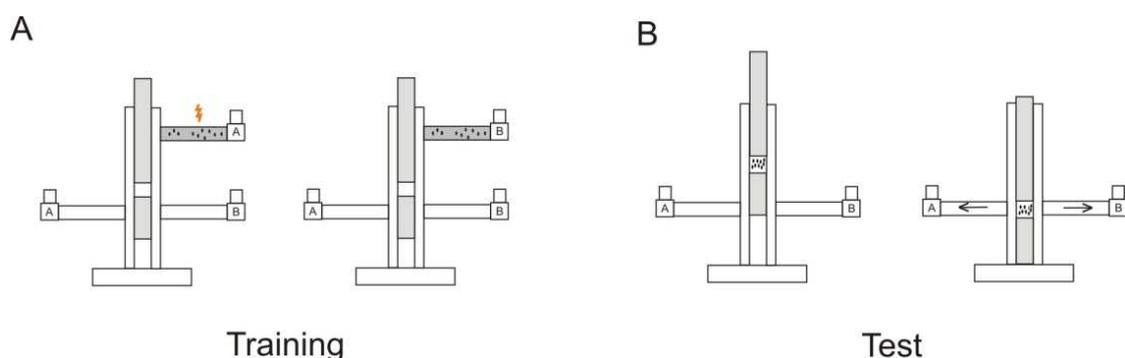
### 2.3 Olfaktorische Konditionierung

Die olfaktorische Konditionierung wurde nach der Standardprozedur durchgeführt (Tully and Quinn, 1985). Fliegen, die für die Verhaltensanalyse genutzt wurden, wurden mindestens 24 Stunden vor Beginn der Experimente auf frische Futtergläser überführt. Die Verhaltensexperimente erfolgten unter Rotlicht bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80% und einer Temperatur von ungefähr 24°C. Für die olfaktorische Konditionierung wurden die Düfte 4-Methylcyclohexanol (Mch; 1/100 in Mineralöl verdünnt; Sigma Aldrich) und 3-Octanol (Oct;

1/150 in Mineralöl verdünnt; Sigma Aldrich) verwendet. Der US wurde in einer Abfolge von 12 elektrischen Stromimpulsen mit einer Stärke von 120 Volt und einer Dauer von 1,3 Sekunden in einem Abstand von 3,6 Sekunden gegeben. Während der Experimente wurden jeweils zwei Gruppen bestehend aus ungefähr 80 bis 100 Fliegen parallel trainiert. Die eine Gruppe erhielt für eine Dauer von 60 Sekunden den Duft, Mch, ( $CS^+$ ) in Kombination mit den elektrischen Stromimpulsen (US), gefolgt von einer 30 sekündigen Pause, in der frische Luft dargeboten wurde. Im Anschluss wurde ihnen der zweite Duft, Oct, ( $CS^-$ ) für weitere 60 Sekunden ohne elektrische Stromimpulse präsentiert. Die andere Gruppe wurde simultan mit umgekehrten Düften trainiert, so dass dort der Duft Oct als  $CS^+$  fungierte, um eine duftspezifische Beeinflussung ausschließen zu können. Nach dem Training wurden die Fliegen in einer T-Maze Apparatur getestet, wobei beide Düfte simultan präsentiert wurden. Während einer Dauer von 30 Sekunden, konnten sich die Fliegen bei vollkommender Dunkelheit für einen der dargebotenen Düfte entscheiden (Abb. 6). Daraus ergab sich ein Performanceindex (PI), der aus der Präferenz der beiden reziprok trainierten Gruppen berechnet wurde:

$$PI = \left[ \left\{ \frac{(\text{Oct}^- - \text{Mch}^+)}{(\text{Oct}^- + \text{Mch}^+)} * 100 \right\} + \left\{ \frac{(\text{Mch}^- - \text{Oct}^+)}{(\text{Mch}^- + \text{Oct}^+)} * 100 \right\} \right] / 2.$$

Für die Analyse der STM Gedächtnisleistung wurden die Fliegen genau 3 Minuten nach dem erfolgten Training getestet. Das MTM wurde nach 3 Stunden getestet, wobei die Fliegen direkt nach dem Training in kleine luftdurchlässige Aufbewahrungsgläser überführt wurden und dort unter experimentellen Bedingungen bis zum Testzeitpunkt aufbewahrt wurden.



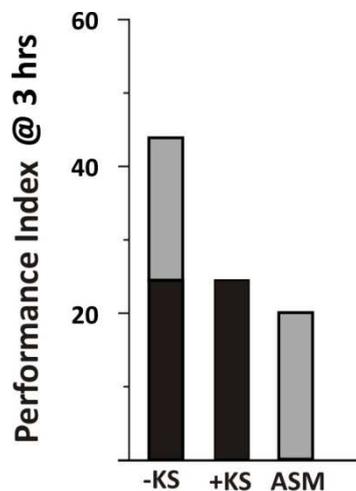
**Abbildung 6: Schematische Darstellung der aversiven olfaktorischen Konditionierung.** (A) Die Fliegen wurden in einem kupferummantelten Schockröhrchen trainiert. Dies geschah durch eine Kombination aus 12 aufeinanderfolgenden elektrischer Impulsen (US) gepaart mit einem Duft A ( $CS^+$ ) für eine Dauer von 60 Sekunden. Nach einer Dauer von 30 Sekunden, in denen die Fliegen frische Luft zugeführt bekamen, wurde ihnen für weitere 60 Sekunden ein Duft B ( $CS^-$ ) präsentiert. Simultan zu dieser Trainingsgruppe wurde eine weitere Gruppe reziprok trainiert d.h. Duft B diente als  $CS^+$  und Duft A, als  $CS^-$ . (B) Die Fliegen wurden je nachdem welche Gedächtniskomponente untersucht werden sollte, entweder unmittelbar nach dem Training (STM) oder nach 3 Stunden (MTM) getestet. Dazu konnten sie sich bei kompletter Dunkelheit für 30 Sekunden zwischen dem Duft A und dem Duft B entscheiden.

## 2.4 Anästhesie-resistentes Gedächtnis (ARM)

Für die Analyse des Anästhesie-resistenten Gedächtnisses wurden die trainierten Fliegen 2,5 Stunden nach dem Training in vorgekühlte Aufbewahrungsgläser überführt und für 90 Sekunden in ein mit Eiswürfeln enthaltenes Wasserbad gestellt. Innerhalb von 15 Sekunden wurden die Fliegen durch den Kälteschock betäubt. Im Anschluss wurden die Fliegen zurück in ihre alten Aufbewahrungsgläser überführt und konnten sich für die restliche Zeit bis zum Testen (30 Minuten) erholen.

## 2.5 Anästhesie-sensitives Gedächtnis (ASM)

Um das Anästhesie-sensitive Gedächtnis berechnen zu können, wurden zwei Gruppen separat trainiert, eine Gruppe erhielt einen Kälteschock ( $KS^+$ , ARM), während die andere Gruppe ohne Kälteschock getestet wurde ( $KS^-$ , MTM). Das Anästhesie-sensitive Gedächtnis ist ein Bestandteil des MTM und empfindlich gegenüber der Betäubung durch einen Kälteschock. Es handelt sich also um einen berechneten Wert, der sich aus der Gedächtnisleistung des MTM und der Gedächtnisleistung des ARM ergibt: ( $PI^{ASM} = PI^{MTM} - PI^{ARM}$ ).



**Abbildung 7: Dissoziation des Mittelzeitgedächtnisses (MTM) in Anästhesie-resistentes Gedächtnis (ARM) und Anästhesie-sensitives Gedächtnis (ASM).** Das Mittelzeitgedächtnis, welches 3 Stunden nach dem Training getestet wird, besteht aus der Anästhesie-resistenten Komponente ARM, die mittels eines Kälteschocks von der Anästhesie-sensitiven Komponente ASM getrennt werden kann. Die Berechnung des ASM erfolgt durch die Verrechnung der Gedächtnisleistung des MTM mit der Gedächtnisleistung des ARM.

## 2.6 Test auf Reaktionsfähigkeit (Duftvermeidung, Schockvermeidung)

Fliegen, die in allen untersuchten Gedächtniskomponenten einen Effekt aufwiesen, wurden auf ihre Reaktionsfähigkeit bezüglich ihrer Duftwahrnehmung (DV, Duft-Vermeidung) und ihrer Schockwahrnehmung (SV, Schock-Vermeidung) getestet.

Um die Duftwahrnehmung zu testen, konnten sich die Fliegen innerhalb einer Minute in der T-Maze Apparatur zwischen einer Seite, die einen der beiden für die Konditionierung verwendeten Düfte, Mch oder Oct, enthielt und einer duftlosen Seite entscheiden. Für die Berechnung wurde die Anzahl der Fliegen, die die duftbehaftete Seite gewählt haben mit der Anzahl der Fliegen, die sich für die duftlose Seite entschieden haben, verrechnet:

$$DV = \{(N^- - N^+) / (N^- + N^+)\} * 100.$$

Um die Fähigkeit der Schockwahrnehmung zu testen, konnten sich die Fliegen für eine Dauer von einer Minute in der T-Maze Apparatur zwischen einer elektrisch geladenen Seite (120V; 12 Impulse in der Minute) und einer nicht elektrisch geladenen Seite entscheiden. Für die Berechnung wurde die Anzahl der Fliegen der geschockten Seite ( $N^+$ ) mit der Anzahl der Fliegen, die sich für die nicht elektrisch geladene Seite ( $N^-$ ) entschieden, verrechnet:

$$SV = \{(N^- - N^+) / (N^- + N^+)\} * 100.$$

## 2.7 Bestimmung der PKA Aktivität

Für die Bestimmung der PKA Aktivität wurden die Kopfhomogenate von 3-5 Tage alten weiblichen Fliegen genommen, die eines der drei PKA RNAi-Konstrukte unter Kontrolle eines panneuralen *elav-GAL4* Treibers exprimierten. Als genetische Kontrollen wurden die RNAi-Konstrukte mit CS verkreuzt. Die PKA Aktivität wurde mit Hilfe eines Phosphorylierungsassays in Anwesenheit von überschüssigen cAMP bestimmt (PepTag; Non-Radioactive cAMP dependent Protein Kinase Assay System, Promega, USA). Diese Experimente wurden von Dr. Marina Efetova durchgeführt.

## 2.8 Immunhistochemie

Für die Analyse der Funktionalität der verwendeten *Tomosyn*-spezifischen RNAi-Transgene, *UAS-tomosyn RNAi<sup>2</sup>* und *UAS-tomosyn RNAi<sup>3</sup>*, wurden neuromuskuläre Verbindungen (NMJs) der Muskeln 6 und 7 von Larven im 3ten Larvenstadium mit einem Antikörper gegen *Tomosyn* (Verdünnung 1: 2000) markiert. Anti-*Tomosyn* wurde in Kaninchen gegen ein synthetisches Peptid, welches die Aminosäuren 25-44 des *Drosophila Tomosyn* umfasste, erzeugt. Die Immunreaktivität wurde durch einen FITC- und TRITC-konjugierten Ziegen anti-

Kaninchen sekundären Antikörper (Verdünnung 1: 500, Jackson Immunoresearch Laboratories) visualisiert. Der fluoreszenz-konjugierte anti-HRP Antikörper (Jackson Immunoresearch Laboratories) wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Die konfokalen Aufnahmen wurden mit dem Olympus Fluoview FV500 Laserscanner-Konfokal-System erfasst und die Quantifizierung der Farbintensität erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ durch einen Vergleich der Pixelintensität einzelner Regionen (Chen et al., 2010). Diese Experimente wurden von Kaiyun Chen durchgeführt (Chen and Richlitzki et al., 2011).

## 2.9 Quantitative Real Time-PCR

Die gesamte mRNA von adulten Fliegen wurde durch eine Trizol (Invitrogen) Extraktion isoliert. Im Anschluss darauf wurde mit Hilfe des TURBO-DNAFree Kits (Ambion) die genomische DNA entfernt. 1µg aufgereinigte mRNA wurde für die reverse Transkription verwendet, die mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) und mit Oligo(dT)-Primer durchgeführt wurde. Die RT-PCR erfolgte mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen und die Quantifizierung des SYBR grün markierten PCR-Produkts wurde mit einem MJResearch Opticon2 real-time Thermocycler durchgeführt. Als Referenz wurde Aktin verwendet, um einen relativen Mengen-Vergleich durchzuführen. Der *Tomosyn* CT-Wert (Cycle Threshold), der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant ansteigt, wurde auf den CT-Wert von Aktin normalisiert. Diese Befunde wurden in Bezug zum Wildtyp gesetzt, um die relative Menge der *Tomosyn* mRNA bestimmen zu können. Diese Experimente wurden von Kaiyun Chen durchgeführt (Chen and Richlitzki et al., 2011).

## 2.10 Statistik

Die Gedächtnisleistung der verschiedenen Genotypen wurde mit einer Ein-Wege-ANOVA untereinander verglichen. Statistische Unterschiede wurden durch einen LSD post hoc Test bestimmt. Das Signifikanzniveau betrug bei jedem Experiment  $P < 0.05$ . Die Signifikanzen wurden durch Buchstaben (a, b, c, d) gekennzeichnet. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics 21.

Die Rohdaten wurden mit Excel und mit dem Programm Grafit bearbeitet. Die graphischen Abbildungen wurden mit dem Programm Corel Draw Graphics Suite 12 erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 PKA und EPAC, zwei unterschiedliche cAMP Sensoren und ihr Einfluss auf die Gedächtnisbildung bei *Drosophila melanogaster*

PKA und EPAC sind zwei Effektoren, die direkt durch cAMP aktiviert werden und eine Vielzahl biologischer Prozesse regulieren. Die Gedächtnisbildung bei *Drosophila* wird durch eine cAMP vermittelte Aktivierung von PKA reguliert (Drain et al., 1991; Goodwin et al., 1997; Horiuchi et al., 2008; Li et al., 1996; Skoulakis et al., 1993), jedoch sind die zellulären cAMP Signale als auch die Aktivität der stromabwärts gelegenen PKA während des Lernprozesses und bei der Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses ungenügend verstanden. Die Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses hängt von der intrazellulären PKA Aktivität ab und offensichtlich scheint es bestimmte Aktivitätsschwellenwerte zu geben, die die einzelnen Gedächtniskomponenten entweder positiv oder negativ beeinflussen können (Horiuchi et al., 2008; Skoulakis et al., 1993; Yamazaki et al., 2010). Doch welche intrazelluläre PKA Aktivität wird für die Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten benötigt und in welchen neuronalen Strukturen des olfaktorischen Signalweges besitzt PKA eine funktionelle Bedeutung?

Neben PKA ist EPAC ein weiteres Protein, welches durch cAMP aktiviert wird. Inwiefern dieses Protein einen Einfluss auf die Gedächtnisbildung besitzt, ist bisher wenig untersucht worden. Auch hier stellt sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung EPACs bei der Gedächtnisbildung. Welche Gedächtniskomponenten werden durch EPAC beeinflusst und in welchen neuronalen Strukturen ist eine Funktion von EPAC für die Bildung dieser erforderlich? Mit Hilfe genetischer Manipulationen und dem olfaktorischen aversiven Konditionierungsparadigma ist es möglich, den Einfluss beider Effektoren auf die Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten (STM, MTM, ARM und ASM) zu untersuchen.

#### 3.1.1 Eine graduelle Degradation der *DCO* Untereinheit von PKA führt zu einem progressiven Verlust des PKA Signals

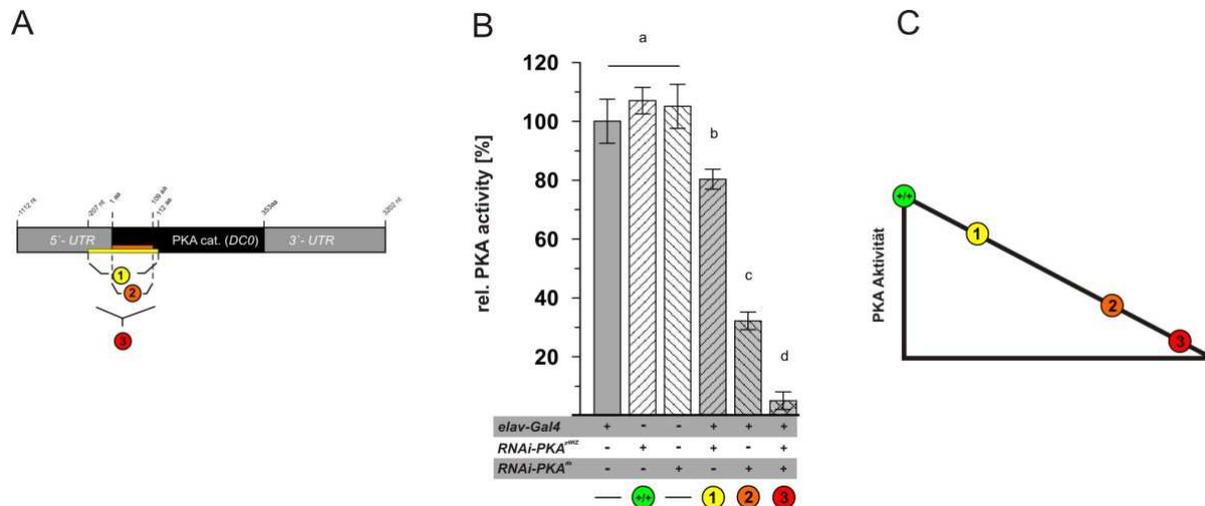
Mehrere Arbeiten an *Drosophila* PKA Mutanten deuten darauf hin, dass die Bildung verschiedener Gedächtniskomponenten von der intrazellulären PKA Aktivität abhängig ist (Drain et al., 1991; Horiuchi et al., 2008; Li et al., 1996; Skoulakis et al., 1993; Yamazaki et al., 2007). Bisherige Arbeiten verwendeten Proteinkinase Inhibitoren oder hypomorphen Mutanten, die eine defekte katalytische Untereinheit exprimierten, um so die intrazellulären PKA Aktivität im gesamten Organismus zu modulieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass PKA je nach verbliebener Aktivität verschieden starke Auswirkungen auf die Gedächtnisleistung be-

sitzt. Eine geringe Reduktion der PKA Aktivität ruft moderate Effekte hervor, während eine stärkere Reduktion die Bildung mehrerer Gedächtniskomponenten beeinflusst (Horiuchi et al., 2008; Li et al., 1996; Skoulakis et al., 1993). Die Verwendung einer MB-spezifischen Mutante konnte bereits eine Funktion von PKA innerhalb der MBs aufzeigen (Skoulakis et al., 1993). Jedoch kann die Arbeit mit Mutanten nur einen generellen Einblick über den Einfluss einer modulierten PKA Aktivität bei der Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses geben. Demzufolge stellt sich noch immer die Frage, welche intrazelluläre PKA Aktivität für die Bildung welcher Gedächtniskomponente benötigt wird und in welchen neuronalen Strukturen besitzt PKA eine funktionelle Bedeutung bei der Bildung dieser Komponenten.

Eine Möglichkeit die PKA Aktivität zu modulieren, besteht darin, die Expression des Proteins und somit dessen Aktivität durch einen RNAi Ansatz negativ zu beeinflussen. Dabei bietet das GAL4/UAS-System den großen Vorteil, die Aktivität von PKA gezielt in spezifischen Geweben herunterzuregulieren (Brand and Dormand, 1995). Somit kann PKA panneural oder in den einzelnen Geweben des olfaktorischen Systems manipuliert werden, um dessen funktionellen Einfluss bei der Bildung der spezifischen Gedächtniskomponenten zu analysieren.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene RNAi-Konstrukte verwendet, die gezielt die Expression der katalytischen PKA Untereinheit am *DC0* Locus (Kalderon and Rubin, 1988) herunterregulieren. Beide Konstrukte betreffen verschiedene Sequenzen des *DC0* Locus. Die einzelnen Konstrukte wurden als Manipulation 1. Ordnung (UAS-PKA<sup>pwiz</sup>), 2. Ordnung (UAS-PKA<sup>ds</sup>) oder 3. Ordnung (eine Kombination aus beiden RNAi Konstrukten UAS-PKA<sup>pwiz</sup>;UAS-PKA<sup>ds</sup>) definiert, je nachdem welches Transgen exprimiert wurde (Abb. 8A). Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass in Anwesenheit eines gesättigten cAMP-Niveaus eine enge Korrelation zwischen der Aktivität des *DC0* Gens und der in Fliegenextrakten gemessenen PKA Aktivität besteht (Lane and Kalderon, 1993). Daher wurde zunächst die PKA Aktivität in Kopfhomogenaten von Fliegen, die eines der drei PKA RNAi-Konstrukte unter Kontrolle eines panneuralen *elav*-GAL4 Treibers exprimierten, bei einer gesättigten cAMP-Konzentration bestimmt (Abb. 8B). Dabei zeigte sich eine graduelle Reduktion der PKA Aktivität in Abhängigkeit des jeweiligen mit *elav*-GAL4 getriebenen Transgens. Eine Manipulation 1. Ordnung zeigte verglichen mit der wildtypischen PKA Aktivität eine 20%ige Reduktion, die Manipulation 2. Ordnung wies eine 70%ige Reduktion auf und die Manipulation 3. Ordnung führte zu einer nahezu kompletten Abnahme der PKA Aktivität (über 90%). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die verwendeten RNAi Transgene das Potential besitzen, die zelluläre PKA Aktivität auf eine graduelle Weise zu reduzieren

(Abb. 8B,C). Somit konnten diese Transgene im Weiteren verwendet werden, um den Einfluss verschiedener PKA Aktivitäten auf die Gedächtnisbildung zu untersuchen.

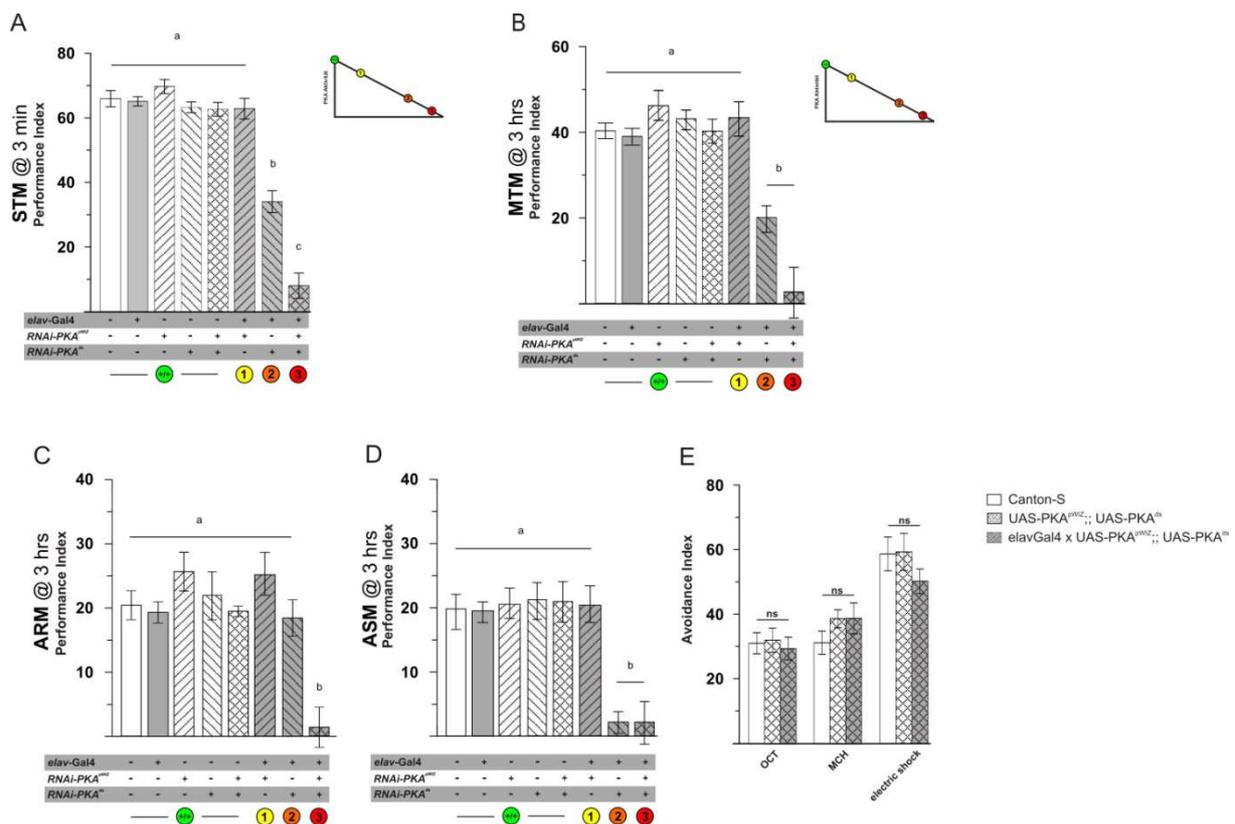


**Abbildung 8: Eine gezielte Degradation der DC0 Untereinheit von PKA führt zu einer graduellen Reduktion der PKA Aktivität.** Es wurden verschiedene RNAi-Konstrukte verwendet, die gezielt die Expression der katalytischen Untereinheit von PKA herunterregulieren. (A) Die schematische Darstellung der DC0 cDNA zeigt die Sequenzen der verwendeten RNAi-Konstrukte. Diese Konstrukte wurden als Manipulation 1. Ordnung, 2. Ordnung und 3. Ordnung definiert, je nachdem welches Transgen exprimiert wurde d.h. PKA<sup>PWIZ</sup> (1, gelb); PKA<sup>ds</sup> (2, orange) oder eine Kombination beider Transgene PKA<sup>PWIZ</sup>;PKA<sup>ds</sup> (3, rot). (B) Die in den Kopfhomogenaten gemessene relative PKA Aktivität der einzelnen RNAi-Transgene unter der Kontrolle einer neuronenspezifischen *elav*-GAL4 Treiberlinie nahm, je nachdem welches RNAi Transgene verwendet wurde, graduell ab. Die Manipulation 1. Ordnung rief eine geringe Reduktion hervor und eine Manipulation 3. Ordnung zeigte die stärksten Auswirkungen auf die intrazelluläre PKA Aktivität. Die genetischen Kontrollen zeigten keine Reduktion in ihrer PKA Aktivität. (C) Die schematische Darstellung der gemessenen PKA Aktivität verdeutlicht die graduelle Reduktion der PKA Aktivität in Abhängigkeit der einzelnen Manipulationen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=7-8. Es wurden für diese Experimente nur Weibchen gewertet. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p \leq 0.001$  an.

Auf der Verhaltens Ebene führte eine graduelle Reduktion der PKA Aktivität zu einer Beeinträchtigung mehrerer Gedächtniskomponenten, die sich in ihren Sensitivitäten gegenüber der vorhandenen PKA Aktivität unterschieden. Während beim STM (Abb. 9A) und beim MTM (Abb. 9B) die Manipulation 1. Ordnung keine Beeinflussung der Gedächtnisleistung erkennen ließ, zeigte die Manipulation 2. und 3. Ordnung eine kontinuierliche Reduktion der Gedächtnisleistung in Korrelation zur vorhandenen PKA Aktivität. Das MTM besteht aus zwei koexistierenden Gedächtniskomponenten, dem stabilen ARM und dem labilen ASM, welche mittels eines Kälteschocks voneinander getrennt werden können (Quinn and Dudai, 1976; Scheunemann et al., 2012; Tempel et al., 1983). Diese beiden Gedächtniskomponenten reagierten unterschiedlich auf die einzelnen PKA-Manipulationen. Während die Manipulation 2. Ordnung zu einem kompletten Verlust des labilen ASM führte (Abb. 9D), zeigte die Manipu-

lation 3. Ordnung einen kompletten Verlust beider Komponenten des MTM, des stabilen ARM (Abb. 9C) und des labilen ASM (Abb. 9D). Im Vergleich zu einer graduellen Beeinträchtigung der STM Gedächtnisleistung wurde das ARM und das ASM in einem „Alles oder Nichts“ Prinzip beeinflusst.

Die Manipulation der 3. Ordnung führte bei einer panneuralen Herunterregulation von PKA zu einer Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung aller untersuchten Gedächtniskomponenten. Aus diesem Grund wurden die Fliegen, die das Transgen der 3. Ordnung unter Kontrolle des *elav*-GAL4 Treibers exprimierten, auf ihre sensorischen Eigenschaften hin getestet, da diese möglicherweise durch eine starke Herunterregulierung von PKA beeinträchtigt worden sein könnten. Eine Analyse in der Duft- und in der Schockwahrnehmung zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen den genetischen Kontrollen und der Manipulation 3. Ordnung, was auf eine normale Verarbeitung der sensorischen Reize hindeutet (Abb. 9E).



**Abbildung 9: Eine graduelle Herunterregulation der *DC0* Untereinheit von PKA führt zu einer aktivitätsabhängigen Beeinträchtigung mehrerer Gedächtniskomponenten.** Die gezielte Degradation der katalytischen Untereinheit von PKA durch verschiedene RNAi Transgene führte zu einer graduellen oder zu einer stufenartigen Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung, je nachdem welche Gedächtniskomponente betroffen war. Verschiedene Gedächtniskomponente (STM, MTM, ARM, ASM) werden während der olfaktorischen Konditionierung initiiert. Das STM ist direkt nach dem Training vorhanden, während das MTM nach 3 Stunden gemessen wird. ARM und ASM sind Bestandteile des MTM, unterscheiden sich jedoch in ihrer Stabilität gegenüber einer Kälteschockbehandlung. (A) Die progressive Herunterregulation führte zu einer graduellen Reduktion der STM Gedächtnisleistung in Korrelation zu der gemessenen PKA Aktivität der einzelnen RNAi Transgene. Die

genetischen Kontrollen zeigten eine wildtypische Gedächtnisleistung. **(B)** Die MTM Gedächtnisleistung nahm je nach exprimierten RNAi Transgen ebenfalls graduell ab. **(C)** Das ARM ist eines der Bestandteile des MTM und zeigte nur bei dem Transgen der 3. Ordnung einen kompletten Verlust der Gedächtnisleistung. Die genetischen Kontrollen zeigten eine wildtypische Gedächtnisleistung. **(D)** Das ASM wurde bei der Manipulation 1. Ordnung (1) und den genetischen Kontrollen wildtypisch ausgebildet. Bei den RNAi Transgenen 2. Ordnung (2) und 3. Ordnung (3) führte eine Reduktion der PKA Aktivität zu einem stufenartigen Verlust der ASM Gedächtnisleistung. **(E)** Bei der Reaktionsfähigkeit bezüglich der Duft- und der Schockwahrnehmung konnten zwischen den genetischen Kontrollen und des mit *elav*-GAL4 getriebenen Transgens der 3. Ordnung keine Unterschiede festgestellt werden (OCT, 3-Octanol; MCH, 4-Methylcyclohexanol). Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n \geq 8$ . Es wurden für diese Experimente nur Weibchen gewertet. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p \leq 0.001$  an.

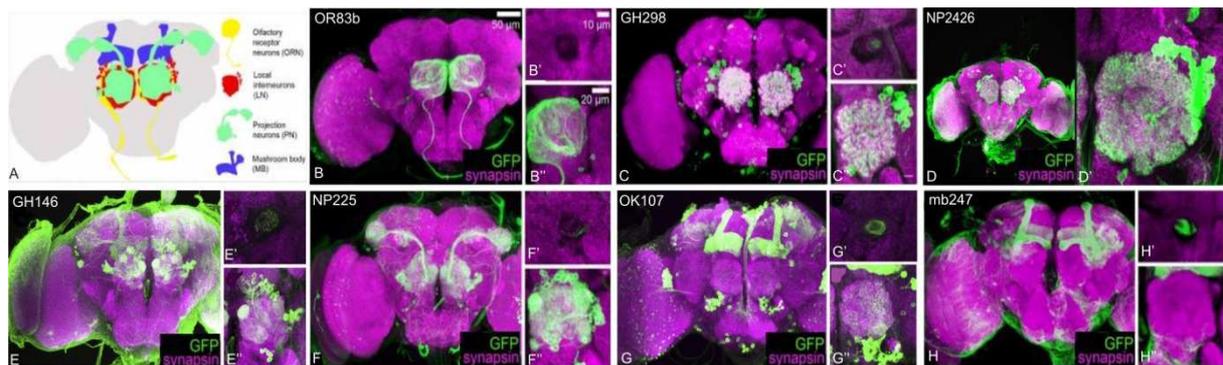
Diese Ergebnisse zeigen einen aktivitätsabhängigen Einfluss von PKA während der Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten. Die Manipulation 1. Ordnung, welche eine geringe Reduktion der PKA Aktivität hervorruft, zeigt keine Beeinträchtigung bei der Gedächtnisbildung. Die Manipulation 2. Ordnung reduziert die PKA Aktivität um  $\sim 70\%$  und führt zu einer starken Beeinflussung der STM Gedächtnisleistung und zu einem Verlust des labilen ASM, wobei das stabile ARM erhalten bleibt. Eine weitere Reduktion der PKA Aktivität auf  $<10\%$  der wildtypischen PKA Aktivität durch die Manipulation der 3. Ordnung, führt zu einem kompletten Verlust aller Gedächtniskomponenten (STM, MTM, ARM, ASM) ohne die Verarbeitung der sensorischen Reize negativ zu beeinflussen.

Demnach scheinen die einzelnen Gedächtniskomponenten auf der Ebene der intrazellulären PKA Aktivität voneinander dissoziiert zu sein. Doch in welchen neuronalen Strukturen ist eine Aktivität von PKA für die Ausbildung der unterschiedlichen Gedächtniskomponenten notwendig? Um diese zu identifizieren, wurde die Manipulation der 3. Ordnung verwendet, da diese die PKA Aktivität am effektivsten herunterreguliert.

### **3.1.2 Eine geringe PKA Aktivität beeinflusst mehrere Ebenen des olfaktorischen Signalweges: LNs, PNs und KCs**

Olfaktorische Informationen über die umgebene Umwelt werden durch neuronale Aktivitäten innerhalb eines olfaktorischen Weges repräsentiert (Abb. 10A). In *Drosophila* folgt dieser Weg einem stereotypen Muster analog zum Riechkolben der Säugetiere (Vosshall and Stocker, 2007; Wilson, 2013). Die Düfte werden von den olfaktorischen Rezeptoren in den Antennen aufgenommen und durch die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs) in die Glomeruli der Antennalloben (ALs) projiziert. Durch lokale Interneurone (LNs) und Projektionsneurone (PNs) werden die olfaktorischen Informationen verrechnet und an höhere Verarbeitungsstrukturen, wie den Pilzkörpern (MBs) und dem lateralen Horn, weitergeleitet (Sachse et al., 2007). Um zu bestimmen in welchen neuronalen Strukturen des olfaktorischen Systems PKA für die Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten benötigt wird, wurden verschie-

dene GAL4-Linien verwendet, die gewebespezifisch das Transgen 3. Ordnung in den einzelnen Neuropilen exprimieren, d.h. *OR83b* treibt die Expression in den ORNs, *GH298* und *NP2426* in den GABAergen LNs des Als, *GHI46* in den PNs und die *OK107* in den Kenyonzellen (KCs) der MBs. Eine detaillierte Übersicht der Expressionsmuster der verwendeten GAL4-Linien ist in Abbildung 10 B-H dargestellt.



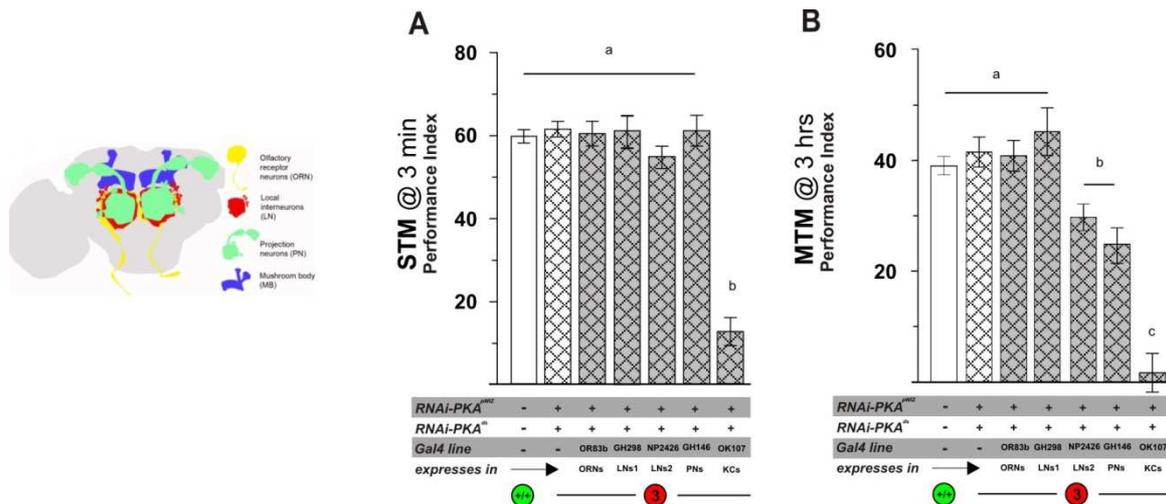
**Abbildung 10: Immunohistologische Darstellung der verwendeten Gal4-Linien, die den olfaktorischen Pfad markieren.** Die für die verschiedenen Gehirnregionen des olfaktorischen Pfades spezifischen GAL4-Linien wurden mit UAS-mCD8::GFP verkreuzt und gegen anti-GFP (grün) und anti-Synapsin (magenta) doppelt angefärbt. Jedes Hauptfeld zeigt eine frontale Darstellung des Expressionsmusters der GAL4-Linien auf der z-Ebene. Die kleineren Felder fokussieren auf den Pedunculus (oben) und den Antennallobus (unten). (A) Schematische Übersicht des olfaktorischen Pfades: Die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN, gelb) übertragen die Duftinformation zum Antennallobus (AL), der durch GABAerge oder cholinerge lokale Interneurone (LNs, rot) innerviert wird. Die Projektionsneurone (PN, grün) leiten die Duftinformation zu höheren Gehirnbereichen, der Kalyx der Pilzkörper (MBs, blau) und dem lateralen Horn, weiter. (B) Die GAL4-Linie *OR83b* zeigt eine spezifische Färbung in den ORNs. (C)+(D) Die GAL4-Linien *GH298* und *NP2426* zeigen eine Färbung in den GABAergen LNs der ALs, wobei die *GH298* zudem eine leichte Färbung in der Mitte des Pedunculus aufweist. (E)+(F) Die *GHI46* und die *NP225* markieren ~2/3 der PNs. (G)+(H) Die GAL4-Linien *OK107* und *mb247* zeigen eine vergleichbare Expression in den intrinsischen Kenyonzellen (KCs) der MBs. Die *OK107* markiert jedoch neben den KCs auch ~103 LNs der ALs. Quelle adaptiert von (Scheunemann et al., 2012; Volders et al., 2012).

Eine Herunterregulation der PKA Aktivität in den für die einzelnen Gehirnbereiche spezifischen GAL4-Linien ließ eine unterschiedliche funktionelle PKA Anforderung bei der Bildung des STM und des MTM in den einzelnen olfaktorischen Neuropilen erkennen (Abb. 11). Die STM Gedächtnisleistung zeigte bei einer Manipulation der 3. Ordnung in den KCs der MBs, durch die GAL4-Linie *OK107*, eine signifikante Reduktion (Abb. 11A), während die Herunterregulation von PKA auf der Ebene der ORNs, LNs oder PNs keine Beeinträchtigung bei der Bildung des STM erkennen ließ. Dieses Ergebnis deutet entweder darauf hin, dass PKA Signale in diesen Strukturen bei der Bildung des STM nicht benötigt werden, oder dass die Effektivität der Manipulation nicht ausreichte, um die PKA Menge adäquat zu reduzieren (Abb. 11A).

Dementgegen zeigte sich beim MTM eine Reduktion der Gedächtnisleistung auf mehreren Ebenen des olfaktorischen Pfades, d.h. auf der Ebene der LNs durch die Linie *NP2426*, auf der Ebene der PNs durch die Linie *GHI46* und auf der Ebene der KCs durch die Linie *OK107* (Abb. 11B).

Auf der Ebene der LNs wurden zwei verschiedene GAL4-Linien verwendet, die *GH289* und die *NP2426*. Beide Linien markieren GABAerge LNs, lassen sich jedoch unter anderem aufgrund ihrer charakteristischen Expression innerhalb der ALs in zwei unterschiedliche Gruppen einteilen; hier als LNs1 und LNs2 bezeichnet (Abb. 10C+10D). Die Somata der LNs sind in zwei unterschiedliche Zellpopulationen lokalisiert; eine Zellpopulation befindet sich dorsolateral zum AL, während die andere ventral gelegen ist. Die *GH289* (LNs1) markiert ~28 LNs, deren Somata im dorsolaterale Bereich liegen (Chou et al., 2010). Ihre Dendriten innervieren einen Großteil der Glomeruli, wobei sie in die Kernregion der Glomeruli terminieren. Diese Kernregion besitzt keine synaptische Konnektivität zu den Axonen der ORNs. Demzufolge erhalten die von der *GH298* markierten LNs keinen direkten Zugang zu den ORNs (Tanaka et al., 2012). Die *NP2426* (LNs2) markiert ~37 LNs, deren Somata im dorsolateralen und im ventralen Cluster liegen (Okada et al., 2009; Sachse et al., 2007; Tanaka et al., 2012). Diese LNs innervieren die gesamten Glomeruli des ALs, wobei ihre Dendriten sowohl in die Kernregion als auch in den peripheren Bereich der Glomeruli terminieren (Tanaka et al., 2012). Dort gehen sie extensive synaptische Verbindungen mit den PNs und den ORNs ein (Tanaka et al., 2009).

Bei einer Manipulation der 3. Ordnung auf der Ebene der LNs zeigte nur die GAL4-Linie *NP2426* (LNs2) eine Reduktion der Gedächtnisleistung des MTM (Abb. 11B), während die *GH298* keine Beeinträchtigung erkennen ließ. Dies könnte darauf hindeuten, dass PKA Signale innerhalb der LNs sehr spezifisch für die Bildung des MTM benötigt werden, folglich nur in den LNs, deren Somata im ventralen Cluster liegen und/oder deren Dendriten in den peripheren Bereich der Glomeruli terminieren. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch die Gal4-Linie *OK107*, die neben einer Expression in den KCs der MBs eine Expression in ~103 LNs des ventralen Clusters besitzt (Chou et al., 2010). Ob diese LNs ebenfalls in den peripheren Bereich der Glomeruli terminieren, ist nicht bekannt.



**Abbildung 11: PKA Signale werden in unterschiedlichen Strukturen des olfaktorischen Systems benötigt.** Die Manipulation 3. Ordnung wurde verwendet, um den durch eine geringe PKA Aktivität hervorgerufenen Verhaltenseffekt im STM und im MTM näher zu lokalisieren. Dabei wurden verschiedene GAL4-Linien verwendet, die spezifisch in den einzelnen Neuropilen des olfaktorischen Pfades (ORNs, LNs, PNs und KCs) exprimieren. **(A)** Eine Manipulation 3. Ordnung in den verschiedenen Neuropilen entlang des olfaktorischen Weges zeigte eine Beeinträchtigung der STM Gedächtnisleistung auf der Ebene der KCs der Pilzkörper (*OK107*). Auf Ebene der ORNs, LNs und PNs konnte keine Beeinträchtigung der STM Gedächtnisleistung beobachtet werden. **(B)** Das MTM wurde bei einer Manipulation 3. Ordnung auf der Ebene der PNs (*GH146*), der LNs2 (*NP2426*) und der KCs (*OK107*) beeinträchtigt. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7-10. Es wurden für diese Experimente nur Weibchen gewertet. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p \leq 0.001$  an.

Diese Ergebnisse zeigen, dass PKA Signale auf der Ebene der KCs für die Bildung unterschiedlicher Gedächtniskomponenten, sowohl STM als auch MTM, benötigt werden. Für die Bildung des MTM werden jedoch nicht nur PKA Signale in den KCs benötigt, sondern auch in anderen Neuropilen, in den LNs und in den PNs. Dies lässt auf eine differenzierte PKA Beteiligung innerhalb der einzelnen Neuropile bei der Bildung des STM und des MTM schließen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden zusätzliche GAL4-Linien verwendet, die den olfaktorischen Pfad markieren und eine präzisere Analyse der Funktion von PKA bei der Bildung der unterschiedlichen Gedächtniskomponenten erlauben. Im Folgenden wurde zunächst der Einfluß von PKA bei der Bildung des MTM in den LNs und den PNs näher analysiert.

### 3.1.3 Die olfaktorischen LNs und die PNs sind an der Bildung des stabilen ARM beteiligt

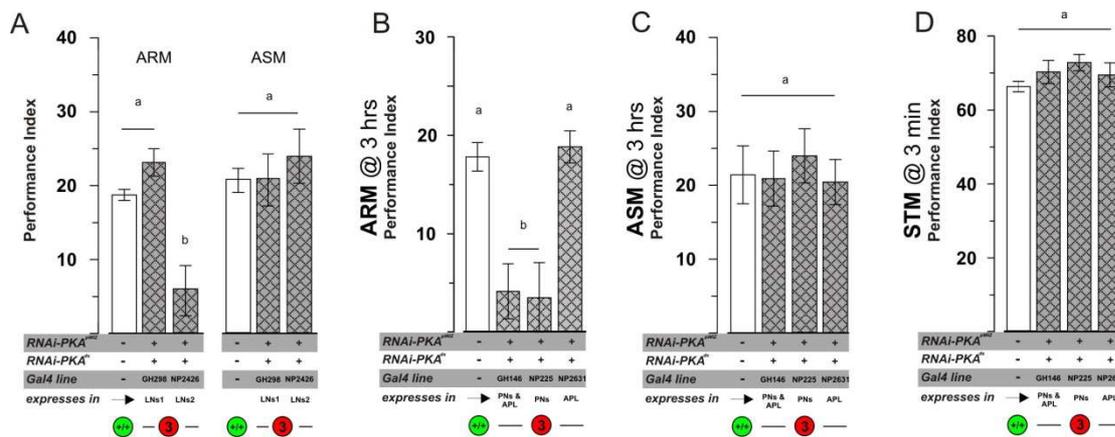
Die Herunterregulation von PKA innerhalb des olfaktorischen Pfades zeigte eine differenzierte Funktion von PKA bei der Bildung des STM und des MTM auf der Ebene der LNs und der PNs. Während für die Bildung des STM keine PKA Signale in den LNs und den PNs erforder-

derlich sind, werden für die Bildung des MTM in diesen Neuropilen PKA Signale benötigt. Um diese funktionelle Bedeutung von PKA näher zu untersuchen, wurde das MTM mit Hilfe eines Kälteschocks in seine einzelnen Bestandteile, dem stabilen ARM und dem labilen ASM, aufgespalten (Tempel et al., 1983).

Auf der Ebene der LNs führte eine Manipulation der 3. Ordnung mit der GAL4-Linie *NP2426* zu einer signifikanten Reduktion des ARM, wobei das ASM wildtypisch ausgebildet wurde (Abb. 12A). Erwartungsgemäß zeigte eine Manipulation mit der GAL4-Linie *GH298* keine signifikanten Unterschiede bei der Bildung dieser Gedächtniskomponenten (12A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PKA Signale innerhalb der LNs sehr spezifisch benötigt werden, wobei eine PKA Funktion in den LNs, deren Soma im ventralen Cluster liegen und/oder deren Dendriten in den peripheren Bereich der Glomeruli terminieren, für die Bildung des ARM erforderlich sind.

Die GAL4-Linie *GHI46* markiert ~90 cholinerge PNs (Heimbeck et al., 2001) und zusätzlich die bilateral symmetrischen GABAergen APL Neurone (Liu and Davis, 2009; Parnas et al., 2013; Pitman et al., 2011). Um festzustellen, in welchen der beiden neuronalen Populationen eine PKA Funktion benötigt wird, wurden zwei zusätzliche GAL4-Linien, die *NP225* und die *NP2631*, verwendet. Die GAL4-Linie *NP225* exprimiert wie die *GHI46* in den PNs, besitzt jedoch keine Expression in den APLs (Okada et al., 2009; Pitman et al., 2011). Die GAL4-Linie *NP2631* markiert überwiegend die APL Neurone (Pitman et al., 2011; Tanaka et al., 2008), zeigt jedoch keine Expression in den PNs. Mit Hilfe dieser beiden zusätzlichen Linien konnte gezeigt werden, dass PKA auf der Ebene der PNs eine spezifische Funktion bei der Bildung des ARM besitzt. Eine Manipulation der 3. Ordnung mit der nur in den PNs exprimierenden GAL4-Linie *NP225* führte zu einer signifikanten Reduktion der ARM Gedächtnisleistung (Abb. 12B), während das labile ASM (Abb. 12C) und das STM (Abb. 12D) wildtypisch ausgebildet wurden. Dementgegen zeigte eine Manipulation der 3. Ordnung in den APL Neuronen, durch die GAL4-Linie *NP2631*, keinen Einfluss auf die Gedächtnisleistung, d.h. alle drei untersuchten Gedächtniskomponenten wurden wildtypisch ausgebildet (Abb. 12B-D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass PKA sowohl auf der Ebene der LNs, als auch auf der Ebene der PNs eine Funktion bei der Bildung des stabilen ARM besitzen.



**Abbildung 12: PKA Signale auf der Ebene der LNs und der PNs tragen zur Bildung des ARM bei.** (A) Eine Manipulation 3. Ordnung in den LNs2 führte zu einer Beeinträchtigung des stabilen ARM, wobei das labile ASM unbeeinflusst blieb. Eine Manipulation in den LNs1 ließ keine Beeinträchtigung bei der Bildung der beiden Gedächtniskomponenten erkennen. (B) PKA Signale in den PNs werden für die Bildung des ARM benötigt. Die GAL4-Linie *GHI46* zeigte eine Beeinträchtigung in der ARM Gedächtnisleistung. Sie markiert ungefähr 2/3 der olfaktorischen PNs, besitzt jedoch ebenfalls eine Expression im anterioren lateralen Neuron (APL). Die GAL4-Linie *NP225* exprimiert nur in den olfaktorischen PNs, während die GAL4-Linie *NP2631* überwiegend das APL Neuron markiert. Eine Manipulation der 3. Ordnung mit der PN-spezifischen Linie *NP225* führte zu einer Reduktion der ARM Gedächtnisleistung, während die APL-spezifische Linie *NP2631* keine Beeinträchtigung in der Gedächtnisleistung zeigte. (C) Die Manipulation der PNs und der APL Neurone zeigte keinen Einfluss auf die ASM Bildung (D) PKA Signale in den PNs und dem APL werden nicht für die Bildung des STM benötigt. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7-11. Es wurden für diese Experimente nur Weibchen gewertet. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p \leq 0.001$  an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von  $p \geq 0.05$  angegeben.

Neben den LNs und den PNs wurden die KCs als eine weitere neuronale Struktur identifiziert, in der PKA sowohl für die Bildung des STM, als auch für die Bildung des MTM benötigt wird. Demzufolge ist eine nähere Betrachtung des Einflusses der KCs bei der Bildung PKA-abhängiger Gedächtniskomponenten unabdingbar.

### 3.1.4 Auf der Ebene der Kenyonzellen werden funktionell unterschiedliche PKA Signale benötigt

Die Pilzkörper besitzen eine wichtige Schlüsselposition beim Lernen und bei der Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses (Keene and Waddell, 2007; Margulies et al., 2005; McGuire et al., 2005). Sie bestehen aus mehreren morphologisch unterscheidbaren Zelltypen, den  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  und  $\gamma$  Loben (Ito et al., 1997). Es gibt unterschiedliche GAL4-Linien, die spezifisch in den einzelnen Loben exprimieren und mit denen die funktionellen Auswirkungen des Duftlernens charakterisiert werden können (Akalal et al., 2006; Aso et al., 2009; Blum et al., 2009a; Krashes et al., 2007; Xie et al., 2013). Die Lokalisation zeigte, dass PKA Signale in den MBs für die Bildung des STM und des MTM benötigt werden (Abb. 11). Um die genaue Funktion von PKA innerhalb der MBs zu untersuchen, wurden spezifische GAL4-Linien

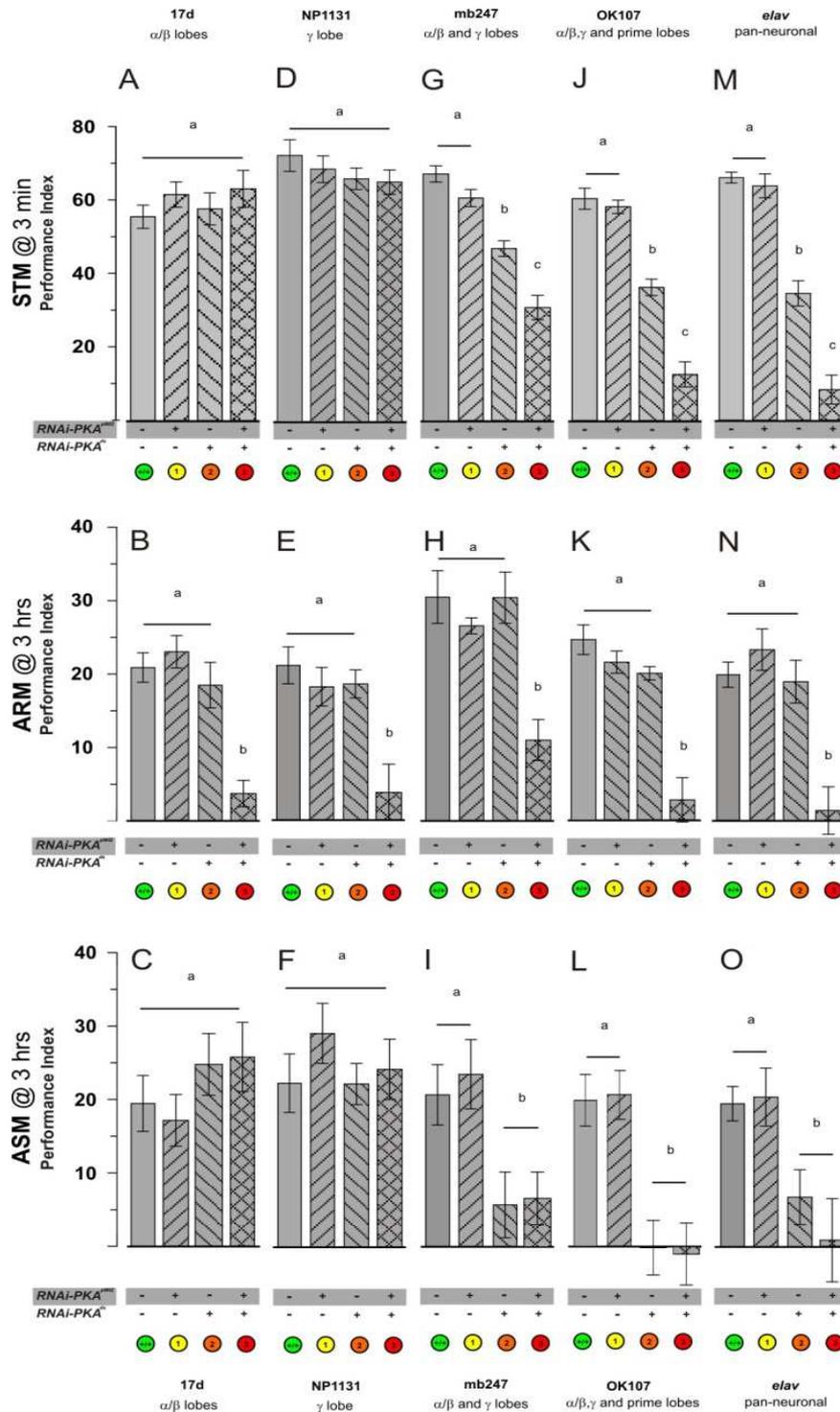
verwendet, die in den unterschiedlichen Neuronen der MBs exprimieren (Abb. 13). Dazu wurden die GAL4-Linien *17d* (Abb. 13A-C) und *NP1131* (Abb. 13D-F) verwendet, die PKA in den  $\alpha/\beta$  Loben bzw. in den  $\gamma$  Loben herunterregulierten. Zusätzlich wurden die GAL4-Linien *mb247* (Abb. 13G-I) und *OK107* (Abb. 13J-L) genutzt. Diese Linien markieren einen umfassenden Anteil, jedoch nicht den gesamten MB, der aus über 2500 Kenyonzellen besteht (Technau, 1984). Als Vergleich wurden die Ergebnisse der panneuralen Manipulation mit der *elav* GAL4-Linie aus der Abb. 9 aufgeführt (Abb. 13M-O). Die einzelnen GAL4-Linien unterscheiden sich in ihrer Expressionsstärke. Demzufolge wäre es möglich, dass die benutzten Transgene unterschiedlich stark in den einzelnen Neuropilen exprimiert werden. Des Weiteren ist bekannt, dass die vorhandene PKA Aktivität eine entscheidende Rolle beim aversive Duftlernen spielt und dass das Expressionslevel bedeutend für die Bildung der unterschiedlichen Gedächtnisphasen ist (Li et al., 1996; Yamazaki et al., 2010; Yamazaki et al., 2007). Aus diesem Grund wurde für die Analyse der Funktion von PKA in den KCs alle drei RNAi Konstrukte (1., 2. und 3. Ordnung) verwendet.

Eine graduelle Herunterregulation von PKA innerhalb des KCs-Netzwerkes zeigte, dass für die Bildung des STM, des stabilen ARM und des labilen ASM unterschiedliche PKA Anforderungen erforderlich sind.

Bei der Analyse des ARM konnte auf der Ebene der KCs eine PKA Beteiligung in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben festgestellt werden. Dieser ARM-spezifische Effekt, der durch einen kompletten Verlust der stabilen Gedächtniskomponente gekennzeichnet ist, zeigte sich bei einer gewebe-spezifischen Herunterregulation von PKA durch die Manipulation 3. Ordnung unter Kontrolle der GAL4-Linien *17d* (Abb. 13B) und *NP1131* (Abb. 13E). Erstaunlicherweise zeigte eine Manipulation der 3. Ordnung innerhalb der  $\alpha/\beta$  oder  $\gamma$  Loben keine Auswirkungen auf die Gedächtnisleistung des STM (Abb. 13A+D) oder die des ASM (Abb. 13C+F).

Des Weiteren konnte eine PKA Beteiligung bei der Bildung des labilen ASM im gleichen Lobensystem, d.h.  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben, aufgezeigt werden. Dieser ASM-spezifische Effekt zeigte sich bei den GAL4-Linien *mb247* (Abb. 13I) und *OK107* (Abb. 13L). Anders als beim ARM-spezifischen Effekt ist der ASM-spezifische Effekt jedoch durch eine PKA Beteiligung beider Loben gekennzeichnet. PKA musste sowohl im  $\alpha/\beta$  sowie im  $\gamma$  Lobe herunterreguliert werden, um einen Verlust der labilen Komponente zu bewirken.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PKA innerhalb der Lobensysteme unterschiedliche Funktionen einnimmt, d.h. sowohl eine ARM-spezifische Funktion als auch eine ASM-spezifische Funktion besitzt, die jedoch unterschiedliche Anforderungen auf der Ebene der  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben aufweisen.



**Abbildung 13: Auf der Ebene der Kenyonzellen beeinflussen unterschiedliche PKA Signale die Bildung von STM, ARM und ASM.** Eine progressive Herunterregulation von PKA auf der Ebene der KCs zeigt funktionell unterschiedliche PKA Signale innerhalb des Lobensystems der MBs. In der Abbildung werden das STM (obere Reihe), das ARM (mittlere Reihe) und das ASM (untere Reihe) von Fliegen dargestellt, die entweder das Transgen der 1. (gelb), 2. (orange) oder 3. Ordnung (rot) exprimierten. Es wurden verschiedene GAL4-Linien benutzt, die die Transgene gezielt in den unterschiedlichen Loben der MBs exprimierten. (A-C) Die GAL4-Linie *17d* markiert die  $\alpha/\beta$  Loben. Nur eine Manipulation der 3. Ordnung zeigte in den  $\alpha/\beta$  Loben eine Beeinträchtigung der ARM Gedächtnisleistung. Das STM und das ASM wurden bei allen drei Manipulationen wildtypisch ausgebildet. (D-F) Die *NP1131* ist spezifisch für das  $\gamma$  Lobe der MBs. Eine Manipulation der 3. Ordnung führte im  $\gamma$  Lobe zu einer signifikanten Reduktion der ARM Gedächtnisleistung, während die Manipulationen 1. und 2. Ordnung keinen Einfluß bei der Bildung des STM, ARM und ASM zeigten. (G-I) Die GAL4-Linie *mb247* er-

mögliche eine Manipulation in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben. Dort führte die Manipulation 2. und 3. Ordnung zu einer graduellen Reduktion der STM Gedächtnisleistung. Das ARM wurde nur bei einer Manipulation der 3. Ordnung beeinträchtigt, während die ASM Gedächtnisleistung durch eine Manipulation 2. und 3. Ordnung signifikant reduziert wurde. **(J-L)** Die *OK107* markiert neben 103 LNs die  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  und  $\gamma$  Loben der MBs. Eine Manipulation 2. und 3. Ordnung führte zu einer graduellen Reduktion der STM Gedächtnisleistung. Die ARM Gedächtnisleistung wurde durch die Manipulation 3. Ordnung beeinträchtigt und die ASM Gedächtnisleistung durch die Manipulation 2. und 3. Ordnung. **(M-O)** Zum Vergleich wurde erneut die Manipulation mit der panneuralen GAL4-Linie *elav* aufgeführt. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 8-11. Es wurden für diese Experimente nur Weibchen gewertet. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p \leq 0.001$  an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von  $p \geq 0.05$  angegeben.

Darüber hinaus zeigte sich, dass PKA Signale eine unterschiedliche Sensitivität bei der Bildung des ASM und des ARM besitzen. Während der Verlust des labilen ASM schon bei einer Manipulation der 2. Ordnung auftrat, wurde das stabile ARM erst bei einer stärkeren Reduktion der PKA Aktivität durch eine Manipulation der 3. Ordnung beeinflusst. Diese Beobachtung konnten bei allen verwendeten GAL4-Linien (*mb247*, *OK107* und *elav*) festgestellt werden. Neben der ASM- und ARM-spezifischen Funktion von PKA, zeigte sich eine STM-spezifische Funktion, die ebenfalls in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben lokalisiert ist (Abb. 13G,J und M). Diese STM-spezifische Funktion ist durch eine graduelle Abnahme der Gedächtnisleistung gekennzeichnet, die in Abhängigkeit zur vorhandenen PKA Aktivität steht.

Da die Expression des Transgens 3. Ordnung unter Kontrolle der verwendeten GAL4-Linien *mb247*, *OK107* und *elav* die Gedächtnisleistung aller untersuchten Gedächtniskomponenten beeinflusste, wurden diese Linien auf ihre sensorischen Fähigkeiten hin getestet. Die Analyse der Duftwahrnehmung und der Schockwahrnehmung zeigte jedoch keine Unterschiede gegenüber den genetischen Kontrollen, was auf eine normale Verarbeitung der sensorischen Reize hindeutet (Tab. 2).

**Tabelle 2: Reaktion auf die Duft- und Schockwahrnehmung.** Fliegen, die das Transgen der 3. Ordnung in den GAL4-Linien *mb247*, *OK107* und *elav* exprimierten, zeigten keine signifikante Beeinträchtigung in ihrer Duft- und Schockwahrnehmung verglichen mit den genetischen Kontrollen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7-15. Es wurden für diese Experimente nur Weibchen gewertet. Keine signifikanten Unterschiede auf dem Level von  $p \geq 0.05$ .

Genotyp	Duftvermeidung		Schockvermeidung
	<i>OCT</i> ( $^1/_{150}$ )	<i>MCH</i> ( $^1/_{100}$ )	<i>120 V DC</i>
Wildtyp Canton-S (+/+)	31.2 $\pm$ 3,3	31.4 $\pm$ 3.6	61.1 $\pm$ 5,3
<i>+/+ :: RNAi PKA<sup>pWiz</sup>; PKA<sup>ds</sup></i>	32.3 $\pm$ 3.8	38.9 $\pm$ 2.8	62.2 $\pm$ 5.9
<i>elav :: RNAi PKA<sup>pWiz</sup>; PKA<sup>ds</sup></i>	29.6 $\pm$ 3,6	39.0 $\pm$ 4.8	49.1 $\pm$ 4.5
<i>mb247 :: RNAi PKA<sup>pWiz</sup>; PKA<sup>ds</sup></i>	24.0 $\pm$ 2.5	33.5 $\pm$ 5.2	65.2 $\pm$ 5.6
<i>OK107 :: RNAi PKA<sup>pWiz</sup>; PKA<sup>ds</sup></i>	28.9 $\pm$ 3.5	34.5 $\pm$ 3.7	57.5 $\pm$ 6.7

Diese Ergebnisse zeigen eine deutliche Dissoziation der PKA Signale innerhalb der MBs bei der Bildung unterschiedlicher Gedächtniskomponenten. Eine graduelle Herunterregulation der PKA Aktivität ermöglicht eine Unterscheidung verschiedener PKA Funktionen, die in den MBs unabhängig voneinander agieren können. PKA kann eine ARM-spezifische, ASM-spezifische oder STM-spezifische Funktion einnehmen. Diese Funktionen können auf der Ebene des Lobensystems voneinander dissoziiert werden und erfordern unterschiedliche PKA Sensibilitäten.

### **3.1.5 Akute vs. entwicklungsbedingte Auswirkungen einer stark reduzierten PKA Aktivität auf die Gedächtnisbildung**

Eine panneurale Manipulation 3. Ordnung während der gesamten Entwicklung führte zu einer nahezu kompletten Reduktion der PKA Aktivität auf unter 10% und einem damit verbundenen Verlust der Gedächtnisleistung aller untersuchten Gedächtniskomponenten (Abb. 8+9). Eine Analyse der Duft- und der Schockwahrnehmung ergab keine veränderte Wahrnehmung dieser Fliegen (Abb. 9E, Tab. 2), so dass eine atypische Verarbeitung der sensorischen Reize als Ursache des Verlustes ausgeschlossen werden konnte. Diese Fliegen zeigten jedoch im Vergleich zu ihren genetischen Kontrollen oder gegenüber der anderen beiden Manipulationen sichtbare morphologische Defekte d.h. sie waren kleiner und ihre Flügel wurden nicht vollständig ausgebildet.

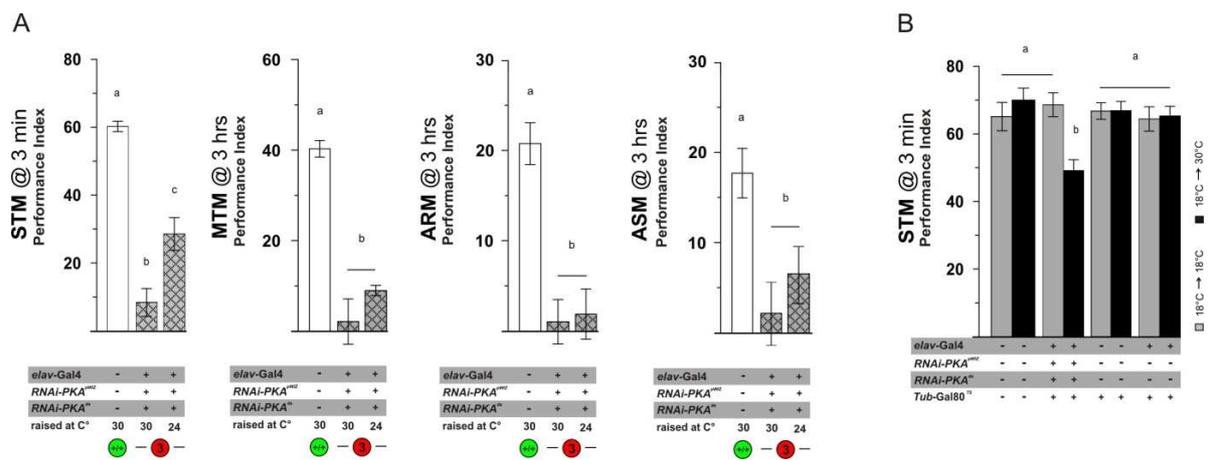
PKA spielt eine große Rolle innerhalb vieler wichtiger zellulärer Prozesse und während der Entwicklung wird PKA durchgehend exprimiert. „Loss of function“ Mutationen in der katalytischen Untereinheit *DC0* führen in Abhängigkeit des Schweregrades und des zeitlichen Beginns der Störung zu einer Sterilität der Weibchen, einer abweichenden Oogenese oder zu larvaler Letalität (Foster et al., 1984; Lane and Calderon, 1993). Aus anderen Studien ist bekannt, dass eine PKA Aktivität von unter 20% zu einer leichten Reduktion der Größe führt, wobei die Gehirnstrukturen normal ausgebildet werden (Skoulakis et al., 1993). Demzufolge stellte sich nun die Frage, ob die gemessenen Beeinträchtigungen im Verhalten dieser Fliegen auf einen akuten Effekt von PKA zurückzuführen sind, oder ob es sich möglicherweise um einen Entwicklungsdefekt handeln könnte.

Die Aktivität des GAL4-Proteins ist temperaturabhängig, wodurch die Expressionsstärke des Effektorgens negativ oder positiv beeinflusst werden kann (Duffy, 2002). Die transgenen Fliegen wurden bei einer Temperatur von 30° C aufgezogen, womit eine höchst mögliche Effektivität in der Expression der RNAi-Konstrukte und somit eine höchst möglichen Reduktion der PKA Aktivität erzielt werden konnte. Um die Effizienz der Manipulation und demzufolge

die PKA Aktivität geringfügig zu verändern, wurden die Fliegen, die das Transgen 3. Ordnung unter Kontrolle des *elav*-GAL4 Treibers exprimierten, bei einer veränderten Temperatur von 24°C aufgezogen.

Ein Vergleich der Gedächtnisleistung von Fliegen, die entweder bei 24°C oder bei 30°C aufgezogen wurden, zeigte unter beiden Aufzuchttemperaturregimen eine Reduktion der Gedächtnisleistung aller gemessenen Gedächtniskomponenten (Abb. 14A). Bei einer Temperatur von 30°C führte die Manipulation 3. Ordnung jedoch zu einer signifikant höheren Reduktion der STM Gedächtnisleistung, wobei die Gedächtnisleistung des MTM und dessen Bestandteile, ARM und ASM, keine statistischen Unterschiede zeigten. Unter beiden Bedingungen fehlten diese Gedächtniskomponenten komplett. Demnach scheint das STM sensitiver auf die vorhandene PKA Aktivität zu reagieren, wohingegen das labile ASM und das stabile ARM ab einem bestimmten Schwellenwert komplett verloren gehen. Des Weiteren konnten die bei einer höheren Aufzuchttemperatur festgestellten sichtbaren morphologischen Veränderungen (kleinerer Habitus und verkümmerte Flügel), bei einer geringeren Aufzuchttemperatur nicht beobachtet werden. Diese Tiere unterschieden sich morphologisch nicht von wildtypischen Fliegen, weder in ihrer Größe noch bei der Ausbildung ihrer Flügel. Die Tatsache, dass bei einer geringfügig erhöhten PKA Aktivität die gleichen Gedächtniskomponenten beeinträchtigt wurden, wobei keine morphologischen Defizite beobachtet werden konnten, deutet auf einen akuten Defekt von PKA bei einer Manipulation der 3. Ordnung hin.

Um einen akuten Defekt von einem entwicklungsbedingten Defekt zu trennen, ist es möglich einen temperaturabhängigen GAL80<sup>ts</sup> Repressor (McGuire et al., 2003) zu benutzen, der die Expression des Transgens 3. Ordnung auf das Adultenstadium beschränkt (Abb. 14B). Demzufolge wurden Fliegen, die das Transgen der 3. Ordnung panneural exprimierten, bei einer restriktiven Temperatur von 18°C aufgezogen und 24 Stunden vor Beginn der Verhaltensexperimente auf 30°C gehalten, um erst zu diesem Zeitpunkt die PKA Aktivität effektiv herunterzuregulieren. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion in der STM Gedächtnisleistung, was darauf schließen lässt, dass PKA eine akute Funktion bei der Bildung des STM übernimmt. Ein Vergleich mit Fliegen, die das Transgen der 3. Ordnung während der gesamten Entwicklung exprimierten, lässt jedoch eine Diskrepanz in der STM Gedächtnisleistung erkennen d.h. Fliegen, die das Transgen durchgängig während der gesamten Entwicklung exprimierten, zeigten eine schlechtere Gedächtnisleistung, als Fliegen, bei denen die Expression auf das Adultenstadium begrenzt wurde. Diese Befunde deuten darauf hin, dass bei einer panneural stark herunterregulierten PKA Aktivität auf <10% neben einer akuten Funktion von PKA ebenfalls eine entwicklungsbedingte Komponente vorliegen könnte.

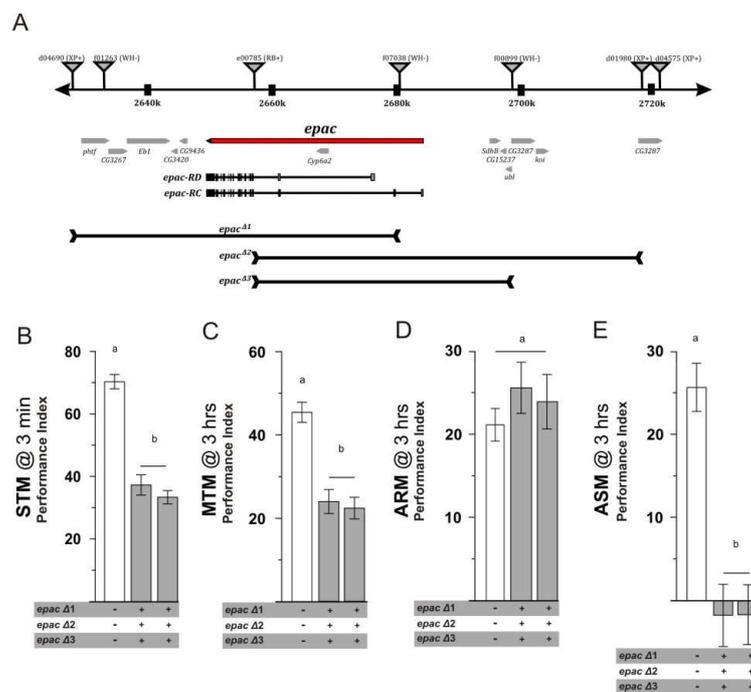


**Abbildung 14: PKA zeigt sowohl einen akuten als auch einen entwicklungsbedingten Verhaltensdefekt.** (A) Fliegen mit dem *elav*-GAL4 getriebenen Konstrukt 3. Ordnung, die entweder bei 24°C oder bei 30°C aufwuchsen, zeigten einen signifikanten Effekt auf die STM Gedächtnisleistung. Bei einer Aufzuchttemperatur von 30°C und somit bei einer geringeren PKA Aktivität konnte, verglichen mit einer Aufzuchttemperatur von 24°C, eine höhere Reduktion der STM Gedächtnisleistung festgestellt werden. Die anderen Gedächtniskomponenten (MTM, ARM oder ASM) zeigten bei einer Aufzucht unter 24°C oder 30°C eine vergleichbare Reduktion der Gedächtnisleistung. (B) Die auf das Adultenstadium beschränkte restriktive Expression des Konstruktes 3. Ordnung durch einen temperaturabhängigen GAL80<sup>ts</sup> Repressor, zeigte eine signifikante Beeinträchtigung der STM Gedächtnisleistung. Verglichen mit einer Expression des Transgens 3. Ordnung während der gesamten Entwicklung wies die gemessene STM Gedächtnisleistung eine geringere Reduktion auf. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n \leq 12$ . Es wurden für diese Experimente nur Weibchen gewertet. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p \leq 0.001$  an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von  $p \geq 0.05$  angegeben.

### 3.1.6 EPAC besitzt eine funktionelle Rolle bei der Bildung des STM und des labilen ASM

Neben PKA ist EPAC ein weiteres Protein, welches durch cAMP aktiviert wird. Im Gegensatz zu PKA phosphoryliert EPAC jedoch keine weiteren Proteine, sondern wirkt als Guanin-nukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factors, GEF) für kleine G-Proteine wie Rap1 und Rap2 der RAS Superfamilie (Bos, 2003; de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). Bisherige Arbeiten deuten darauf hin, dass EPAC an der Regulation verschiedener Prozesse beteiligt ist, die für die synaptische Plastizität benötigt werden (Gekel and Neher, 2008; Gelinis et al., 2008; Yang et al., 2012). Eine Aktivierung von EPAC im Hippocampus von Mäusen führt zu einer Erhöhung des Langzeitgedächtnisses (Ma et al., 2009) und EPAC Knockout-Mäuse zeigen eine Beeinträchtigung beim Lernen und der Gedächtnisbildung (Yang et al., 2012). Bei einer Vielzahl biologischer Prozesse wirken die beiden durch cAMP aktivierten Proteine, PKA und EPAC, oft zellulär gemeinsam, wobei sie entweder unabhängig voneinander, synergistisch oder entgegengesetzt agieren können (Bos, 2006; Cheng et al., 2008). Offensichtlich scheinen beide cAMP Effektoren, einen Einfluss auf die Gedächtnisbil-

derung zu besitzen. Demzufolge ist es sinnvoll, einen vergleichenden Ansatz für eine präzise Analyse von EPAC zu wählen. Dazu wurden in unserem Labor mittels des FRT-derived deletion (FDD) Systems zwei EPAC Nullmutanten,  $epac^{\Delta 1}/epac^{\Delta 3}$  und  $epac^{\Delta 1}/epac^{\Delta 2}$ , generiert (Abb. 15A; Efetova et al., 2013), die in der aversiven olfaktorischen Duftkonditionierung getestet wurden. Dabei zeigten die beiden Mutanten einen spezifischen Lernphänotyp, der einzelne Gedächtniskomponenten betraf d.h. im Vergleich zum Wildtyp wiesen beide EPAC Mutanten eine 50%ige Reduktion der STM Gedächtnisleistung (Abb. 15B) und der MTM Gedächtnisleistung (Abb. 15C) auf. Die Aufspaltung des MTM in seine einzelnen Bestandteile mittels eines Kälteschocks ließ einen kompletten Verlust des labilen ASM erkennen (Abb. 15E), während die stabile Gedächtniskomponente, ARM, unbeeinträchtigt blieb (Abb. 15D). Diese Ergebnisse zeigen, dass EPAC eine spezifische Funktion bei der Bildung des STM und des labilen ASM besitzt.



**Abbildung 15: EPAC wird für die Bildung des STM und des labilen ASM benötigt.** (A) Die zwei EPAC Nullmutanten,  $epac^{\Delta 1}/epac^{\Delta 3}$  und  $epac^{\Delta 1}/epac^{\Delta 2}$ , wurden mittels FDD System generiert. Diese Mutanten enthalten die transkombinierten Deletionen  $epac^{\Delta 1}$  und  $epac^{\Delta 3}$  oder  $epac^{\Delta 1}$  und  $epac^{\Delta 2}$ . (B),(C) Beide Mutanten,  $epac^{\Delta 1}/epac^{\Delta 3}$  und  $epac^{\Delta 1}/epac^{\Delta 2}$  (graue Balken), zeigten eine signifikante Reduktion der STM und MTM Gedächtnisleistung. (D),(E) Bei einer Aufspaltung des MTM in seine einzelnen Komponenten mittels eines Kälteschocks wurde das stabile ARM wildtypische ausgebildet, wohingegen jedoch das labile ASM komplett beeinträchtigt wurde. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7-10. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p \leq 0.001$  an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von  $p \geq 0.05$  angegeben.

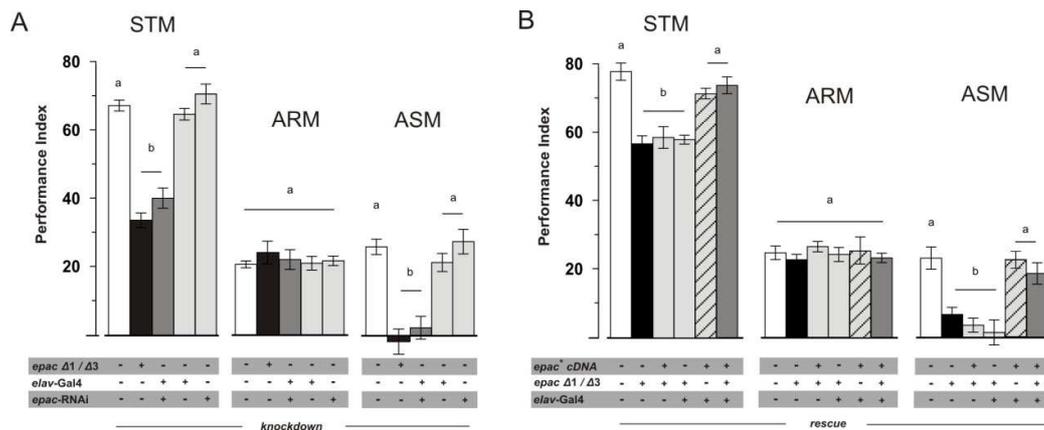
PKA zeigte ebenfalls eine STM-spezifische und eine ASM-spezifische Funktion, was darauf hindeuten könnte, dass PKA und EPAC die Bildung dieser Gedächtniskomponenten möglicherweise gemeinsam regulieren. Um zu untersuchen in welchen Gehirnstrukturen EPAC für die Bildung dieser Gedächtniskomponenten benötigt wird, wurden eine *epac*-RNAi und ein EPAC-Rettungskonstrukt verwendet. Diese mussten jedoch zunächst auf ihre Funktionalität hin untersucht werden.

### 3.1.7 Gewebespezifische Manipulation von EPAC im *Drosophila* Gehirn

Um die Funktion von EPAC bei der Bildung des STM und des labilen ASM näher zu charakterisieren, wurde die Aktivität von EPAC gewebespezifisch manipuliert. Dies geschah einerseits durch eine *epac*-RNAi, die die Expression von EPAC spezifisch herunterregulierte, oder durch ein EPAC-Rettungskonstrukt, welches eine wildtypische *epac*+cDNA im *epac*<sup>Δ1</sup>/*epac*<sup>Δ3</sup>-Mutantenhintergrund exprimiert, um somit eine wildtypische EPAC Aktivität wiederherzustellen.

Um die Funktionalität zu testen, wurden beide Transgene panneural unter Kontrolle von *elav*-GAL4 exprimiert (Abb. 16). Den Erwartungen entsprechend zeigte eine panneurale Manipulation von EPAC durch die *epac*-RNAi eine Beeinträchtigung der STM Gedächtnisleistung und der ASM Gedächtnisleistung (Abb. 16A). Die panneurale Expression der *epac*<sup>+</sup>cDNA im *epac*<sup>Δ1</sup>/*epac*<sup>Δ3</sup>-Mutantenhintergrund konnte die STM Gedächtnisleistung und die ASM Gedächtnisleistung wieder auf ein wildtypisches Niveau herstellen (Abb. 16B). Das ARM zeigte bei beiden Manipulationen keinen Effekt, wurde demnach wildtypisch ausgebildet (Abb. 16A,B). Eine Expression der *epac*<sup>+</sup>cDNA in einem Wildtyphintergrund zeigte keine Veränderung der Gedächtnisleistung, weder bei der Bildung des STM noch beim ASM. Folglich bewirkt eine erhöhte panneural getriebene EPAC Aktivität keinen „Gain of function“ Effekt (Abb. 16B).

Die verwendete *epac*-RNAi ist somit fähig die Expression von EPAC effektiv herunterzuregulieren und das verwendete EPAC-Rettungskonstrukt kann die reduzierte EPAC Expression der *epac*<sup>Δ1</sup>/*epac*<sup>Δ3</sup>-Mutante auf ein wildtypisches Niveau bringen. Demnach erlauben diese beiden Ansätze eine Identifizierung neuronaler Strukturen, in denen EPAC für die Bildung olfaktorischer Gedächtnisse notwendig und/oder hinreichend ist.

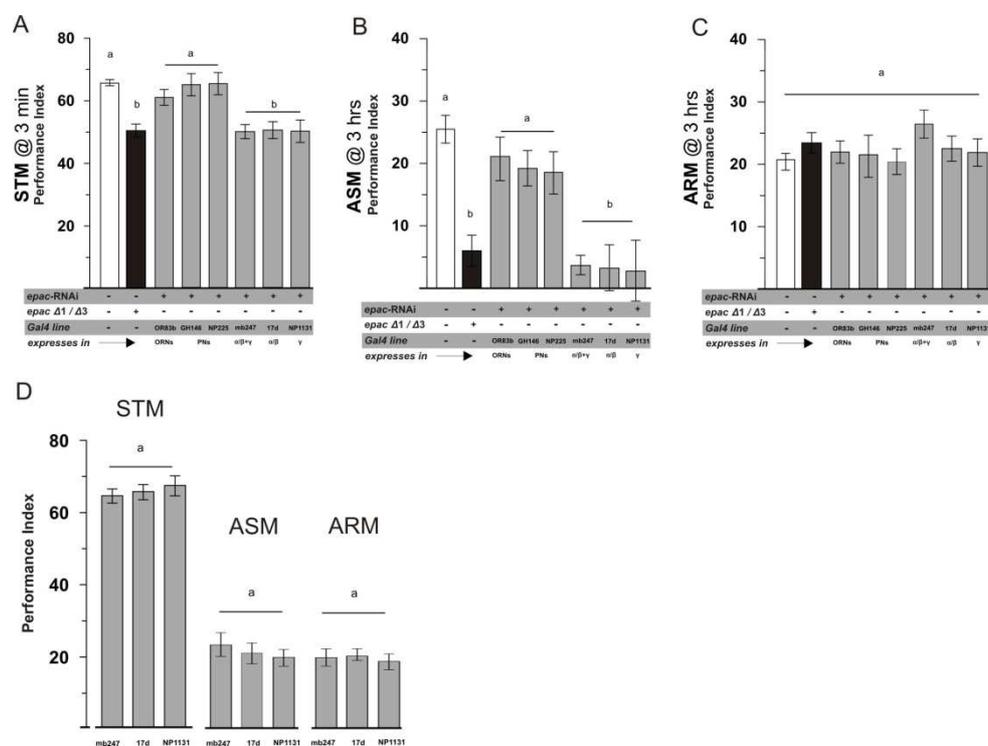


**Abbildung 16: Spezifische genetische Manipulation von EPAC.** Die transgene Expression der *epac*-RNAi oder einer wildtypischen *epac*<sup>+</sup>cDNA in einem *epac*-Mutantenhintergrund moduliert die EPAC Aktivität. **(A)** Die panneurale Manipulation mit der *epac*-RNAi (dunkelgrauer Balken) reduzierte signifikant die STM Gedächtnisleistung und die ASM Gedächtnisleistung auf Mutantenniveau (schwarzer Balken), wobei das ARM wildtypisch ausgebildet wurde. Die genetischen Kontrollen zeigten eine wildtypische Gedächtnisleistung in allen gemessenen Gedächtniskomponenten (hellgraue Balken). **(B)** Eine panneurale genetische Rettung mit einer wildtypischen *epac*<sup>+</sup>cDNA in einem *epac*-Mutantenhintergrund führte zu einer Wiederherstellung der STM Gedächtnisleistung, sowie der ASM Gedächtnisleistung (dunkelgrauer Balken). Die genetischen Kontrollen zeigten erwartungsgemäß eine Gedächtnisleistung auf Mutantenniveau (hellgraue Balken). Eine Überexpression des *epac*<sup>+</sup>cDNA Rettungskonstruktes im Wildtyphintergrund (gestreifter Balken) zeigte eine wildtypische STM und ASM Gedächtnisleistung, wodurch ein „Gain of function“ Effekt ausgeschlossen werden kann. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte <sup>±</sup> SEM; n = 8-12. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von p<0.001 an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von p≥0.05 angegeben.

### 3.1.8 EPAC Signale beeinflussen die Bildung des STM und des labilen ASM innerhalb der KCs der MBs

Bei der Analyse von PKA konnte eine STM-spezifische Funktion und eine ASM-spezifische Funktion innerhalb der verschiedenen Loben der MBs festgestellt werden. EPAC zeigte ebenfalls eine Funktion bei der Bildung dieser beiden Gedächtniskomponenten. Um Rückschlüsse über mögliche funktionelle Gemeinsamkeiten oder Unterschiede der beiden durch cAMP aktivierten Proteine ziehen zu können, wurde im Folgenden die Funktion von EPAC innerhalb der MBs genauer untersucht. Dazu wurden die gleichen GAL4-Linien verwendet, die auch bei der Analyse der PKA Funktion benutzt wurden. Eine Herunterregulation von EPAC in den KCs durch die GAL4-Linie *mb247* ( $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben) zeigte eine signifikante Reduktion der STM Gedächtnisleistung auf Höhe der EPAC Nullmutante *epac* <sup>$\Delta$ 1</sup>/*epac* <sup>$\Delta$ 3</sup>, die als Vergleich dargestellt wurde. Anders als bei PKA jedoch zeigten die einzelnen Loben, markiert durch die *17d* ( $\alpha/\beta$  Loben) und die *NP1131* ( $\gamma$  Loben), eine Beeinflussung bei der Bildung des STM (Abb. 17A), was auf eine nicht-redundante Beteiligung der Loben hindeutet. Demnach wird EPAC für die Bildung des STM in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben der MBs benötigt. Bemerkenswerterweise konnte bei der Bildung des labilen ASM dieselbe funktionelle Notwendigkeit inner-

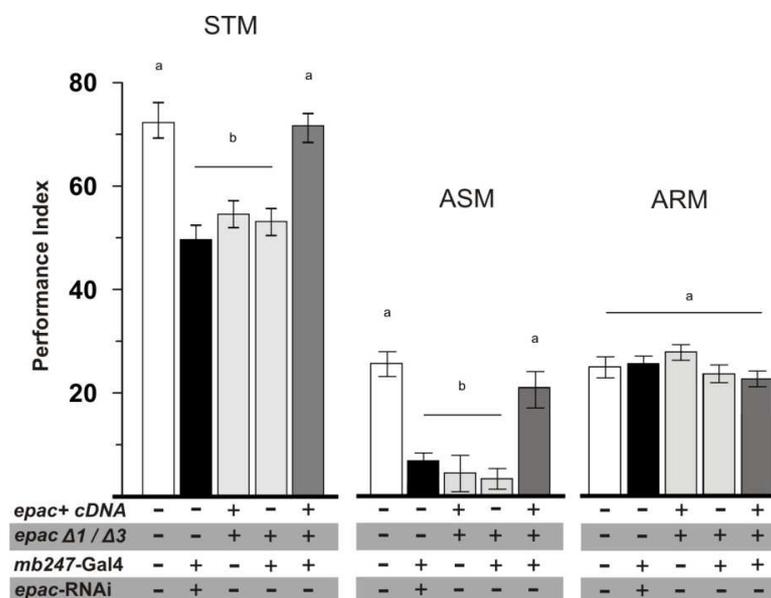
halb des Lobensystems festgestellt werden (Abb. 17B), wobei das stabile ARM wildtypisch ausgebildet wurde (Abb. 17C). Eine Herunterregulierung von EPAC auf der Ebene der ORNs und der PNs zeigte keinen Effekt auf die Gedächtnisbildung, was darauf hindeutet, dass EPAC in diesen Neuropilen nicht benötigt wird (Abb. 17A+B). Als zusätzliche genetische Kontrolle wurden die verwendeten GAL4-Linien mit dem Wildtyp verkreuzt, um eine mögliche Beeinflussung der verwendeten GAL4-Linien auszuschließen. Die genetischen Kontrollen zeigten eine wildtypische Gedächtnisleistung bei der Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten (Abb. 17D).



**Abbildung 17: EPAC ist auf der Ebene der KCs für die Bildung des STM und des ARM notwendig.** Die gewebespezifische Manipulation von EPAC durch einen RNAi-Ansatz wurde verwendet, um notwendige Neupile zu bestimmen, die für die Bildung des STM und des labilen ASM benötigt werden. Die schwarzen Balken zeigen zum Vergleich die Gedächtnisleistung der EPAC Nullmutante *epac $\Delta 1$ /epac $\Delta 3$* . **(A)** Die gezielte Herunterregulation von EPAC beeinflusste die STM Gedächtnisleistung auf der Ebene der KCs markiert durch die GAL4-Linien *mb247*, *17d* und *NP1131*. **(B)** Die ASM Gedächtnisleistung wurde auf der Ebene der KCs durch die gleichen GAL4-Linien beeinflusst, die auch das STM beeinträchtigten. **(C)** Das ARM zeigte keine Beeinflussung durch die gewebespezifische Herunterregulation von EPAC. **(D)** Die genetischen Kontrollen der Pilzkörpereffektorlinien im wildtypischen Hintergrund zeigten eine normale STM, ASM und ARM Gedächtnisleistung. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7-12. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p < 0.001$  an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von  $p \geq 0.05$  angegeben.

### 3.1.9 EPAC Signale in den KCs der MBs sind für die Bildung des STM und des ASM hinreichend

Neben der Möglichkeit einer Lokalisation der EPAC Funktion innerhalb olfaktorischer Neuropile durch die Verwendung eines RNAi-Ansatzes, besteht die Möglichkeit zu untersuchen, in welchen Neuropilen EPAC minimal gebraucht wird, um eine wildtypische STM und ASM Gedächtnisleistung wiederherzustellen. Die Experimente aus Abschnitt 3.1.7 zeigten die Funktionalität des verwendeten EPAC-Rettungskonstruktes bei einer panneuralen Expression im *epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>*-Mutantenhintergrund. Dieses Rettungskonstrukt wurde zusammen mit der GAL4-Linie *mb247* in den *epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>*-Mutantenhintergrund gekreuzt, um die wildtypische *epac<sup>+</sup>*cDNA spezifisch in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben exprimieren zu können. Aufgrund der zeitaufwendigen Genetik konnten im Zuge dieser Arbeit nur die  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben, markiert durch die Linie *mb247*, näher betrachtet werden. Bei einer Expression der *epac<sup>+</sup>*cDNA im Mutantenhintergrund unter Kontrolle dieser GAL4-Linie konnte sowohl die STM Gedächtnisleistung, als auch die ASM Gedächtnisleistung auf ein wildtypisches Niveau wiederhergestellt werden (Abb. 18). Demzufolge besitzt EPAC eine spezifische Funktion bei der Bildung des STM und des ASM und ist für die Bildung dieser Gedächtniskomponenten in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben der MBs notwendig und hinreichend.

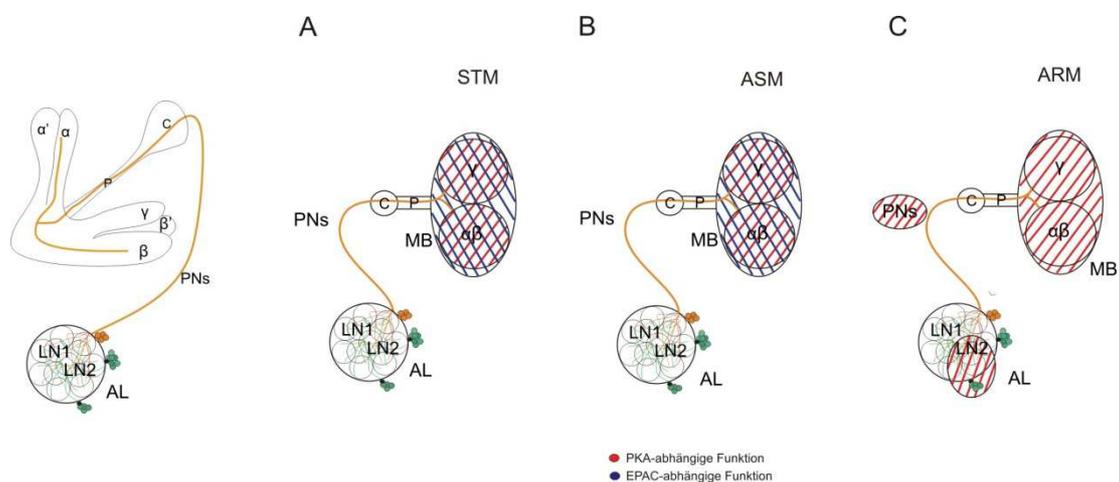


**Abbildung 18: EPAC ist in den KCs hinreichend für die Bildung des STM und des ASM.** Durch eine Expression einer wildtypischen *epac<sup>+</sup>*cDNA im *epac<sup>Δ1</sup>/epac<sup>Δ3</sup>*-Mutantenhintergrund in den KCs der  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben der MBs konnte eine wildtypische STM und ASM Gedächtnisleistung wiederhergestellt werden (dunkelgrauer Balken). Die genetischen Kontrollen zeigten erwartungsgemäß eine Gedächtnisleistung auf Mutantenniveau (hellgrauer Balken). Als Vergleich wurde die Herunterregulation von EPAC in der GAL4-Linie *mb247* dargestellt, die den Wert des Mutantenniveaus aufzeigt (schwarzer Balken). Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7-10. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanz auf dem Level von  $p < 0.001$  an.

### 3.1.10 Vergleichende Gegenüberstellung PKA-spezifischer und EPAC-spezifischer Signale bei der Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses

Sowohl PKA als auch EPAC besitzen eine spezifische Funktion bei der Bildung des STM und des labilen ASM (Abb. 19A+B). Die beide cAMP Effektoren unterstützen die Bildung dieser beiden Gedächtniskomponenten auf der Ebene der KCs in den gleichen Neuropilen, d.h. in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben (*mb247*). EPAC besitzt jedoch in den  $\alpha/\beta$  (*17d*) und  $\gamma$  (*NP1131*) Loben eine Funktion bei der Bildung des STM und des labilen ASM, während PKA Signale in den  $\alpha/\beta$  oder  $\gamma$  Loben für die Bildung dieser Gedächtniskomponenten benötigt werden.

Ein entscheidender Unterschied zwischen den beiden cAMP Effektoren besteht darin, dass PKA zusätzlich zu seiner Funktion bei der Bildung des STM und des labilen ASM, ebenfalls eine Funktion bei der Bildung des stabilen ARM besitzt (Abb. 19C). Bei der Bildung der stabilen Gedächtniskomponente werden PKA Signale innerhalb eines komplexen Netzwerkes benötigt, welches mehrere synaptische Schnittstellen (LNs-PNs-KCs) umfasst. Dabei werden PKA Signale offensichtlich sehr spezifisch innerhalb der LNs benötigt, da nur in den LNs des zweiten Typus (LNs2) eine Funktion von PKA bei der Bildung der stabilen Komponente aufgezeigt werden konnte.



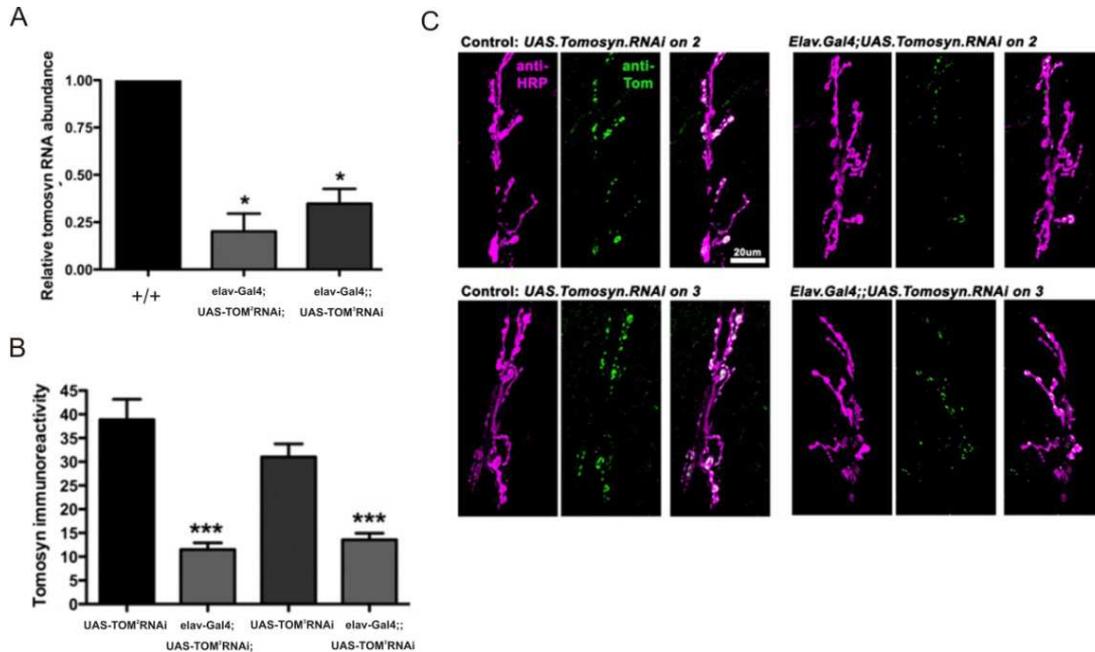
**Abbildung 19: Schematische Gegenüberstellung der PKA-spezifischen und EPAC-spezifischen Funktion bei der Bildung des STM, ASM und ARM.** PKA und EPAC Signale werden für die Bildung der unterschiedlichen Gedächtniskomponenten teilweise in den gleichen Gehirnregionen benötigt. Die schematische Gegenüberstellung gibt einen Überblick über die PKA-abhängigen Funktionen (rot markiert) und über die EPAC-abhängigen Funktionen (blau markiert) in den einzelnen Neuropilen des olfaktorischen Signalweges. LN1, lokale Interneurone Typ I; LN2, lokale Interneurone Typ II; PNs, Projektionsneurone; C, Calyx; P, Pedunculus;  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$  Lobensystem der MBs. PKA und EPAC Signale werden bei der Bildung des STM (A) und des ASM (B) in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben benötigt. Dabei ist EPAC in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben notwendig, wobei PKA Signale entweder in den  $\alpha/\beta$  oder  $\gamma$  Loben für die Bildung dieser Gedächtnisse benötigt werden. (C) EPAC Signale werden nicht für die Bildung des ARM benötigt, während PKA Signale in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben, den PNs und den LN2 für die Bildung dieser Gedächtniskomponente notwendig ist.

### 3.2 Der Einfluss des synaptischen Proteins Tomosyn auf die Gedächtnisbildung bei *Drosophila melanogaster*

Das präsynaptische Protein Tomosyn nimmt eine regulatorische Funktion bei der synaptischen Transmission ein, indem es das Vesikel-Priming und somit die kontrollierte Freisetzung von Neurotransmittern hemmt (Ashery et al., 2009; Gracheva et al., 2006; Sakisaka et al., 2008; Yamamoto et al., 2009). Untersuchungen an Vertebraten deuten darauf hin, dass Tomosyn direkt durch die cAMP-abhängige PKA phosphoryliert wird (Baba et al., 2005). Somit könnte Tomosyn möglicherweise ein wichtiger Effektor innerhalb des cAMP/PKA Signalweges sein, der eine Rolle beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung spielt. Eine Überexpression von Tomosyn im Hippocampus von Mäusen zeigt beispielsweise eine Beeinträchtigung des räumlichen Lernens und der Gedächtnisleistung (Barak et al., 2013). Inwiefern eine Herunterregulation von Tomosyn einen funktionellen Einfluss auf die Gedächtnisbildung bei *Drosophila* besitzt und in welchen Gehirnarealen eine Funktion von Tomosyn für die Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses benötigt wird, ist bisher nicht bekannt und soll im letzten Abschnitt dieser Arbeit näher untersucht werden.

Für die Analyse von Tomosyn wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Durch einen RNAi-Ansatz besteht die Möglichkeit, Tomosyn spezifisch in bestimmten Neuropilen des Gehirns herunterzuregulieren, um somit dessen Notwendigkeit bei der Gedächtnisbildung zu bestimmen. Des Weiteren ist durch die Verwendung einer Tomosyn-Mutante und eines Tomosyn-spezifischen Rettungskonstruktes die Möglichkeit gegeben, bestimmte Gehirnbereiche zu identifizieren, die für die Bildung eines Tomosyn-abhängigen Gedächtnisses hinreichend sind. Bevor jedoch der Einfluss von Tomosyn auf die Gedächtnisbildung mittels der aversiven olfaktorischen Duftkonditionierung analysiert werden konnte, wurden die verwendeten Tomosyn-spezifischen RNAi-Transgene, *UAS-tomosyn RNAi<sup>2</sup>* und *UAS-tomosyn RNAi<sup>3</sup>*, zunächst auf ihre Funktionalität hin getestet (Abb. 20; Chen and Richlitzki et al., 2011). Die beiden verwendeten RNAi-Transgene zeigten bei einer panneurale Expression mit *elav-GAL4* eine signifikante Reduktion von Tomosyn. Eine Messung der Tomosyn-mRNA erfolgte durch eine quantitative RT-PCR und zeigte, dass beide RNAi-Linien eine signifikante Reduktion der mRNA hervorrufen können, wobei die *UAS-tomosyn RNAi<sup>2</sup>* das mRNA Niveau von Tomosyn um 80% reduzierte und die *UAS-tomosyn RNAi<sup>3</sup>* um 65% (Abb. 20A). Um den Verlust des Tomosyn-Transkriptes auf Proteinebene zu bestimmen, wurde ein Antikörper gegen *Drosophila* Tomosyn generiert (Chen and Richlitzki et al., 2011). Wildtypische Larven des dritten Larvenstadiums zeigten eine starke anti-Tomosyn Färbung in den neuromuskulären Verbindungen (NMJs, neuromuscular junctions), während die *UAS-tomosyn RNAi<sup>2</sup>*-Linie ei-

ne Reduktion des Tomosyn Proteins um 70% und die UAS-*tomosyn* RNAi<sup>3</sup>-Linie eine Reduktion von 56% hervorrief (Abb. 20B+C). Dies entspricht in etwa der Reduktion des Tomosyn-mRNA Levels.



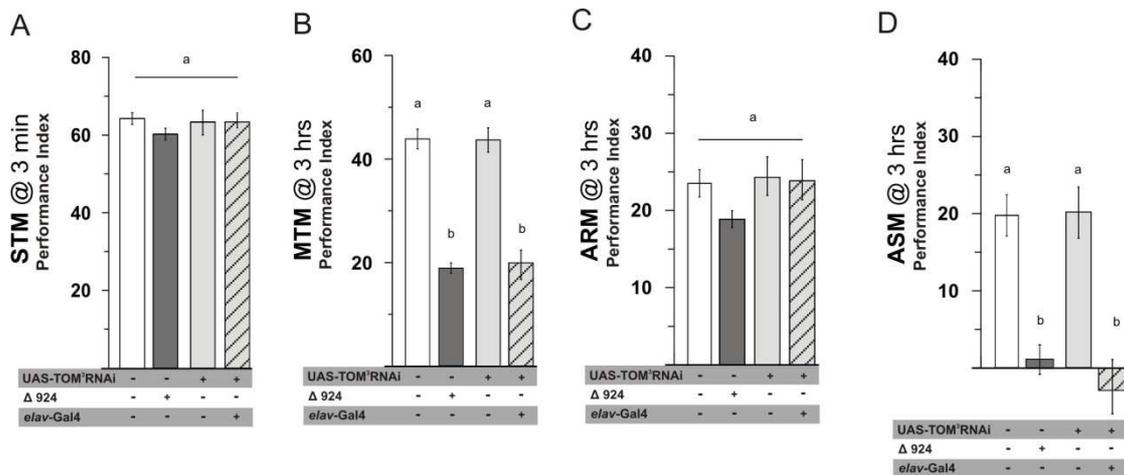
**Abbildung 20: Eine panneurale Manipulation reduziert Tomosyn auf RNA- und Proteinebene.** (A+B) Eine panneurale Expression der RNAi-Linien, UAS-*tomosyn* RNAi<sup>2</sup> und UAS-*tomosyn* RNAi<sup>3</sup>, führte zu einer signifikanten Reduktion der Tomosyn-mRNA quantifiziert mittels RT-PCR (A) und zu einem signifikanten Verlust der Tomosyn-Immunoreaktivität in neuromuskulären Verbindungen (NMJs, neuromuscular junctions) (B). (C) Konfokale Aufnahmen larvaler NMJs angefärbt mit anti-HRP, um neuronale Membranen zu visualisieren (magenta) und anti-tomosyn, um Tomosyn zu visualisieren (grün). (adaptiert aus Chen and Richlitzki et al., 2011)

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten RNAi-Linien fähig sind, die Tomosyn Expression signifikant herunterzuregulieren. Für die Untersuchungen der Funktion von Tomosyn bei der Gedächtnisbildung wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur die UAS-*tomosyn* RNAi<sup>3</sup>-Linie verwendet.

### 3.2.1 Tomosyn wird für die Bildung des ASM benötigt

Eine panneurale Expression der *tomosyn* RNAi<sup>3</sup> zeigte eine signifikante Reduktion des Proteins und konnte somit für eine funktionelle Analyse hinsichtlich der Gedächtnisbildung verwendet werden. Neben der spezifischen Tomosyn-RNAi wurde die Tomosynmutante  $\Delta 924$  für die Verhaltensanalyse verwendet (Abb. 21). Die panneurale Herunterregulation der Tomosynexpression durch die Treiberlinie *elav-Gal4*, sowie die Mutante  $\Delta 924$ , zeigten eine signifikante Reduktion des MTM (Abb. 21B), wobei das STM unbeeinträchtigt blieb und wildtypisch ausgebildet wurde (Abb. 21A). Eine Aufspaltung des MTM in seine einzelnen Kompo-

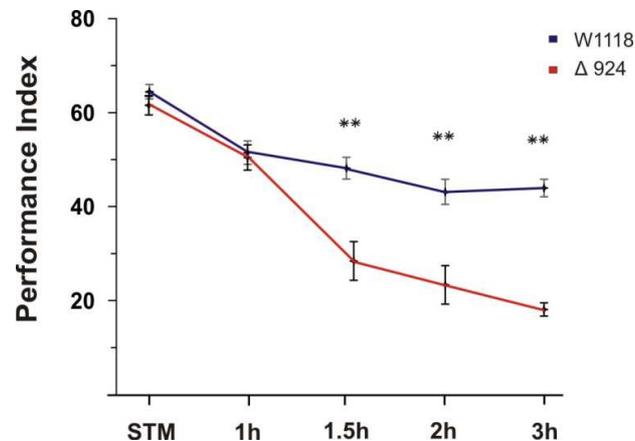
nennten mittels eines Kälteschocks zeigte einen kompletten Verlust der labilen Gedächtnisphase, ASM (Abb. 21D). Die stabile Komponente, ARM, blieb dabei unbeeinträchtigt (Abb. 21C). Da sowohl die Mutante als auch die *tomosyn* RNAi<sup>3</sup> keinen Effekt in der STM Gedächtnisleistung und in der ARM Gedächtnisleistung zeigten, deuten diese Ergebnisse auf eine spezifische Funktion von Tomosyn bei der Bildung des labilen ASM hin.



**Abbildung 21: Tomosyn wird für die Bildung des labilen ASM benötigt.** Die genetische Manipulation mit der *tomosyn* RNAi<sup>3</sup> und die Tomosynmutante Δ924 wurden in der aversiven olfaktorischen Konditionierung hinsichtlich ihres Einflusses auf die Gedächtnisbildung untersucht. **(A)** Eine panneurale Herunterregulation von Tomosyn durch die *tomosyn* RNAi<sup>3</sup> (gestreifter Balken) sowie die Tomosynmutante Δ924 (dunkelgrauer Balken) führte zu keiner Beeinträchtigung der STM Gedächtnisleistung. **(B)** Dementgegen zeigten beide Manipulationen eine signifikante Reduktion der MTM Gedächtnisleistung. Eine Aufspaltung des MTM in seine einzelnen Komponenten durch einen Kälteschock zeigte ein wildtypisches ARM **(C)**, während die labilen Komponente ASM komplett verloren ging **(D)**. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7-10. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p < 0.001$  an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von  $p \geq 0.05$  angegeben.

In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass Tomosyn durch PKA phosphoryliert wird (Baba et al., 2005). Inwiefern dies auch bei *Drosophila* zutrifft, ist bisher nicht bekannt. Die Ergebnisse aus Abb. 21 deuten jedoch auf eine Beteiligung des cAMP/PKA Signalweges hin, da sowohl PKA als auch Tomosyn eine Funktion bei der Bildung des ASM besitzen (Abb. 9D und Abb. 21D). Ferner moduliert cAMP die synaptische Transmitterausschüttung über PKA-abhängige Mechanismen (Seino and Shibasaki, 2005) beispielsweise durch die Phosphorylierung präsynaptischer Proteine wie Synapsin (Knappek et al., 2010). Bei einer näheren Untersuchung der zeitlichen Dynamik der einzelnen Gedächtniskomponenten zeigte die Tomosynmutante Δ924 nach einer anfänglich wildtypische Akquise und einem wildtypischen 1h Gedächtnis, eine rapide Reduktion der Gedächtnisleistung (Abb. 22). Eine ähnliche zeitliche Dynamik konnte bei einer Störung der AKAP-PKA Interaktion durch das Kompetitorpeptid UAS-*eCOPR2* gezeigt werden, die ebenfalls zu einem Verlust der labilen Komponente ASM führt

(Schwaerzel et al., 2007). Dies lässt auf eine mögliche Phosphorylierung von Tomosyn durch geankertes PKA schließen.



**Abbildung 22: Zeitliche Dynamik der Gedächtnisphasen im Wildtyp und in der Tomosynmutante Δ924.** Bei einem Vergleich mit dem Wildtyp W1118 zeigte die Tomosynmutante Δ924 nach einer anfänglichen normalen Akquise und einem wildtypischen 1h Gedächtnis eine rapide Reduktion in der Gedächtnisleistung. Nach 2h erreichte diese Abnahme einen stabilen Wert. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 8. Statistische Signifikanzen sind auf dem Level von  $p < 0.001$  angegeben.

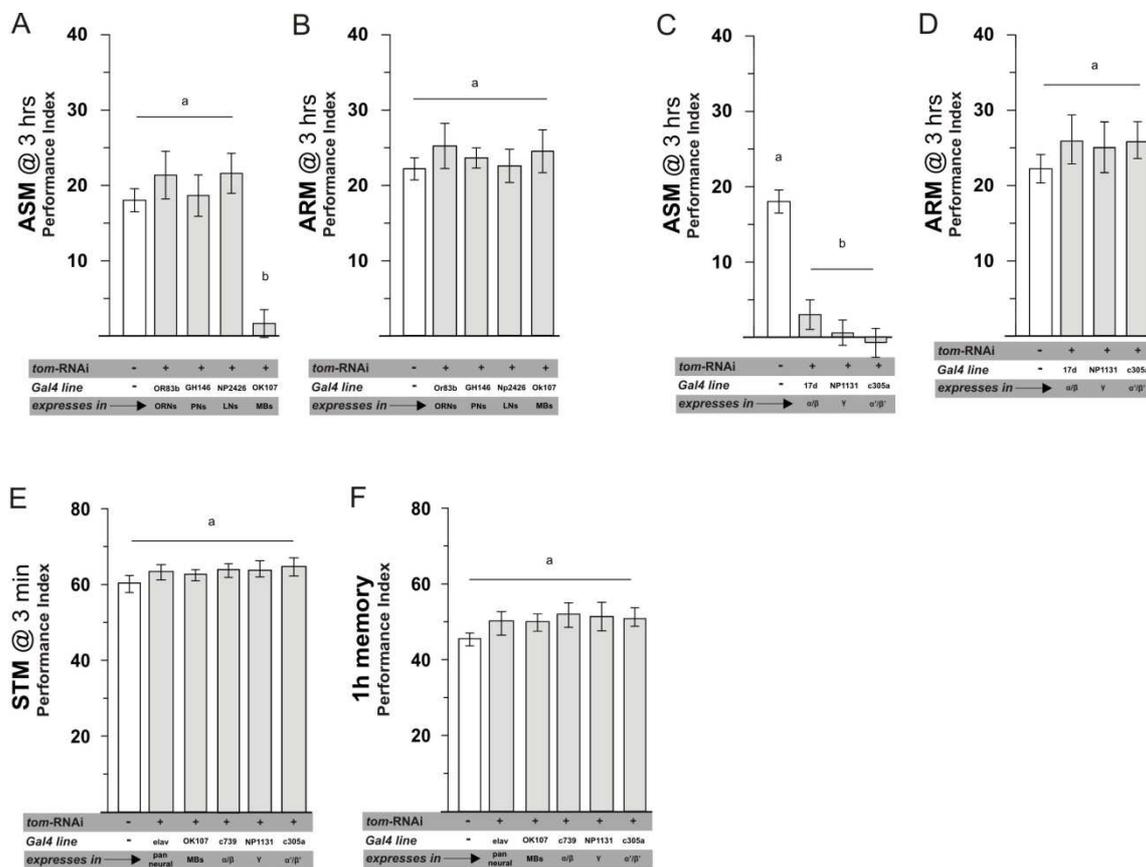
### 3.2.2 Tomosyn wird auf der Ebene der KCs für die Bildung des ASM benötigt

Tomosyn besitzt eine spezifische Funktion bei der Bildung der labilen Gedächtnis-komponente, ASM. Um die neuronalen Korrelate näher zu bestimmen, in denen Tomosyn für die Bildung der labilen Gedächtniskomponente notwendig ist, wurde die *tomosyn* RNAi<sup>3</sup>-Linie in den einzelnen Neuropilen des olfaktorischen Pfades exprimiert (Abb. 23). Dabei zeigte sich auf der Ebene der KCs, markiert durch die GAL4-Linie *OK107*, ein Verlust des labilen ASM. Auf der Ebene der ORNs, PNs und LNs konnte keine Beeinflussung dieser Gedächtnisphase beobachtet werden (Abb. 23A). Das stabile ARM wurde bei einer Herunterregulation von Tomosyn in allen verwendeten Linien wildtypisch ausgebildet (Abb. 23B). Die GAL4-Linie *OK107* markiert neben dem Lobensystem der Pilzkörper ( $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben) zusätzlich noch 103 LNs (Chou et al., 2010), so dass eine mögliche Beteiligung anderer Neuropile nicht ausgeschlossen werden konnte. Auf der Ebene der LNs wurde die GAL4-Linie *NP2426* verwendet, die jedoch keine Beeinträchtigung in der Gedächtnisleistung zeigte.

Für eine genauere Analyse der Tomosynfunktion in den einzelnen Neuropilen wurden weitere gewebespezifische GAL4-Linien verwendet. Eine Expression der *tomosyn* RNAi<sup>3</sup> in den spezifischeren GAL4-Linien *mb247* ( $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben), *GH298* und *NP1227* (LNs) führte jedoch zu einer Letalität der Individuen, so dass diese Linien nicht verwendet werden konnten. Möglicherweise exprimieren diese GAL4-Linien in entwicklungsrelevanten Strukturen, in denen

Tomosyn benötigt wird, um ein Überleben zu ermöglichen. Um dennoch die Funktion von Tomosyn innerhalb der KCs näher bestimmen zu können, wurden die lobenspezifischen GAL4-Linien *17d* ( $\alpha/\beta$  Loben), *NP1131* ( $\gamma$  Loben) und *305a* ( $\alpha'/\beta'$  Loben) verwendet (Abb. 23C). Eine Expression der *tomosyn* RNAi<sup>3</sup> führte in den einzelnen Loben ( $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  oder  $\gamma$  Loben) zu einem Verlust des ASM, wobei das ARM wildtypisch ausgebildet wurde (Abb. 23D). Das STM und das 1Stunden Gedächtnis blieben unbeeinträchtigt, was die zeitliche Dynamik der Tomosynfunktion zusätzlich unterstützt (Abb. 23E+F).

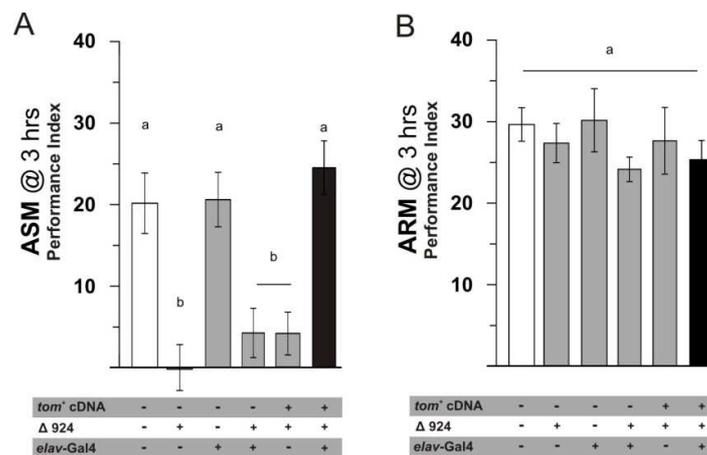
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine spezifische Tomosynfunktion innerhalb der MBs notwendig ist, wobei Tomosyn in den einzelnen Loben, den  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  und  $\gamma$  Loben benötigt wird, um die Bildung der labile Komponente des MTM zu unterstützen.



**Abbildung 23: Tomosyn wird auf der Ebene der KCs für die Bildung des ASM benötigt.** Eine gewebespezifische Manipulation von Tomosyn wurde verwendet, um innerhalb des olfaktorischen Pfades notwendige Neuropile zu bestimmen, die für die Bildung des ASM benötigt werden. (**A**, **B**) Die gezielte Manipulation mit der *tomosyn* RNAi<sup>3</sup> führte zu einem Verlust der ASM Gedächtnisleistung auf der Ebene der KCs durch die Linie *OK107*. Das konsolidierte ARM wurde wildtypisch ausgebildet. (**C**, **D**) Eine Herunterregulation von Tomosyn in den einzelnen Loben zeigte eine signifikante Beeinträchtigung des ASM in allen 3 Loben, markiert durch die Linien *17d* ( $\alpha/\beta$ ), *NP1131* ( $\gamma$ ) und *305a* ( $\alpha'/\beta'$ ), wobei das ARM wildtypisch ausgebildet wurde. (**E**, **F**) Das STM und das 1h Gedächtnis wurden wildtypisch ausgebildet. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7-11. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p < 0.001$  an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von  $p \geq 0.05$  angegeben.

### 3.2.3 Tomosyn ist in den $\gamma$ Loben der KCs für die Bildung des labilen ASM ausreichend

Mit Hilfe eines Tomosyn Rettungskonstruktes konnte nun untersucht werden, in welchen Teilen des Lobensystems Tomosyn minimal benötigt wird, um ein wildtypisches ASM auszubilden. Hierzu wurde ein UAS-*tomosyn*<sup>+</sup> Transgen im Mutantenhintergrund verwendet, welches eine tomosynspezifische cDNA enthielt, die das Tomosyn Protein unter Kontrolle einer UAS exprimiert. Zunächst wurde das Konstrukt unter Kontrolle des panneuralen Treibers *elav-GAL4* exprimiert und auf dessen Funktionalität hin getestet (Abb. 24). Das verwendete Konstrukt konnte eine wildtypische ASM Gedächtnisleistung wiederherstellen (Abb. 24A), wobei das ARM normal ausgebildet wurde (Abb. 24B). Die genetischen Kontrollen verhielten sich wildtypisch, so dass dieses Ergebnis auf eine Funktionalität des verwendeten Rettungskonstruktes hindeutet.

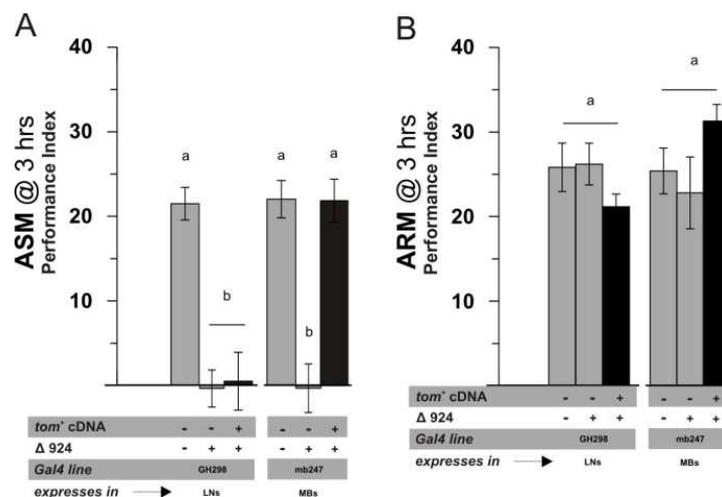


**Abbildung 24: Die tomosynspezifische cDNA ist funktionell in der Lage den ASM Effekt zu retten. (A)** Das verwendete Tomosynrettungskonstrukt UAS-*tomosyn*<sup>+</sup> cDNA im Mutantenhintergrund (schwarzer Balken) konnte die ASM Gedächtnisleistung auf Wildtypniveau wiederherstellen. Die genetischen Kontrollen zeigten im Mutantenhintergrund bzw. im Wildtyp Hintergrund entweder eine Reduktion des ASM oder eine wildtypische ASM Gedächtnisleistung. **(B)** Das ARM zeigte keine signifikanten Unterschiede. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7-11. Es wurden für diese Experimente nur Männchen gewertet. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p < 0.001$  an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von  $p \geq 0.05$  angegeben.

Eine Herunterregulation von Tomosyn in den spezifischen GAL4-Linien *mb247* und *GH298* führte zu einer Letalität der Individuen. Um die einzelnen Neuropile, die für die Ausbildung eines wildtypischen ASM minimal erforderlich sind dennoch bestimmen zu können, wurden diese beiden Treiberlinien zusammen mit dem Tomosynrettungskonstrukt im Mutantenhintergrund exprimiert (Abb. 25). Dabei zeigte sich eine spezifische Rettung der ASM Gedächtnisleistung in den KCs durch die Gal4-Linie *mb247* (Abb. 25A). Eine Expression der UAS-*tomosyn*<sup>+</sup> cDNA in den LNs zeigte keine Rettung des ASM. Zusammen mit dem Ergebnis,

dass eine Expression der *tomosyn* RNAi<sup>3</sup> in den LNs durch die Linie *NP2426* keine Beeinträchtigung in der ASM Gedächtnisleistung zeigte, lässt dies darauf schließen, dass Tomosyn in diesem Neuropil nicht für die Bildung eines wildtypischen ASM benötigt wird. Die ARM Gedächtnisleistung blieb in allen gemessenen Gruppen unbeeinträchtigt (Abb. 25B).

Diese Ergebnisse deuten auf eine spezifische Tomosynfunktion innerhalb der KCs hin, wobei das Vorhandensein von Tomosyn in den KCs ausreichend ist, um ein wildtypisches ASM auszubilden.

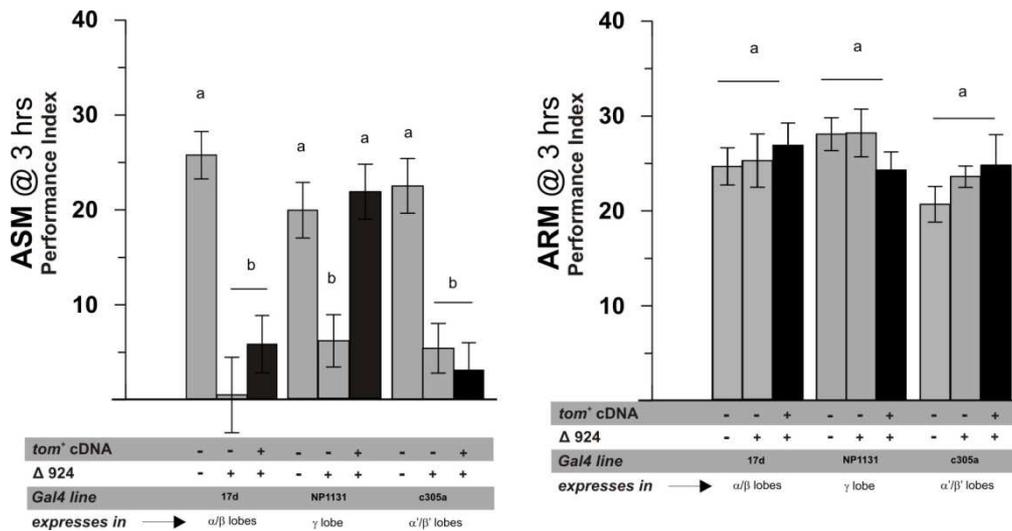


**Abbildung 25: Tomosyn ist auf der Ebene der KCs für die Bildung des ASM ausreichend.** Gewebespezifische Expression der *UAS-tomosyn*<sup>+</sup> cDNA im Mutantenhintergrund in den LNs und den KCs. **(A)** Die Wiederherstellung eines wildtypischen ASM benötigte die Expression der *UAS-tomosyn*<sup>+</sup> cDNA in den KCs durch die Gal4-Linie *mb247* (schwarzer Balken). **(B)** Das ARM wurde sowohl in den Effektorlinien, als auch in den genetischen Kontrollen wildtypisch ausgebildet. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte <sup>+/-</sup> SEM; n = 9-12. Es wurden für diese Experimente nur Männchen gewertet. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von p<0.001 an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von p≥0.05 angegeben.

Um die Rettung des ASM innerhalb der KCs näher zu untersuchen, wurde die *UAS-tomosyn*<sup>+</sup> cDNA in den einzelnen Loben der KCs exprimiert (Abb. 26). Dabei zeigte die Linie *NP1131*, die die  $\gamma$  Loben markiert, eine erfolgreiche Rettung der ASM Gedächtnisleistung. Eine Expression der *tomosyn*<sup>+</sup> cDNA in den beiden anderen Loben durch die Linien *17d* ( $\alpha/\beta$  Loben) und *c305a* ( $\alpha'/\beta'$  Loben) zeigte keine Rettung des ASM Effektes (Abb. 26A). Das ARM wurde bei allen verwendeten Linien und deren genetischen Kontrollen wildtypisch ausgebildet (Abb. 26B).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Tomosynfunktion innerhalb der  $\gamma$  Loben der KCs sowohl notwendig als auch hinreichend für die Bildung des labilen ASM ist. Jedoch kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass spezifischere GAL4-Linien ebenfalls eine hinreichende Tomosynfunktion in den anderen Loben bei der Bildung des ASM zeigen

könnten. Die hier verwendete GAL4-Linie *17d* markiert nur einen sehr kleinen Teil der  $\alpha/\beta$  Loben (Akmal et al., 2006). Im Zuge dessen wurden zusätzliche GAL4-Linien, die *c722* und die *c739*, getestet, die ebenfalls die  $\alpha/\beta$  Loben der KCs markieren und eine ASM Beeinträchtigung bei der Herunterregulation des Tomosyn-Proteins zeigten. Eine Expression der *tomosyn*<sup>+</sup> cDNA in diesen Linien führte jedoch auch zu keiner erfolgreichen Rettung (Daten nicht aufgeführt).



**Abbildung 26: Tomosyn ist innerhalb der KCs in den  $\gamma$  Loben für die Bildung des ASM hinreichend.** (A) Die Expression der UAS-*tomosyn*<sup>+</sup> cDNA in den  $\gamma$  Loben der KCs durch die Linie *NP1131* war ausreichend, um ein wildtypisches ASM zu bilden. Eine Rettung mit der cDNA in den anderen beiden Loben zeigte keine Wiederherstellung der ASM Gedächtnisleistung. (B) Das ARM wurde wildtypisch ausgebildet. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 9-12. Es wurden für diese Experimente nur Männchen gewertet. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen die statistischen Signifikanzen auf dem Level von  $p < 0.001$  an. Keine signifikanten Unterschiede werden auf dem Level von  $p \geq 0.05$  angegeben.

Zusammenfassend betrachtet zeigen diese Ergebnisse, dass Tomosyn eine spezifische Funktion bei der Bildung der labilen Gedächtnisphase ASM besitzt. Die zeitliche Dynamik der Gedächtnisleistung lässt eine mögliche Phosphorylierung durch PKA vermuten. Tomosyn ist in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben der MBs für die Bildung des ASM notwendig, wobei Tomosyn bereits in den einzelnen Loben ( $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  und  $\gamma$  Loben) eine Funktion besitzt. Eine Wiederherstellung des Tomosyn-Proteins in den  $\gamma$  Loben ist hinreichend, um ein wildtypisches ASM zu bilden.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte eine funktionelle Zuordnung der beiden cAMP Effektoren, PKA und EPAC, hinsichtlich ihres Einflusses bei der Bildung spezifischer Gedächtniskomponenten aufgezeigt werden. Das olfaktorische Gedächtnis besteht aus verschiedenen Gedächtniskomponenten, deren Bildung scheinbar durch unterschiedliche cAMP Signalwege moduliert werden können, die subzellulär und innerhalb neuronaler Netzwerke voneinander dissoziiert sind.

### 4.1 Aktivitätsabhängige PKA Signale werden innerhalb definierter Netzwerke für die Gedächtnisbildung benötigt

Die Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses ist sehr empfindlich gegenüber der vorhandenen PKA Aktivität. Mit Hilfe eines RNAi Ansatzes konnten mehrere funktionelle PKA Beteiligungen ermittelt werden, die spezifisch die Formation der einzelnen Gedächtniskomponenten (STM, ASM und ARM) fördern. Bisherige Arbeiten verwendeten Proteinkinaseinhibitoren oder hypomorphe Mutanten, um den Einfluss von PKA auf die Gedächtnisbildung zu untersuchen (Drain et al., 1991; Goodwin et al., 1997; Horiuchi et al., 2008; Li et al., 1996; Skoulakis et al., 1993). Ein großer Vorteil eines RNAi Ansatzes liegt jedoch darin, dass es möglich ist, gewebespezifisch die Aktivität eines Proteins herunterzuregulieren, um dessen Funktion innerhalb dieses Gewebes zu untersuchen (Brand and Dormand, 1995; Duffy, 2002). Somit konnten verschiedene PKA Signale innerhalb des neuronalen Netzwerkes identifiziert werden, die für die Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten benötigt werden. Im Allgemeinen ist ein gewebespezifischer RNAi Ansatz dadurch beschränkt, dass verschiedene GAL4-Linien unterschiedliche Expressionsstärken hervorrufen können, beispielsweise ist die Temperatur ein wichtiger Faktor, der die Expression negativ beeinflussen kann (Duffy, 2002). Um diese Unzugänglichkeit zu vermeiden, wurde eine progressive Manipulation gewählt, die die PKA Aktivität effektiv innerhalb eines definierten Expressionsmusters bei einer stabilen Temperatur von 30°C herunterregulierte. Somit wurde die funktionelle Zuordnung von PKA innerhalb des neuronalen Netzwerkes nur durch die Spezifität der einzelnen GAL4-Linien beschränkt.

Anhand der verwendeten GAL4-Linien konnten demzufolge zwei neuronale Netzwerke identifiziert werden, die an der Bildung der unterschiedlichen Gedächtniskomponenten beteiligt sind: erstens auf der Ebene der ALs und der MBs bei der Bildung des stabilen ARM, genauer gesagt in den LNs, den PNs und in den KCs der  $\alpha\beta$  und  $\gamma$  Loben (Abb. 12A,B + 13B,E) und zweitens auf der Ebene der  $\alpha\beta$  oder  $\gamma$  Loben bei der Bildung des labilen ASM und des STM (Abb. 13). Obwohl die Bildung des labilen ASM und des STM offensichtlich eine Funktion

von PKA in den gleichen Neuropilen erfordert, benötigen sie jedoch unterschiedliche PKA Aktivitätsschwellenwerte. Das STM zeigte bei der progressiven Manipulation der PKA Aktivität eine graduelle Abnahme der Gedächtnisleistung; je geringer die PKA Aktivität, desto größer die Reduktion der STM Gedächtnisleistung (Abb. 9A), während das labile ASM in einem „Alles oder Nichts-Prinzip“ beeinflusst wurde d.h. eine geringe Reduktion der PKA Aktivität zeigte keine Beeinträchtigung des ASM, während eine Reduktion der PKA Aktivität um 70% zu einem sofortigen Verlust führte (Abb.9D). Folglich konnten drei verschiedene PKA abhängige Signale identifiziert werden, die auf der Ebene der KCs aktivitätsabhängig agieren und spezifisch die Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten (STM, ASM, ARM) unterstützen.

Bisherige Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass verschiedene PKA Aktivitätsschwellenwerte unterschiedlich auf die Gedächtnisbildung wirken (Drain et al., 1991; Horiuchi et al., 2008; Li et al., 1996; Skoulakis et al., 1993). Kohärent mit diesen Befunden scheint es, als müsse mindestens 50% der wildtypischen PKA Aktivität vorhanden sein, um ein wildtypisches Lernen und eine wildtypische Gedächtnisleistung zu initiieren. Eine reduzierte PKA Aktivität zwischen 20% bis 50% beeinträchtigt die Formation des STM und des labilen ASM, während das stabile ARM unbeeinflusst bleibt. Erst eine weitere Reduktion der PKA Aktivität auf unter 10% führt zu einem Verlust der stabilen Komponente.

Diese Befunde deuten auf eine sehr spezifische subzelluläre Regulierung von PKA während der Formation der einzelnen Gedächtniskomponenten hin. Interessanterweise konnten in einer Studie zwei PKA-*DC0* Mutanten identifiziert werden, die einen gegenteiligen Einfluss von PKA bei der Bildung des stabilen ARM aufzeigen (Horiuchi et al., 2008). Diese beiden Mutanten besitzen eine veränderte PKA Aktivität von ~50%, zeigen jedoch erstaunlicherweise eine enorme Verbesserung in der ARM Gedächtnisleistung. Diese Verbesserung konnte allerdings nur innerhalb eines sehr schmalen PKA Aktivitätsfensters beobachtet werden (Horiuchi et al., 2008). Dies ist nicht unbedingt inkonsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit, sondern unterstützt eher die Vermutung, dass PKA eine modulatorische Funktion bei der Bildung des stabilen ARM besitzt. In Anbetracht dessen, dass eine stark herunterregulierte PKA Aktivität die Phosphorylierung stromabwärts gelegener Zielsubstrate wie Ionenkanäle oder synaptischer Proteine enorm einschränkt, ist ein Verlust der stabilen Gedächtniskomponente nicht verwunderlich.

#### 4.1.1 Akut vs. entwicklungsbedingte Auswirkungen einer stark herunterregulierten PKA Aktivität

Eine massive Manipulation der PKA Aktivität birgt einige Schwierigkeiten, da PKA innerhalb vieler zellulärer Prozesse benötigt wird und unter anderem auch während der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (Lane and Kalderon, 1993; Li et al., 1995). Einige Studien konnten eindeutig zeigen, dass eine starke Manipulation der katalytischen *DC0* Untereinheit schwerwiegenden Auswirkungen auf die Entwicklung der Fliegen zur Folge hat (Foster et al., 1984; Lane and Kalderon, 1993; Skoulakis et al., 1993).

Wie bereits erwähnt, führte erst eine starke panneurale Manipulation der PKA Aktivität zu einem Verlust der stabilen Gedächtniskomponente, ARM (Abb. 9). Weiterhin konnten bei diesen Fliegen morphologische Veränderungen, wie ein kleinerer Habitus und verkümmerte Flügel beobachtet werden. Diese Befunde lassen auf eine entwicklungsbedingte Beeinflussung einer stark herunterregulierten PKA Aktivität schließen. Allerdings sprechen trotz allem einige Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls für eine akute Funktion von PKA bei der Bildung des stabilen ARM.

Eine starke panneurale Manipulation führte bei einer Aufzucht unter verschiedenen Temperaturregimen (24°C vs. 30°C) zu einem Verlust des stabilen ARM (Abb. 14). Bei einer geringeren Aufzuchttemperatur wird die Effektivität der Manipulation etwas geschwächt, folglich wird die PKA Aktivität nicht ganz so stark herunterreguliert. Wie hoch die verbliebene PKA Aktivität bei einer Aufzuchttemperatur von 24°C tatsächlich ist, konnte im Zuge dieser Arbeit nicht mehr bestimmt werden. Dies wird jedoch derzeit in einem Folgeexperiment mit Hilfe eines PKA Aktivitätsassays ermittelt. Allerdings zeigten sich die morphologischen Defizite, die bei einer höheren Aufzuchttemperatur beobachtet werden konnten, bei einer geringeren Aufzuchttemperatur nicht mehr.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für die Bildung des stabilen ARM PKA Signale in Neuropilen des olfaktorischen Weges erforderlich sind, die sich offensichtlich von denen unterscheiden, die für die Bildung des STM und des ASM benötigt werden d.h. auf der Ebene der LNs und der PNs. Bei einer starken Reduktion der PKA Aktivität in diesen Neuropilen wurde spezifisch das stabile ARM beeinträchtigt, während das STM und das ASM wildtypisch ausgebildet wurden (Abb. 12A,B). Demnach scheinen die nötigen Gehirnstrukturen, die für die Bildung olfaktorischer Gedächtnisse benötigt werden, adäquat zu funktionieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass trotz einer starken Manipulation von PKA die sensorischen Reize adäquat verarbeitet werden können (Tab. 2). Durch eine restriktive Herunterregulation von PKA in der adulten Fliege, konnte bereits eine akute Funktion von PKA bei der

Bildung des STM aufgezeigt werden. Jedoch müssten weitere Gedächtniskomponenten, insbesondere das ARM getestet werden, um eine eindeutige Dissoziation zwischen der akuten und der entwicklungsbedingten Funktion von PKA aufzeigen zu können.

## 4.2 EPAC besitzt eine Funktion bei der Bildung spezifischer Gedächtniskomponenten

Die Regulierung der synaptischer Transmitterausschüttung spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses (Kandel and Schwartz, 1982). Anhand diverser Mutanten konnte der intrazelluläre cAMP Signalweg als ein wichtiger Bestandteil identifiziert werden, der die Transmitterausschüttung moduliert (Renger et al., 2000; Zhong et al., 1992; Zhong and Wu, 1991). Generell wird angenommen, dass dabei die Aktivierung der cAMP abhängige PKA einen entscheidenden Stellenwert einnimmt. PKA besitzt die Fähigkeit verschiedene Ionenkanäle (Kandel and Schwartz, 1982) oder Proteine, die direkt an der Transmitterausschüttung beteiligt sind, zu phosphorylieren (Baba et al., 2005; Hepp et al., 2002; Jovanovic et al., 2001; Risinger and Bennett, 1999; Trudeau et al., 1996). Mit der Entdeckung des cAMP Effektors EPAC (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998) konnte jedoch neben PKA ein weiterer wichtiger Effektor identifiziert werden, der in verschiedenen neuronalen Systemen eine Funktion bei der Regulierung der Transmitterausschüttung besitzt (Kaneko and Takahashi, 2004; Sakaba and Neher, 2003; Zhong and Zucker, 2005).

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass EPAC spezifisch die Bildung des STM und des labilen ASM in *Drosophila* unterstützt (Abb. 15B,E). Demnach scheint die Bildung dieser Gedächtniskomponenten sehr viel komplexer zu sein, als bisher vermutet wurde (siehe auch Diskussion 4.4). EPAC wirkt in Anwesenheit von cAMP als ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor für kleine G-Proteine wie beispielsweise Rap1 und Rap2 der RAS Superfamilie (Bos, 2003; de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998), indem es den Austausch von GDP zu GTP vermittelt (Harper et al., 2008). Vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, dass EPAC unabhängig von PKA bei der cAMP induzierten synaptischen Potenzierung der Transmitterausschüttung beteiligt ist (Cheung et al., 2006). Folglich nehmen sowohl PKA als auch EPAC eine aktive Rolle bei der Regulierung synaptischer Prozesse ein, die der Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten zu Grunde liegen. EPAC besitzt eine Vielzahl unterschiedlicher struktureller Domänen, die eine komplexe Beteiligung unterschiedlicher Bindungspartner vermuten lässt (Bos, 2006). Beispielsweise bindet EPAC spezifisch an das Vesikelprotein Rim (Ozaki et al., 2000), einem mit Rab3 interagierenden Molekül, welches prä-synaptisch die Anhäufung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen und die Größe des RRP (Ready Releasable Pool)

reguliert (Graf et al., 2012). Demnach könnte ein Verlust von EPAC dazu führen, dass die durch Rim vermittelten synaptischen Prozesse unterbunden werden, was eine Reduktion der präsynaptischen Transmitterausschüttung zur Folge hätte. Zukünftig wird es von großem Interesse sein, die komplexen molekularen Mechanismen des EPAC Signalweges genauer zu analysieren, um die genauen Zusammenhänge bei der Bildung EPAC abhängiger Gedächtniskomponenten zu verstehen.

### **4.3 Unterschiedliche cAMP Signale modulieren die Bildung spezifischer Gedächtniskomponenten**

Eine Regulierung des intrazellulären cAMP Spiegels und die damit verbundene Aktivität spezifischer cAMP Effektoren und deren Substrate sind für die Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses unabdingbar. Erst kürzlich wurden zwei cAMP Signale identifiziert, die unterschiedliche Funktionen bei der Bildung olfaktorischer Gedächtniskomponenten besitzen. Ein cAMP Signal ist sensitiv gegenüber einer  $\text{Ca}^{2+}$ / Calmodulin-abhängigen Adenylatcyclase Typ 1, die durch *rutabaga* codiert wird, während das andere cAMP Signal sensitiv gegenüber einer durch *dunce* kodierten cAMP-spezifischen Phosphodiesterase Typ 2 ist (Chen et al., 1986; Dudai et al., 1976; Levin et al., 1992; Tully and Quinn, 1985). Das MTM besteht aus zwei funktionell voneinander unterscheidbaren Gedächtniskomponenten, dem labilen ASM und dem stabilen ARM (Quinn and Dudai, 1976). Die Bildung dieser beiden Gedächtniskomponenten wird von unterschiedlichen cAMP Signalen unterstützt, wobei gezeigt werden konnte, dass *rut*-abhängige cAMP Signale für die Bildung des labilen ASM benötigt werden, während *dnc*-abhängige cAMP Signale bei der Bildung des stabilen ARM eine Rolle spielen (Scheunemann et al., 2012). Demnach scheint das cAMP Signalnetzwerk einen dualen Charakter zu besitzen, der die Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten parallel und unabhängig voneinander fördert. Konsistent mit diesen Befunden, konnte in dieser Arbeit eine komplexe Beteiligung der beiden cAMP Effektoren, PKA und EPAC, bei der Bildung *rut*-abhängiger und *dnc*-abhängiger Gedächtniskomponenten festgestellt werden. EPAC zeigte eine Funktion bei der Bildung des labilen ASM, was darauf schließen lässt, dass EPAC stromabwärts des *rut*-abhängigen cAMP Signalweges agiert. Hingegen zeigte eine graduelle Herunterregulierung von PKA eine weitaus komplexere Beteiligung bei der Bildung der verschiedenen Gedächtniskomponenten (siehe auch Diskussion 4.1). Folglich werden PKA Signale sowohl für die Bildung der *rut*-abhängigen als auch für die Bildung der *dnc*-abhängigen Gedächtniskomponente benötigt.

Sowohl PKA als auch EPAC zeigten bereits beim STM einen Einfluss auf die Gedächtnisleistung. In einem derzeitigen Model zur Dynamik des Gedächtnisses wird davon ausgegangen, dass die labile Gedächtniskomponente direkt nach dem Training ausgebildet wird und über die Zeit hinweg graduell abnimmt, während sich die stabile Gedächtniskomponente erst nach dem Training graduell entwickelt wird und über einen längeren Zeitpunkt stabil erhalten bleibt (Quinn and Dudai, 1976). Neuere Befunde konnten jedoch bereits beim STM eine labile (dynamische) und eine stabile (basale) Gedächtniskomponente identifizieren (Knapek et al., 2011; Scheunemann et al., 2013). Inwiefern die beiden STM Komponenten möglicherweise als Vorläufer der beiden MTM Komponenten zu betrachten sind, ist bisher unbekannt. Jedoch zeigen Untersuchungen an diversen Mutanten des cAMP Signalweges zumeist bereits beim STM eine Reduktion der Gedächtnisleistung (Dudai et al., 1976; Folkers et al., 1993; Knapek et al., 2010; Knapek et al., 2011; Livingstone, 1985; Scheunemann et al., 2012). Demnach könnte die in dieser Arbeit identifizierte STM Beteiligung von EPAC und PKA möglicherweise ebenfalls eine duale Funktion von cAMP widerspiegeln. Demzufolge wäre es interessant zu untersuchen, ob bei EPAC oder PKA eher die stabile oder die labile STM Komponente betroffen ist.

#### **4.4 Die Integration *rutabaga*-abhängiger cAMP Signale**

##### **4.4.1 *Rut*-abhängige Gedächtniskomponenten können innerhalb der KCs durch unterschiedliche Signalwege gebildet werden**

Bei der olfaktorischen Konditionierung wird eine Assoziation zwischen einem Duft (CS) und einem US erlernt. Die Integration der Information dieser beiden Stimuli ist abhängig von einer dualen Stimulierung der *rut*-Adenylatcyclase, die als „Koinzidenzdetektor“ fungiert und einerseits durch die  $Ca^{2+}$ / Calmodulin und andererseits durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor aktiviert wird (Gervasi et al., 2010; Levin et al., 1992; Livingstone et al., 1984; Tomchik and Davis, 2009). Dabei gelten die KCs der MBs als eine notwendige Struktur, die an der CS/US Integration und somit an der Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses beteiligt sind (Connolly et al., 1996; Heisenberg, 2003; Zars et al., 2000). Die KCs können in unterschiedliche Substrukturen unterteilt werden, u.a. in die  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  und  $\gamma$  Loben (Crittenden et al., 1998; Lee et al., 1999; Technau and Heisenberg, 1982). *Rut* wird vorrangig in den einzelnen Loben exprimiert (Han et al., 1992), wobei *rut*-abhängige cAMP Signale synergistisch in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben für die Bildung des labilen ASM und des STM benötigt werden (Scheunemann et al., 2012). In diesen neuronalen Strukturen konnte ebenfalls eine Notwendigkeit von PKA und EPAC bei der Bildung dieser Gedächtniskomponenten festgestellt wer-

den. Jedoch scheint im Fall von PKA eine andere Beteiligung der KCs der einzelnen Subsysteme notwendig zu sein. Die Analyse deutet auf eine funktionelle Redundanz zwischen den PKA Signalen innerhalb der  $\alpha/\beta$  oder  $\gamma$  Loben bei der Bildung des labilen ASM (Vergleich Abb. 13C+F mit 13I+L) und des STM (Vergleich 13A+D mit 13G+H) hin, während *rut*-abhängige cAMP Signale in den KCs der  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben erforderlich sind (Scheunemann et al., 2012). Für diese Diskrepanz könnte es mehrere mögliche Erklärungen geben.

Spezifische Düfte aktivieren eine relativ begrenzte Population innerhalb der KCs, demnach besitzen individuelle KCs eine hohe duftspezifische Antwort (Akalal et al., 2006; Honegger et al., 2011; Murthy et al., 2008). In dieser Arbeit wurden andere Düfte verwendet, als in der obigen Studie. Eine Möglichkeit wäre folglich, dass ein anderes Aktivitätsmuster innerhalb der einzelnen KCs generiert wurde und somit eine funktionell unterschiedliche duftspezifische Antwort hervorgerufen wurde. Die in beiden Studien verwendete GAL4-Linie *17d* beispielsweise markiert nur eine sehr begrenzte Population KCs innerhalb der  $\alpha/\beta$  Loben und wurde als eine GAL-4 Linie identifiziert, die duftspezifische Effekte hervorrufen kann (Akalal et al., 2006). Des Weiteren zeigen einige Studien in Abhängigkeit der verwendeten *rut*-Allele, widersprüchliche Befunde hinsichtlich der Notwendigkeit der unterschiedlichen KCs Subtypen bei der Bildung *rut*-abhängiger Gedächtniskomponenten (Akalal et al., 2006; McGuire et al., 2003; Scheunemann et al., 2012; Zars et al., 2000).

Alternativ dazu aktivieren *rut*-abhängige cAMP Signale nicht einzig und alleine PKA als mögliches Zielsubstrat, sondern auch zusätzliche Substrate wie EPAC (Bos, 2006; de Rooij et al., 1998), welches ebenfalls die Bildung des labilen ASM und des STM in den einzelnen Subtypen der KCs unterstützt (Abb. 16A+B). Die letztere Alternative würde vorzugsweise zu einem Szenario führen, in dem *rut*-abhängige cAMP Signale parallel innerhalb der einzelnen Subsysteme verschiedene Signalwege aktivieren, einen cAMP/PKA abhängigen Signalweg und einen cAMP/EPAC abhängigen Signalweg. Beide Signalwege unterstützen die Bildung des STM und des labilen ASM in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben, wobei EPAC in Bezug auf PKA innerhalb der KCs der einzelnen Loben eine redundante Funktion einnehmen kann d.h. wenn PKA in einem Subsystem wegfällt, können dennoch beide Gedächtniskomponenten über den cAMP/EPAC Signalweg gebildet werden. Andersherum scheint es jedoch nicht der Fall zu sein, da eine Funktion von EPAC in allen KCs der Loben für die Bildung des STM und des ASM benötigt wird. Eine mögliche Erklärung könnten die einzigartigen Signaleigenschaften von EPAC bieten. EPAC kann aufgrund seiner strukturell unterschiedlichen Domänen eine Vielzahl verschiedener Zielsubstrate binden und aktivieren (Bos, 2006; Harper et al., 2008), die direkt an der Regulation der Transmitterausschüttung beteiligt sind. Dabei scheint EPAC

---

jedoch nicht direkt die Größe des RRP's zu beeinflussen, sondern wirkt spezifisch auf die synaptischen Vesikel, die unmittelbar vor der Ausschüttung stehen (Kaneko and Takahashi, 2004; Sakaba and Neher, 2003).

Aus Studien in *Mammalia* ist bekannt, dass diverse zelluläre Prozesse durch eine cAMP bedingte duale Stimulation von PKA und EPAC moduliert werden können (zusammengefasst in Schmidt et al., 2013), wobei die aktivierten Signalwege entweder unabhängig voneinander, synergistisch oder entgegengesetzt agieren können. Ob die beiden hier identifizierten Signalwege innerhalb der KCs der einzelnen Loben miteinander agieren, können die vorliegenden Daten dieser Arbeit nicht eindeutig klären. Interessanterweise gibt es jedoch eine Vielzahl synaptischer Proteine, die sowohl von EPAC als auch von PKA aktiviert werden können. Beispielweise agiert das durch EPAC aktivierte synaptische Protein Rim als ein großes molekulares Gerüstprotein, welches andere synaptische Proteine binden kann, von denen einige auch von PKA phosphoryliert werden können (Powell, 2006).

#### **4.4.2 *Rut*-abhängige Gedächtniskomponenten können durch unterschiedliche PKA Signale dissoziiert werden**

Intrazellulär kann PKA durch A-Kinase Ankerproteine (AKAPs) in spezifische subzelluläre Kompartimente organisiert werden, wodurch eine räumliche und eine zeitliche Regulierung lokaler cAMP Gradienten erfolgen kann (Wong and Scott, 2004). Das *rut*-abhängige STM und das labile ASM kann auf der Ebene von AKAPs dissoziiert werden. Eine Störung der AKAP-PKA Interaktion durch das Kompetitorpeptid eCOPR2 zeigt eine Notwendigkeit der AKAPs bei der Bildung des labilen ASM in den KCs der  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben, während das STM keine AKAP Beteiligung benötigt (Schwaerzel et al., 2007). Zwei Befunde dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass ein spezifischer PKA-AKAP Komplex für die Bildung des ASM benötigt wird. Erstens, bei einer progressiven Herunterregulierung von PKA konnte ein abrupter und vollständiger Verlust des ASM ab einer reduzierten PKA Aktivität von 30% beobachtet werden. Dementgegen zeigte das STM eine graduelle Reduktion der Gedächtnisleistung, was sich gut mit den Befunden einer graduellen Akquise der STM Gedächtnisleistung in Einklang bringen lässt (Scheunemann et al., 2013; Tully and Quinn, 1985). Zweitens, das präsynaptische Protein Tomosyn, ein Phosphorylierungssubstrat von PKA (Baba et al., 2005), wird spezifisch für die Bildung des ASM benötigt (Chen and Richlitzki 2011; Abb. 21).

Interessanterweise scheint das *rut*-abhängige ASM jedoch nicht einzig und allein eine PKA-AKAP-Tomosyn Verbindung zu benötigen, sondern erfordert ebenfalls eine Beteiligung des synaptischen Proteins Synapsin. Synapsin ist ein weiteres Phosphorylierungssubstrat von

PKA, welches offensichtlich jedoch nicht durch geankerte PKA phosphoryliert wird, da es die Bildung des labilen ASM und die Bildung des STM unterstützt (Godenschwege et al., 2004; Knappek et al., 2010; Michels et al., 2011). Demzufolge scheinen unterschiedliche PKA Pools vorhanden zu sein, frei verfügbares und gebundenes PKA, die selektiv aktiviert werden können, um unterschiedliche Funktionen bei der Bildung spezifischer Gedächtniskomponenten einzunehmen. Dabei können die unterschiedlichen PKA Signalwege jedoch miteinander interagieren, wie es bei der Bildung des ASM der Fall zu sein scheint. Eine Phosphorylierung von Synapsin reguliert die Vesikelabgabe vom Reserve Pool zur aktiven Zone (Akbergenova and Bykhovskaia, 2010), während eine Phosphorylierung von Tomosyn die Bildung des SNARE Komplexes reguliert (Baba et al., 2005). Folglich führt eine Phosphorylierung beider Proteine zu einer erhöhten Vesikelabgabe, welches für die Bildung des ASM benötigt wird.

#### **4.4.3 Model zur Bildung *rut*-abhängiger Gedächtniskomponenten**

Generell wird angenommen, dass sowohl die  $\alpha/\beta$  als auch die  $\gamma$  Loben funktionell bei der Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses involviert sind (Cervantes-Sandoval et al., 2013; Isabel et al., 2004; Qin et al., 2012; Xie et al., 2013). Eine durch den Duft erzeugte Aktivität ist in allen Subsystemen der MBs zu beobachten (Honegger et al., 2011; Turner et al., 2008) und die Information des aversiven Stimulus wird durch verschiedene dopaminerge Neurone sowohl an die  $\alpha/\beta$  als auch an die  $\gamma$  Loben weitergeleitet (Aso et al., 2010; Claridge-Chang et al., 2009; Waddell, 2013). Des Weiteren zeigen Befunde aus optisch bildgebenden Verfahren eine *rut*-abhängige Beeinflussung von cAMP und PKA in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben der MBs (Gervasi et al., 2010; Tomchik and Davis, 2009). Konsistent mit diesen Befunden konnte innerhalb dieser neuronalen Strukturen eine Funktion von EPAC, PKA und Tomosyn bei der Bildung der *rut*-abhängigen Gedächtniskomponenten festgestellt werden.

Interessanterweise führt eine simultane Stimulation von Dopamin (US Signalweg) und Acetylcholin (CS Signalweg) nur in den  $\alpha$  Loben der MBs zu einer *rut*-abhängige Aktivität von PKA, während eine *dnc*-abhängige Aktivität von PKA in allen Subtypen der MBs festgestellt werden kann (Gervasi et al., 2010). Gervasi und Kollegen schlussfolgerten daraus, dass eine Dopamin-induzierte Aktivierung von PKA möglicherweise durch die *dnc*-PDE auf die  $\alpha$  Loben beschränkt wird, indem sie cAMP in den  $\beta$  und  $\gamma$  Loben degradiert (Gervasi et al., 2010). Folglich würden *rut*-abhängige cAMP/PKA Signale nur in den  $\alpha$  Loben der MBs die Bildung des labilen ASM und STM unterstützen, während in den  $\beta$  und  $\gamma$  Loben die Bildung dieser Gedächtniskomponenten durch die *dnc*-PDE gehemmt wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben PKA auch EPAC eine Funktion bei der Bildung des STM und des ASM

in den einzelnen Subtypen der MBs besitzt. Nun könnte man spekulieren, ob diese Befunde eine mögliche Verknüpfung zu der von Gervasi und Kollegen aufgestellten Hypothese darstellen könnten. Eine attraktive Schlussfolgerung wäre demzufolge, dass *rut*-abhängige cAMP/PKA Signale die Bildung des labilen ASM und des STM in den  $\alpha$  Loben der MBs fördern, während *rut*-abhängige cAMP/EPAC Signale möglicherweise die Bildung des labilen ASM und des STM in den  $\alpha/\beta$  oder  $\gamma$  Loben unterstützen könnten.

Bedenklich an dieser Hypothese ist jedoch, dass eine Expression von Tomosyn allein in den  $\gamma$  Loben hinreichend ist, um das labile ASM auszubilden (Abb. 24). Für diese Diskrepanz könnte es mehrere Erklärungen geben. Zunächst einmal unterscheiden sich die verwendeten Methoden maßgeblich voneinander. Beim optischen Imaging werden stimulierende Flüssigkeiten verwendet, wobei Acetylcholin (CS) und Dopamin (US) direkt auf die Neuropile appliziert werden (Gervasi et al., 2010), während bei einer klassischen olfaktorischen Konditionierung die sensorischen Wege durch einen Duft (CS) gepaart mit einem Elektroschock (US) stimuliert werden (Tully and Quinn, 1985). Des Weiteren wurden in dieser Arbeit andere GAL4-Linien verwendet, als in der obigen Studie. Es ist bekannt, dass unterschiedliche GAL4-Linien spezifische Expressionsmuster hervorrufen können (Tanaka et al., 2008; Yang et al., 1995). Zudem könnte auch die Möglichkeit bestehen, dass der in der obigen Studie verwendete PKA Sensor nicht die gesamte intrazelluläre PKA Aktivität detektieren konnte. Demzufolge wäre eine PKA-AKAP abhängige Aktivierung von Tomosyn in den KCs der  $\gamma$  Loben möglich. Dies wäre auch konsistent mit zahlreichen Studien, die eine kritische Rolle der  $\gamma$  Loben bei der Gedächtnisbildung demonstrieren (Akalal et al., 2010; Blum et al., 2009b; Boto et al., 2014; Qin et al., 2012; Zars et al., 2000; Zhang and Roman, 2013). Kürzlich konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Rettung des D1-ähnlichen Dopaminrezeptors in den  $\gamma$  Loben hinreichend ist, um olfaktorische Gedächtniskomponenten zu bilden (Qin et al., 2012).

Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in den  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben führt zu einer Aktivierung unterschiedlicher Signalwege, die teilweise unabhängig voneinander die Bildung *rut*-abhängiger Gedächtniskomponenten unterstützen. Zusätzlich können bei der Bildung des *rut*-abhängigen ASM unterschiedliche PKA Signalwege selektiv aktiviert werden. Demnach scheint die Bildung *rut*-abhängiger Gedächtniskomponenten ein wesentlich komplexeres Signalnetzwerk zu erfordern, als bisher vermutet wurde. Folglich stellt sich die Frage, wie die unterschiedlichen Signalwege innerhalb der gleichen Neuropile reguliert werden könnten. Folgende Überlegungen liefern möglicherweise einen interessanten Ansatz.

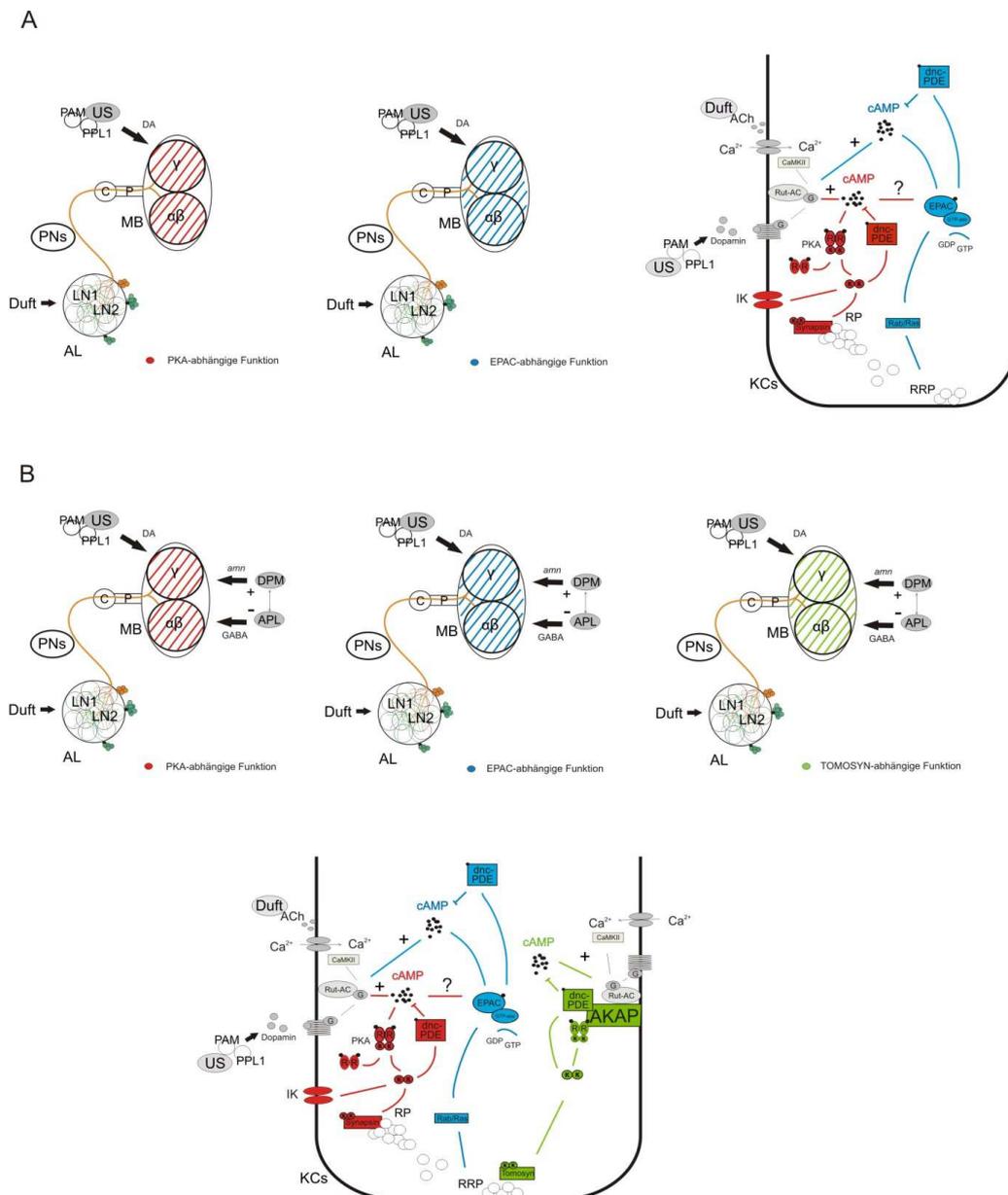
cAMP ist nicht diffus intrazellulär lokalisiert, sondern akkumuliert in der Nähe der Plasmamembran in lokale Mikrodomänen, die räumlich und zeitlich durch ACs und PDEs reguliert

werden können (Soderling and Beavo, 2000; Willoughby and Cooper, 2007). Interessanterweise kann nicht nur PKA durch eine AKAP Interaktion in räumlich getrennte Mikrodomänen lokalisiert werden, sondern auch EPAC ist aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften fähig, direkt in Nähe seiner Zielsubstrate an die Plasmamembran zu binden (Bos, 2006; Ponsioen et al., 2009). Demzufolge könnten PKA und EPAC in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sein. Ursprünglich wurde angenommen, dass PKA und EPAC unterschiedliche Affinitäten gegenüber der intrazellulären cAMP Konzentration besitzen (Bos, 2003). Neuere Befunde zeigen jedoch, dass beide Effektoren eine ähnliche cAMP Affinität besitzen, sich jedoch in ihren cAMP Bindedomänen strukturell unterscheiden (Dao et al., 2006). Der genaue Mechanismus ist noch weitergehend unklar, jedoch könnten die unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften der beiden Effektoren einen möglichen Ansatz einer unterschiedlichen Regulation innerhalb der gleichen Neuropile darstellen.

Eine weitere Möglichkeit um innerhalb der MBs unterschiedliche Signalwege zu modulieren, könnte der Input durch modulatorische Neurone, wie z.B. Dopaminsignale, sein (Aso et al., 2012; Aso et al., 2010; Claridge-Chang et al., 2009; Mao and Davis, 2009). Dopaminerge Neurone sind über verschiedene Dopaminrezeptoren an den cAMP Signalweg gekoppelt und vermitteln den dopaminergen Stimulus an die einzelnen Subsysteme der MBs (Han et al., 1996; Kim et al., 2003). Dabei können sie eine regulatorische Funktion einnehmen. Beispielsweise spielen dDA1 Rezeptoren eine Rolle bei der Akquise/Initiierung von Gedächtnissen, während den DAMB Rezeptoren eine Funktion beim Vergessen frisch akquirierter labiler Gedächtnisse zugeordnet werden konnte (Berry et al., 2012; Kim et al., 2007; Placais et al., 2012). Zudem scheinen die einzelnen Subsysteme unterschiedliche dopaminabhängige Sensitivitäten zu besitzen (Boto et al., 2014).

Die Bildung des ASM könnte zusätzlich durch verschiedene inhibitorische und exzitatorische Neurone (DPM-Neurone und APL-Neurone) reguliert werden, die eine negative KCs-DPM-APL Rückkopplungsschleife bilden, um spezifisch das ASM zu stabilisieren (Ganguly and Lee, 2013; Keene et al., 2004; Pitman et al., 2011; Waddell et al., 2000; Wu et al., 2011; Yu et al., 2005). Darüber hinaus regulieren GABAerge APL-Neurone die Initiierung des olfaktorischen Gedächtnisses, was unabhängig von ihrer stabilisierenden Funktion des labilen ASM erfolgen kann (Liu and Davis, 2009; Liu et al., 2007). Auch eine direkte Interaktion zwischen den einzelnen Loben der MBs, die über intrinsische und extrinsische Neuronen erfolgen kann (Ito et al., 1998; Tanaka et al., 2008), könnte zu einer möglichen Modulation verschiedener Signalwege innerhalb der gleichen Gehirnstrukturen beitragen. Letztendlich bieten diese Ansätze eine Reihe möglicher Regulationsmechanismen. Jedoch wird es zukünftig von großem

Interesse sein, die genauen Zusammenhänge zu studieren, um die komplexen Netzwerkstrukturen und Signalwege, die bei der Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses erforderlich sind, besser verstehen zu können.



**Abbildung 27: Modellvorstellung zur Bildung *rut*-abhängiger Gedächtniskomponenten.** *Rut*-cAMP abhängige PKA und EPAC Signale werden in den KCs der  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben für die Bildung des STM (A) und des ASM (B) benötigt, wobei PKA innerhalb der einzelnen Loben funktionell redundant zu sein scheint. (A) Eine duale Stimulierung der *rut*-AC durch die CaMKII (CS) und einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (US) führt zu einer Synthese von cAMP, wodurch zwei unterschiedliche cAMP Signalwege innerhalb der einzelnen Loben aktiviert werden können, einen cAMP/PKA Signalweg (rot) und/oder einen cAMP/EPAC Signalweg (blau). Beide cAMP Effektoren aktivieren im Zuge dessen ihre Zielsubstrate, die die synaptische Transmission fördern. PKA kann beispielsweise das synaptische Protein Synapsin oder verschiedene Ionenkanäle (IK) phosphorylieren, während EPAC als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) gezielt kleine G-Proteine wie Rab und Ras, die direkt an der Regulation des RRP beteiligt sind, aktiviert. Inwiefern beide Signalwege miteinander interagieren ist nicht bekannt. Jedoch können einige synaptische Proteine von beiden cAMP Effektoren aktiviert werden. Eine Regulation der beiden cAMP Signalwege könnte durch verschiedene dopaminerge Neurone erfolgen, die die ge-

samten MBs innervieren oder auch durch eine negative Rückkopplung, indem die *dnc*-PDE aktiviert wird. Dadurch kommt es zu einer Degradation von cAMP, was eine Reduktion der intrazellulären cAMP Konzentration zur Folge hätte. **(B)** Die Bildung des ASM kann neben dem cAMP/EPAC Signalweg (blau) über an AKAPs geankerte PKA (grün) und ungebundene PKA (rot) erfolgen. Geankerte PKA phosphoryliert das synaptische Protein, Tomosyn, welches an der Regulation des RRP beteiligt ist, während die ungebundene PKA das RP regulierende Protein, Synapsin, phosphoryliert. Beide präsynaptischen Proteine erhöhen im Zuge einer Phosphorylierung die synaptische Vesikelabgabe, die für die Bildung des ASM benötigt wird. Eine Regulation der unterschiedlichen Signalwege könnte zusätzlich zu den dopaminergen Neuronen über eine negative KC-DPM-APL Rückkopplungsschleife erfolgen. Abkürzungen: AL, Antennallobus; LNs, lokale Interneurone Typ1 bzw. Typ2; PNs, Projektionsneurone; MB, Pilzkörper; C, Kalyx; P, Pedunculus; PPL1; protocerebrale posteriore laterale 1 Neurone; PAM, protocerebrale anterior mediale Neurone; KCs, Kenyonzellen; DA, Dopamin; *amn*, amnesiac; DPM, dorsal gepaartes mediales Neuron; APL, anterior gepaartes laterales Neuron; AKAP, A-Kinase Ankerproteine; RP, Reserverpool; RRP, Ready Releasable Pool

## 4.5 Die Integration *rutabaga*-unabhängiger cAMP Signale

### 4.5.1 PKA unterstützt die Bildung des stabilen *rutabaga*-unabhängigen ARM auf mehreren neuronalen Ebenen

*Rut*-abhängige cAMP Signale unterstützen spezifisch die Bildung des labilen ASM und des STM, allerdings nicht die Bildung des stabilen ARM (Scheunemann et al., 2012). Apomorphe Allele von *rut* reduzieren die Gedächtnisleistung signifikant, wobei jedoch die stabile Gedächtniskomponente intakt bleibt (Livingstone et al., 1984; McGuire et al., 2003; Scheunemann et al., 2012; Zars et al., 2000). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass für die Bildung des stabilen ARM *dnc*-sensitive cAMP Signale benötigt werden, die ihre Funktion in den LNs und in den KCs der  $\alpha\beta$  und  $\gamma$  Loben ausüben (Scheunemann et al., 2012). Dies deutet auf eine Beteiligung eines *rut*-unabhängigen Signalweges hin, der die Formation der stabilen Gedächtniskomponente fördert. Kohärent mit diesen Befunden konnte in dieser Arbeit ein PKA-abhängiges neuronales Netzwerk identifiziert werden, welches auf der Ebene der LNs, der PNs und der KCs die Bildung des stabilen ARM unterstützt (Abb. 12A+B, 13B+E).

Konsistent mit den obigen Befunden werden PKA Signale in *dnc*-sensitiven KCs, markiert durch die GAL4-Linien 17d ( $\alpha\beta$ ) und NP1131 ( $\gamma$ ), benötigt. Dies lässt einen *rut*-unabhängigen zellulären Mechanismus vermuten, bei dem *dnc*-sensitive cAMP/PKA Signale innerhalb der einzelnen Subtypen die Bildung des stabilen ARM fördern. Dabei scheinen jedoch andere lokale cAMP Mikrodomänen involviert zu sein, als jene, die für die Bildung der *rut*-abhängigen Gedächtnisphasen STM/ASM eine Rolle spielen (siehe Diskussion Punkt 4.4). Diese Befunde unterstützen die Hypothese einer parallelen und unabhängigen Prozessierung unterschiedlicher Gedächtnisspuren innerhalb der einzelnen Subtypen der KCs.

In den ALs konvergiert ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher Neuronentypen, darunter die inhibitorischen LNs und die exzitatorischen PNs, die miteinander dendro-dentritische reziproke Synapsen bilden (Ng et al., 2002). Sowohl in den LNs als auch in den PNs konnte ei-

ne PKA-abhängige Funktion festgestellt werden, die spezifisch die Formation des stabilen ARM unterstützt. Diese Befunde unterscheiden sich jedoch von denen, die in der *dnc* Mutante gefunden wurden. Während *dnc*-sensitive Signale ausschließlich in den LNs Typ1, markiert durch die GAL4-Linie GH298, erforderlich sind (Scheunemann et al., 2012), werden PKA Signale in den LNs Typ2, markiert durch die GAL4-Linie NP2426, benötigt (Abb. 12A). Diese Diskrepanz könnte möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Düfte hervorgerufen worden sein, da jede Duftinformation ein spezifisches Aktivitätsmuster einzelner Glomeruli innerhalb der ALs hervorruft (Fiala, 2007; Gao et al., 2000; Marin et al., 2002; Vosshall et al., 2000). Ferner werden die Ergebnisse dieser Arbeit durch immunohistologische Befunde unterstützt. So konnte innerhalb der ALs, genauer gesagt in den einzelnen Clustern der Somata lokaler Interneurone sowie in den Arealen der Glomeruli, in denen die synaptischen Verbindungen der ORNs, LNs und PNs konvergieren, eine Expression von PKA aufgezeigt werden (Müller, 1997; Stocker, 1994). Konsistent mit diesen Befunden markiert die hier verwendete GAL4-Linie NP2426 genau diese Bereiche (Okada et al., 2009; Sachse et al., 2007; Tanaka et al., 2012).

Interessanterweise konnte in den terminalen Bereichen der PNs eine zelluläre Gedächtnisspur nachgewiesen, die sich nach einer CS/US Stimulation in Form einer veränderten duftspezifischen synaptischen Aktivität zeigte (Yu et al., 2004). Diese Gedächtnisspur ist relativ kurzlebig, jedoch konnte kürzlich in kultivierten *Drosophila* Gehirnen, nach einer assoziierten Stimulation, eine erhöhte synaptische Transmission zwischen dem AL und dem MB für mehr als zwei Stunden nachgewiesen werden (Ueno et al., 2013).

Diese Befunde könnten eine mögliche Verknüpfung zu den hier gefundenen ARM-spezifischen PKA Signalen innerhalb der ALs darstellen. In der Honigbiene beispielsweise ruft eine gepaarte Applikation des CS/US eine ausgedehnte Aktivierung von PKA in den ALs hervor (Müller, 2000). Demnach wird angenommen, dass PKA als Substrat für das assoziativen olfaktorischen Lernens in den ALs der Honigbiene fungiert.

#### **4.5.2 Die Bildung des *rut*-unabhängigen ARM – eine Modellvorstellung**

Bei der Bildung des ARM gelten bisher die MBs als eine notwendige Struktur, wobei beim Abruf dieser Gedächtniskomponente eine Neurotransmission von den KCs der  $\alpha/\beta$  Loben benötigt wird (Isabel et al., 2004). Es wird vermutet, dass die Bildung des ARM durch modulatorische Neurone unterstützt wird, wobei ein serotonerger Input der DPM Neurone (Lee et al., 2011) und ein octopaminerger Input der APL Neurone notwendig ist (Wu et al., 2013). Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse deuten jedoch auf ein sehr viel komplexeres Netzwerk

hin, bei dem nicht nur die einzelnen Loben der MBs involviert sind, sondern auch die LNs und die PNs der ALs eine mögliche Rolle bei der Bildung des ARM spielen könnten.

Bisher wurde angenommen, dass die LNs und die PNs ausschließlich für die Verrechnung und Weiterleitung der Duftinformationen benötigt werden. In beiden Neuronenklassen konnte jedoch eine spezifische Funktion bei der Bildung des ARM festgestellt werden, ohne dass die Bildung des *rut*-abhängigen STM/ASM beeinträchtigt wurde (Abb. 12). Demnach werden die relevanten Duftinformationen adäquat verrechnet und an die verschiedenen KCs Subtypen der MBs problemlos weitergeleitet, in denen dann die Formation *rut*-abhängiger Gedächtniskomponenten erfolgen kann.

Diese Befunde lassen auf zwei unterschiedliche Funktionen innerhalb der ALs schließen. Demnach scheinen sie nicht nur für die Verarbeitung und Weiterleitung der Duftinformation notwendig zu sein, sondern könnten möglicherweise direkt bei der CS/US Integration und somit bei der Bildung des ARM eine Funktion einnehmen. Inwiefern dies geschehen könnte, bleibt spekulativ. Jedoch ist in der Honigbiene bereits eine multiple CS/US Konvergenz auf der Ebene der MBs und der ALs nachgewiesen (Erber et al., 1980; Faber et al., 1999; Menzel et al., 1996), wobei ein spezifisches Neuron, das  $VUM_{mx1}$  (ventrales ungepaartes medianes Neuron), die Information über den US vermittelt (Hammer, 1993). In *Drosophila* ist über eine mögliche Repräsentation des US innerhalb der ALs wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein im Abdomen applizierter elektrischer Reiz (US) eine synaptische Transmission innerhalb der Glomeruli hervorrufen kann (Yu et al., 2004). Demnach muss es innerhalb des Fliegenhirns Neurone geben, die die US Information zu den ALs projizieren. Neuere Befunde zeigen, dass es neuromodulatorische Neurone gibt, die ihre Neuropeptide wie Dopamin, Octopamin und Serotonin in die ALs entlassen, wodurch deren Antwortigenschaften während einer assoziativen Konditionierung moduliert werden können (Masse et al., 2009; Nassel and Winther, 2010). Allerdings werden die ALs nur geringfügig durch dopaminerge Neuronen innerviert (Riemensperger et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit die nötigen Informationen über den US zu erhalten, könnte eine kürzlich identifizierte funktionelle Rückkopplung von den KCs zu den ALs darstellen, wobei jedoch bisher das neuronale Korrelat nicht identifiziert werden konnte (Hu et al., 2010). Interessanterweise wurde diese Rückkopplung durch die KCs der  $\beta$  und  $\gamma$  Loben vermittelt, also durch die Loben, in denen eine PKA-abhängige Funktion bei der Bildung des stabilen ARM lokalisiert werden konnte.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das stabile ARM unmittelbar nach dem ersten Schock gebildet wird (Scheunemann et al., 2013). Dies lässt einen schnellen Mechanismus bei der Initiierung des ARM vermuten. Demnach wären die LNs und die PNs ein idealer Ausgangsort

für die Bildung dieser Gedächtniskomponente. Inwiefern die Bildung des ARM innerhalb des hier identifizierten Netzwerkes jedoch verlaufen könnte, können die in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht klären. Jedoch gibt es zwei Möglichkeiten, die in Betracht gezogen werden können. Zum einen könnte das ARM über eine serielle synaptische Bahnung entlang des olfaktorischen Weges gebildet werden, wobei die Initiierung in den ALs und der Abruf in den MBs erfolgen könnte. Andererseits wäre eine parallele Initiierung des ARM in den ALs sowie in den MBs denkbar. Wie genau die Bildung des ARM innerhalb dieses PKA-abhängigen Netzwerkes letztendlich gefördert wird, bedarf einer intensiveren Untersuchung der einzelnen Netzwerkkomponenten. Aufschluss über eine mögliche Beteiligung der ALs bei der Initiierung der Gedächtnisphase könnte beispielsweise das temperatursensitive Allele *shibire* geben, mit dem es möglich ist, die synaptische Übertragung während des Trainings reversibel zu blockieren (Kitamoto, 2001).

Im Allgemeinen gelten die KCs der MBs als notwendige Strukturen, die an der Integration des CS/US beteiligt sind (Heisenberg, 2003). Dabei fungiert die *rut-AC* als Koinzidenzdetektor, indem sie einerseits in Folge eines erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$  Niveaus durch eine CAMKII (CS) und andererseits durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (US) stimuliert wird (Gervasi et al., 2010; Livingstone et al., 1984; Tomchik and Davis, 2009). Dieses Konzept scheint jedoch bei der Bildung des stabilen ARM nicht der Fall zu sein, da diese Gedächtniskomponente scheinbar unabhängig der *rut-AC* gebildet wird. Demzufolge stellt sich die Frage, wie eine CS/US Integration in einem *rut*-unabhängigen cAMP/PKA Signalweg aussehen könnte.

Innerhalb der MBs induzieren sowohl DA als auch ACh eine *rut*-unabhängige Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration (Tomchik and Davis, 2009) und eine Inhibition der PDEs ohne eine künstliche Aktivierung der AC führt zu einer Erhöhung der PKA Aktivität. Ferner zeigt *rut*<sup>2080</sup>, eine funktionellen Nullmutante (Levin et al., 1992), trotz einer defizienten *rut-AC* eine verbleibende Aktivität von PKA (Gervasi et al., 2010). Diese Befunde deuten auf mindestens eine weitere AC innerhalb der MBs hin, die eine Erhöhung des cAMP Spiegels und folglich eine Aktivierung von PKA und dessen Zielsubstrate vermitteln könnte. In *Mammalia* existieren mindestens neun verschiedene AC Isoformen, die durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor reguliert werden, sich jedoch in der Art und Weise wie sie moduliert werden voneinander unterscheiden. Dabei kann eine Änderung des Membranpotentials oder andere Komponenten des Signalweges ( $\text{Ca}^{2+}$ , PKA, CAMKII oder PKC) die Aktivierung der verschiedenen Isoformen stimulieren oder auch inhibieren (Cooper et al., 1998; Sunahara et al., 1996). In der Tat konnten in *Drosophila* mehrere ACs identifiziert werden, die ähnliche Eigenschaften besitzen (Cann and Levin, 2000; Iourgenko and Levin, 2000; Livingstone et

al., 1984). Es bleibt jedoch zu untersuchen, inwiefern diese ACs oder weitere noch nicht identifizierte ACs einen Einfluss auf die Gedächtnisbildung besitzen.

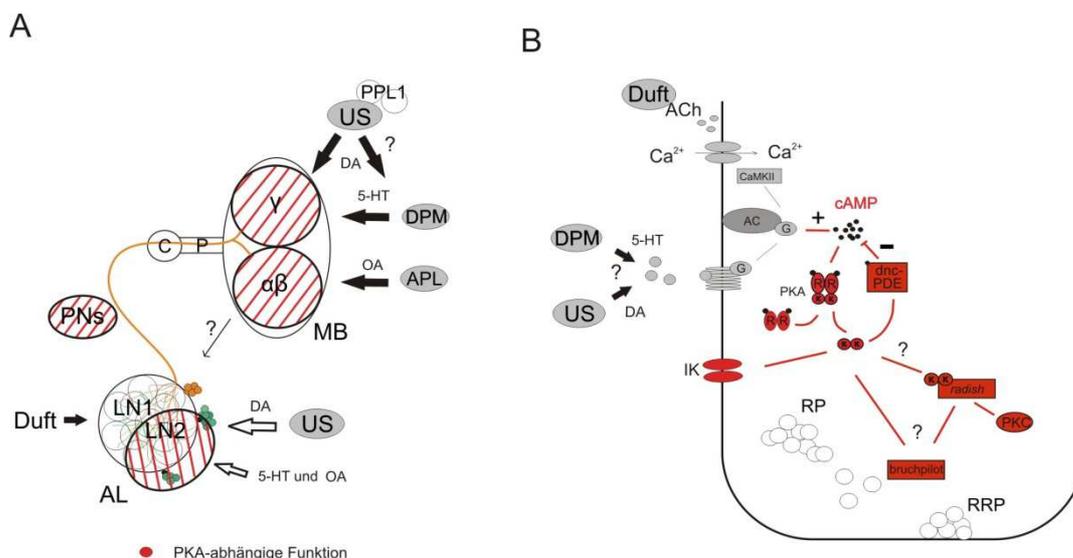
Eine Integration der relevanten Stimuli wäre auch über einen anderen Signalweg vorstellbar, der unabhängig einer AC erfolgt oder der eine *rut*-unabhängige AC integriert. Ein möglicher Kandidat könnten die postsynaptisch agierenden N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren sein. NMDA Rezeptoren fungieren neben der *rut*-AC ebenfalls als Koinzidenzdetektoren, die eine Beteiligung beim assoziativen Lernen in Vertebraten und Invertebraten aufweisen (Müssig et al., 2010; Riedel et al., 2003; Roberts and Glanzman, 2003; Si et al., 2004; Tsien et al., 1996; Wu et al., 2007; Xia et al., 2005). In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die NMDA Rezeptoren bei der Bildung des STM in einem *rut*-unabhängigen Signalweg agieren (Qin and Dubnau, 2010). Inwiefern sie die Bildung anderer Gedächtniskomponenten ebenfalls unabhängig der *rut*-AC unterstützen, ist leider nicht bekannt. Interessanterweise scheinen sie jedoch die Bildung assoziativer Gedächtniskomponenten nicht einzig und alleine innerhalb der MBs zu unterstützen, sondern auch außerhalb dieser Strukturen (Wu et al., 2007; Xia et al., 2005). So werden NMDA Rezeptoren beispielsweise auch in den verschiedenen Clustern der DPM Neurone (Xia et al., 2005) oder innerhalb der ALs exprimiert (Das et al., 2011). Bemerkenswerterweise besitzen die DPM Neurone, dessen serotonerge Ausschüttung bei der Bildung des ARM eine Rolle spielt (Lee et al., 2011), die Fähigkeit sowohl auf den CS, als auch auf den US Stimulus zu reagieren, wobei sie eine duftspezifische Gedächtnisspur ausbilden, die ab einem Zeitraum von 30 Minuten beobachtet werden kann (Yu et al., 2005). Nun könnte man spekulieren, ob diese Befunde eine mögliche Verknüpfung zu einer *rut*-unabhängigen Integration relevanter Stimuli darstellen könnten.

Die molekularen Grundlagen für die Bildung des stabilen ARM sind noch weitgehend unklar, jedoch konnte in dieser Arbeit eine eindeutige Beteiligung von PKA bei der Bildung dieser Gedächtniskomponente aufgezeigt werden. Grundlegend wird angenommen, dass die Bildung keine Synthese neuer Proteine benötigt, sondern vielmehr mit einer Modifikation bereits vorhandener Proteine einhergehen (Tully et al., 1994; Yin et al., 1994). Eine solche Möglichkeit ist durch die cAMP-abhängige PKA gegeben, die fähig ist, eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate zu phosphorylieren und somit dessen Aktivität negativ oder positiv zu beeinflussen. Bisher konnten nur wenige Proteine identifiziert werden, die eine Beteiligung bei der Bildung des ARM zeigen, darunter sind beispielsweise Radish (Folkers et al., 1993; Folkers et al., 2006), die stromabwärts von Radish agierende Proteinkinase C (Drier et al., 2002) und Bruchpilot (Knappek et al., 2011). Diese Proteine werden vorzugsweise in den KCs der  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben der MBs exprimiert (Folkers et al., 2006; Knappek et al., 2011), sprich in densel-

ben Loben in denen PKA Signale für die Bildung des ARM benötigt werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine durch die DPM Neurone vermittelte serotonerge Ausschüttung innerhalb der  $\alpha/\beta$  Loben, eine Aktivierung von Radish zur Folge hat (Lee et al., 2011). Es ist bislang nicht bekannt, inwiefern Radish im cAMP/PKA-Signalweg involviert ist, jedoch besitzt das Radish Protein eine Vielzahl von Phosphorylierungsdomänen und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass Radish durch PKA phosphoryliert wird (Folkers et al., 2006; Guan et al., 2011). Demnach könnte PKA ein fehlendes Bindeglied dieser Signalkette darstellen. In *Aplysia* beispielsweise erhöht Serotonin bei der Konditionierung des Kiemenrückzugsreflexes die cAMP/PKA Aktivität in sensorischen Neuronen, was zu einer Erhöhung der synaptischen Übertragung führt (Brunelli et al., 1976; Castellucci et al., 1980).

Bruchpilot ist ein spezifisch in der aktiven Zone lokalisiertes Protein, welches an der Regulation der Neurotransmitterausschüttung beteiligt ist (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006). Derzeit ist nicht bekannt, ob Bruchpilot mit dem cAMP/PKA Signalweg interagiert. Aufschluss über eine mögliche Interaktion könnte jedoch eine immunohistologische Analyse von Bruchpilot in einem PKA defizienten Hintergrund geben.

Basierend auf diesen Schlussfolgerungen ergibt sich ein erweitertes Modell, welches einerseits die komplexe Netzwerkbeitragsung bei der Bildung des *rut*-unabhängigen ARM integriert (Abb.28A) und andererseits die möglichen zellulären Zusammenhänge darstellt (Abb.28B).



**Abbildung 28: Modell der Beteiligung von PKA innerhalb eines komplexen Netzwerkes und auf molekularer Ebene bei der Bildung des *rut*-unabhängigen ARM.** (A) Für die Bildung des ARM werden PKA Signale entlang des olfaktorischen Weges in einem LN2-PN-MB Netzwerk benötigt (rot markiert). Dopaminergem Input von den PPL1 Neuronen fördern die Bildung des ARM in den KCs der  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben, wobei die neuromodulatorischen DPM und APL Neurone durch die Freisetzung ihrer Neuropeptide unterstützend wirken. Innerhalb der ALs konvergieren unterschiedliche Neuronenklassen, wobei eine PKA-abhängige Funktion in den LN2

und den PNs bei der Bildung des ARM benötigt wird. Wie der dopaminerge Stimulus in die ALs projiziert wird, ist momentan nicht bekannt. Jedoch werden die ALs durch Neurone innerviert, die unter anderem DA, OA und 5-HT segregieren. Ein möglicher Informationsfluss wäre durch eine funktionelle KCs-AL Rückkopplungsschleife denkbar. **(B)** Auf der zellulären Ebene wird präsynaptisch der cAMP/PKA Signalweg durch eine AC aktiviert, die möglicherweise ähnlich wie die rut-AC durch eine duale Stimulierung von CaMKII (CS) und einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (US) angeregt wird. Eine erhöhte PKA Aktivität führt zur Phosphorylierung präsynaptischer Proteine, wie radish oder auch bruchpilot, wodurch die Neurotransmitterausschüttung erhöht wird. Abkürzungen: AL, Antennallobus; LNs, lokale Interneurone Typ1 bzw. Typ2; PNs, Projektionsneurone; MB, Pilzkörper; C, Kalyx; P, Pedunculus; PPL1; protocerebrale posteriore laterale 1 Neurone; 5-HT, Serotonin; DA, Dopamin; OA, Octopamin; DPM, dorsal gepaartes mediales Neuron; APL, anterior gepaartes laterales Neuron, RP, Reservepool; RRP, Ready Releasable Pool.

## 5 Zusammenfassung

cAMP ist ein ubiquitärer sekundärer Botenstoff, der mehrerer Effektoren aktiviert und dessen Signalwirkung die synaptische Plastizität während des Lernens und der Gedächtnisbildung moduliert. In *Drosophila melanogaster* wird bei einer olfaktorischen aversiven Konditionierung ein assoziatives Gedächtnis gebildet, welches einen zeitlich dynamischen Charakter besitzt und aus mehreren unterscheidbaren Gedächtniskomponenten, u.a. dem Kurzzeitgedächtnis (STM) und dem Mittelzeitgedächtnis (MTM) besteht. Das MTM kann durch eine amnestische Behandlung (z.B. einem Kälteschock) in seine zwei koexistierenden Gedächtniskomponenten unterteilt werden, dem Anästhesie-resistenten Gedächtnis (stabiles ARM) und dem Anästhesie-sensitiven Gedächtnis (labiles ASM). Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass die Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses durch eine cAMP vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) unterstützt wird, sind die zellulären cAMP Signale und die Aktivität der stromabwärts gelegenen PKA während der Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten ungenügend verstanden. Mit der Entdeckung des cAMP Effektors, EPAC (Exchange Protein directly activated by cAMP), konnte neben PKA ein weiterer Effektor identifiziert werden, der ebenfalls einen Einfluss auf die Gedächtnisbildung besitzen könnte. Mit Hilfe genetischer Manipulationen und dem olfaktorischen Konditionierungsparadigma konnte in dieser Arbeit eine funktionelle Zuordnung der beiden cAMP Effektoren, PKA und EPAC, bei der Bildung spezifischer Gedächtniskomponenten aufgezeigt werden.

Durch eine graduelle Herunterregulierung der katalytischen Untereinheit von PKA konnte eine komplexe und differenzierte Beteiligung von PKA bei der Bildung des stabilen ARM, des labilen ASM und des STM auf zwei verschiedenen Ebenen ermittelt werden; erstens auf der Ebene der intrazellulären PKA Aktivität und zweitens auf der Ebene der neuronalen Netzwerke. Es zeigte sich, dass für die Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten unterschiedliche PKA Schwellenwerte erforderlich sind. Weiterhin ergab die Analyse eine differenzierte Beteiligung von PKA bei der Bildung des stabilen ARM und des labilen ASM/STM. Während für die Bildung des stabilen ARM eine Beteiligung von PKA in allen Neuropilen entlang des olfaktorischen Signalweges benötigt wird, d.h. in den Antennalloben (ALs) und in den Kenyonzellen (KCs) der einzelnen Subtypen der Pilzkörper (MBs), ist für die Bildung des labilen ASM/STM eine PKA Funktion ausschließlich in den KC Subtypen der MBs erforderlich. Allerdings scheint jedoch innerhalb des KC-Subsystems eine unterschiedliche Beteiligung von PKA bei der Bildung des labilen ASM/STM und des stabilen ARM vorhanden zu sein. Durch die Analyse von Tomosyn, einem stromabwärts gelegenen Zielsubstrat von PKA, konnte eine weitere funktionelle Unterscheidung von PKA innerhalb der KCs der einzelnen

Subtypen bei der Bildung des STM und des labilen ASM ermittelt werden. Die Ergebnisse deuten auf drei unterschiedliche PKA abhängige Signale hin, die auf der Ebene der KCs aktivitätsabhängig agieren und spezifisch die Bildung der einzelnen Gedächtniskomponenten (STM, ASM, ARM) unterstützen, indem sie beispielsweise unterschiedliche synaptische Proteine phosphorylieren.

Eine Manipulation von EPAC zeigte eine Beteiligung bei der Bildung des labilen ASM und des STM innerhalb der einzelnen KC Subtypen der MBs. Somit konnte gezeigt werden, dass neben der PKA ein weiterer direkter cAMP Effektor eine Funktion bei der Bildung dieser spezifischen Gedächtniskomponenten besitzt. Im Gegensatz zu PKA werden Epac Signale jedoch in den KCs der einzelnen Subtypen der MBs für die Bildung des labilen ASM/STM benötigt, während PKA Signale funktionell redundant innerhalb der KCs der MBs agieren. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Bildung des labilen ASM und des STM wesentlich komplexer zu sein scheint, als bisher vermutet. Scheinbar wird die Bildung dieser Gedächtniskomponenten durch mehrere unabhängige cAMP Signalwege moduliert, die subzellulär und innerhalb neuronaler Netzwerke voneinander dissoziiert werden können.

## 6 Summary

The ubiquitous second messenger cAMP is involved in synaptic plasticity by activating several downstream effectors during learning and memory formation. In *Drosophila melanogaster*, olfactory aversive conditioning leads to an associative memory which consists of several different temporal components including short-term memory (STM) and middle-term memory (MTM). MTM can be further divided by amnesic treatments (e.g. cold shock) into its two coexisting components – anaesthesia-resistant memory (stable ARM) and anaesthesia-sensitive memory (labile ASM). Although it has been demonstrated that cAMP dependent activation of PKA supports memory formation, the precise involvement of cellular cAMP signaling and PKA activity during formation of different memory components still remain unclear. However, with the discovery of another major target of cAMP known as EPAC (Exchange Protein directly activated by cAMP), there may be more than one cAMP sensor involved in memory formation. This issue was addressed by use of genetic manipulation and the olfactory conditioning paradigm, providing a functional assignment of both cAMP effectors, PKA and EPAC, during formation of specific memory components.

Progressive knockdown of PKA catalytic subunit revealed a complex participation of PKA during the specific formation of stable ARM, labile ASM and STM that can be distinguished at two levels: first at the level of intracellular activity and second, at the level of neuronal circuitry. Thereby, it was shown that formation of distinct memory components requires different thresholds of PKA. Furthermore, this study revealed a general distinction between PKA signaling required for either stable ARM or labile ASM/STM. While formation of stable ARM depends on PKA signaling within different brain structures of the olfactory pathway, e.g. the antennal lobes (ALs) and the Kenyon cell (KCs) subtypes of the mushroom bodies (MBs), formation of labile ASM/STM solely relies on PKA signaling within the KC subtypes of the MBs. However, the involvement of PKA signaling within the single KC subtypes in labile ASM/STM formation differs from that of stable ARM formation. Furthermore, by analyzing the PKA downstream target tomosyn, it could be shown that the involvement of PKA signaling within the single KC subtypes differs between STM and labile ASM. These findings indicate that three different types of activity dependent PKA signals intersect at the level of KCs to support formation of specific memory components (STM, ASM and ARM) i.e. by phosphorylation of different sets of synaptic proteins.

In addition, the analysis of EPAC revealed an involvement specifically during formation of labile ASM and STM within the single types of KCs. Hence, it could be shown that beside PKA another cAMP sensor is directly involved in formation of those memory components. In

contrast, EPAC signaling is required within the single subtypes of the KCs, while PKA signaling seems to be functionally redundant within the different KC network. These findings indicate that formation of labile ASM and STM seems to be much more complex as originally thought. Apparently, formation of those memory components is modulated by different independent cAMP signaling pathways, which dissociate from each other on a cellular and a neuronal circuitry level.

## 7 Referenzen

- Aceves-Pina, E. O., and Quinn, W. G. (1979). Learning in normal and mutant *Drosophila* larvae. *SCIENCE* 206, 93-96.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *SCIENCE* 287, 2185-2195.
- Akalal, D. B., Wilson, C. F., Zong, L., Tanaka, N. K., Ito, K., and Davis, R. L. (2006). Roles for *Drosophila* mushroom body neurons in olfactory learning and memory. *Learn Mem* 13, 659-668.
- Akalal, D. B., Yu, D., and Davis, R. L. (2010). A late-phase, long-term memory trace forms in the gamma neurons of *Drosophila* mushroom bodies after olfactory classical conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 16699-16708.
- Akbergenova, Y., and Bykhovskaia, M. (2010). Synapsin regulates vesicle organization and activity-dependent recycling at *Drosophila* motor boutons. *Neuroscience* 170, 441-452.
- Ashery, U., Bielopolski, N., Barak, B., and Yizhar, O. (2009). Friends and foes in synaptic transmission: the role of tomosyn in vesicle priming. *Trends in neurosciences* 32, 275-282.
- Aso, Y., Grubel, K., Busch, S., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I., and Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *Journal of neurogenetics* 23, 156-172.
- Aso, Y., Herb, A., Ogueta, M., Siwanowicz, I., Templier, T., Friedrich, A. B., Ito, K., Scholz, H., and Tanimoto, H. (2012). Three dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability. *PLoS genetics* 8, e1002768.
- Aso, Y., Siwanowicz, I., Bracker, L., Ito, K., Kitamoto, T., and Tanimoto, H. (2010). Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Current biology : CB* 20, 1445-1451.
- Augustin, I., Korte, S., Rickmann, M., Kretschmar, H. A., Sudhof, T. C., Herms, J. W., and Brose, N. (2001). The cerebellum-specific Munc13 isoform Munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 10-17.
- Baba, T., Sakisaka, T., Mochida, S., and Takai, Y. (2005). PKA-catalyzed phosphorylation of tomosyn and its implication in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of neurotransmitter. *The Journal of cell biology* 170, 1113-1125.
- Barak, B., Okun, E., Ben-Simon, Y., Lavi, A., Shapira, R., Madar, R., Wang, Y., Norman, E., Sheinin, A., Pita, M. A., *et al.* (2013). Neuron-specific expression of tomosyn1 in the mouse hippocampal dentate gyrus impairs spatial learning and memory. *Neuromolecular medicine* 15, 351-363.
- Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K., and Gehring, W. J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes & development* 3, 1288-1300.
- Benzer, S. (1973). Genetic Dissection of Behavior. *Sci Am* 229, 24-37.
- Berry, J. A., Cervantes-Sandoval, I., Nicholas, E. P., and Davis, R. L. (2012). Dopamine Is Required for Learning and Forgetting in *Drosophila*. *Neuron* 74, 530-542.
- Blum, A. L., Li, W., Cressy, M., and Dubnau, J. (2009a). Parallel processing of olfactory memories in *Drosophila*. *Current Biology* 19, 1341-1350.
- Blum, A. L., Li, W., Cressy, M., and Dubnau, J. (2009b). Short- and long-term memory in *Drosophila* require cAMP signaling in distinct neuron types. *Current biology : CB* 19, 1341-1350.
- Bos, J. L. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 733-738.

- Bos, J. L. (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends in biochemical sciences* 31, 680-686.
- Boto, T., Louis, T., Jindachomthong, K., Jalink, K., and Tomchik, S. M. (2014). Dopaminergic Modulation of cAMP Drives Nonlinear Plasticity across the *Drosophila* Mushroom Body Lobes. *Current biology* : CB 24, 822-831.
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., and Silva, A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79, 59-68.
- Brand, A. H., and Dormand, E. L. (1995). The Gal4 System as a Tool for Unraveling the Mysteries of the *Drosophila* Nervous-System. *Current opinion in neurobiology* 5, 572-578.
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted Gene-Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Breckler, M., Berthouze, M., Laurent, A. C., Crozatier, B., Morel, E., and Lezoualc'h, F. (2011). Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cellular signalling* 23, 1257-1266.
- Brembs, B., and Heisenberg, M. (2000). The operant and the classical in conditioned orientation of *Drosophila melanogaster* at the flight simulator. *Learn Mem* 7, 104-115.
- Brunelli, M., Castellucci, V., and Kandel, E. R. (1976). Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *SCIENCE* 194, 1178-1181.
- Busto, G. U., Cervantes-Sandoval, I., and Davis, R. L. (2010). Olfactory learning in *Drosophila*. *Physiology (Bethesda)* 25, 338-346.
- Byers, D., Davis, R. L., and Kiger, J. A., Jr. (1981). Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the *dunce* mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 289, 79-81.
- Cann, M. J., and Levin, L. R. (2000). Restricted expression of a truncated adenylyl cyclase in the cephalic furrow of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol* 210, 34-40.
- Carew, T. J., and Sahley, C. L. (1986). Invertebrate learning and memory: from behavior to molecules. *Annual review of neuroscience* 9, 435-487.
- Castellucci, V. F., Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Wilson, F. D., Nairn, A. C., and Greengard, P. (1980). Intracellular Injection of the Catalytic Subunit of Cyclic Amp-Dependent Protein-Kinase Simulates Facilitation of Transmitter Release Underlying Behavioral Sensitization in *Aplysia*. *P Natl Acad Sci-Biol* 77, 7492-7496.
- Cervantes-Sandoval, I., Martin-Pena, A., Berry, J. A., and Davis, R. L. (2013). System-like consolidation of olfactory memories in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 9846-9854.
- Chapman, E. R. (2002). Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 498-508.
- Chen, C. N., Denome, S., and Davis, R. L. (1986). Molecular Analysis of Cdna Clones and the Corresponding Genomic Coding Sequences of the *Drosophila Dunce+* Gene, the Structural Gene for Camp Phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 9313-9317.
- Chen, K., Gracheva, E. O., Yu, S. C., Sheng, Q., Richmond, J., and Featherstone, D. E. (2010). Neurexin in embryonic *Drosophila* neuromuscular junctions. *plos one* 5, e11115.
- Chen, K., Richlitzki, A., Featherstone, D. E., Schwarzel, M., and Richmond, J. E. (2011). Tomosyn-dependent regulation of synaptic transmission is required for a late phase of associative odor memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 18482-18487.
- Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T., and Mei, F. (2008). Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 40, 651-662.

- Cheung, U., Atwood, H. L., and Zucker, R. S. (2006). Presynaptic effectors contributing to cAMP-induced synaptic potentiation in *Drosophila*. *Journal of neurobiology* 66, 273-280.
- Chou, Y. H., Spletter, M. L., Yaksi, E., Leong, J. C., Wilson, R. I., and Luo, L. (2010). Diversity and wiring variability of olfactory local interneurons in the *Drosophila* antennal lobe. *Nature neuroscience* 13, 439-449.
- Claridge-Chang, A., Roorda, R. D., Vrontou, E., Sjulson, L., Li, H., Hirsh, J., and Miesenbock, G. (2009). Writing memories with light-addressable reinforcement circuitry. *Cell* 139, 405-415.
- Connolly, J. B., Roberts, I. J., Armstrong, J. D., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T., and O'Kane, C. J. (1996). Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *SCIENCE* 274, 2104-2107.
- Cooper, D. M., Schell, M. J., Thorn, P., and Irvine, R. F. (1998). Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential. *The Journal of biological chemistry* 273, 27703-27707.
- Crittenden, J. R., Skoulakis, E. M. C., Han, K. A., Kalderon, D., and Davis, R. L. (1998). Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learning & Memory* 5, 38-51.
- D'Adamo, P., Wolfer, D. P., Kopp, C., Tobler, I., Toniolo, D., and Lipp, H. P. (2004). Mice deficient for the synaptic vesicle protein Rab3a show impaired spatial reversal learning and increased explorative activity but none of the behavioral changes shown by mice deficient for the Rab3a regulator Gdi1. *The European journal of neuroscience* 19, 1895-1905.
- Dao, K. K., Teigen, K., Kopperud, R., Hodneland, E., Schwede, F., Christensen, A. E., Martinez, A., and Doskeland, S. O. (2006). Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *The Journal of biological chemistry* 281, 21500-21511.
- Das, A., Sen, S., Lichtneckert, R., Okada, R., Ito, K., Rodrigues, V., and Reichert, H. (2008). *Drosophila* olfactory local interneurons and projection neurons derive from a common neuroblast lineage specified by the empty spiracles gene. *Neural development* 3, 33.
- Das, S., Sadanandappa, M. K., Dervan, A., Larkin, A., Lee, J. A., Sudhakaran, I. P., Priya, R., Heidari, R., Holohan, E. E., Pimentel, A., *et al.* (2011). Plasticity of local GABAergic interneurons drives olfactory habituation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, E646-654.
- Davis, R. L. (1996). Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. *Physiological reviews* 76, 299-317.
- Davis, R. L. (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annual review of neuroscience* 28, 275-302.
- Davis, R. L. (2011). Traces of *Drosophila* memory. *Neuron* 70, 8-19.
- Davis, R. L., and Giurfa, M. (2012). Mushroom-Body Memories: An Obituary Prematurely Written? *Current biology* : CB.
- de Belle, J. S., and Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *SCIENCE* 263, 692-695.
- de Rooij, J., Zwartkuis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., and Bos, J. L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477.
- Dell'Acqua, M. L., Smith, K. E., Gorski, J. A., Horne, E. A., Gibson, E. S., and Gomez, L. L. (2006). Regulation of neuronal PKA signaling through AKAP targeting dynamics. *European journal of cell biology* 85, 627-633.
- DeZazzo, J., and Tully, T. (1995). Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends in neurosciences* 18, 212-218.
- Dodge-Kafka, K. L., Soughayer, J., Pare, G. C., Carlisle Michel, J. J., Langeberg, L. K., Kapiloff, M. S., and Scott, J. D. (2005). The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* 437, 574-578.

- Dodge, K. L., Khouangsathiene, S., Kapiloff, M. S., Mouton, R., Hill, E. V., Houslay, M. D., Langeberg, L. K., and Scott, J. D. (2001). mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *The EMBO journal* *20*, 1921-1930.
- Drain, P., Folkers, E., and Quinn, W. G. (1991). cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron* *6*, 71-82.
- Drier, E. A., Tello, M. K., Cowan, M., Wu, P., Blace, N., Sacktor, T. C., and Yin, J. C. (2002). Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nature neuroscience* *5*, 316-324.
- Dubnau, J., Chiang, A. S., and Tully, T. (2003). Neural substrates of memory: from synapse to system. *Journal of neurobiology* *54*, 238-253.
- Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T., and Tully, T. (2001). Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* *411*, 476-480.
- Dudai, Y., Jan, Y. N., Byers, D., Quinn, W. G., and Benzer, S. (1976). *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *73*, 1684-1688.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* *34*, 1-15.
- Efetova, M., Petereit, L., Rosiewicz, K., Overend, G., Haussig, F., Hovemann, B. T., Cabrero, P., Dow, J. A., and Schwarzel, M. (2013). Separate roles of PKA and EPAC in renal function unraveled by the optogenetic control of cAMP levels in vivo. *Journal of cell science* *126*, 778-788.
- Erber, J. (1976). Retrograde amnesia in honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Journal of comparative and physiological psychology* *90*, 41-46.
- Erber, J., Masuhr, T., and Menzel, R. (1980). Localization of Short-Term-Memory in the Brain of the Bee, *Apis-Mellifera*. *Physiol Entomol* *5*, 343-358.
- Faber, T., Joerges, J., and Menzel, R. (1999). Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nature neuroscience* *2*, 74-78.
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 15781-15786.
- Feany, M. B., and Bender, W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* *404*, 394-398.
- Feany, M. B., and Quinn, W. G. (1995). A Neuropeptide Gene Defined by the *Drosophila* Memory Mutant *Amnesiac*. *SCIENCE* *268*, 869-873.
- Ferreira, A., and Rapoport, M. (2002). The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *59*, 589-595.
- Fiala, A. (2007). Olfaction and olfactory learning in *Drosophila*: recent progress. *Current opinion in neurobiology* *17*, 720-726.
- Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J. M., Buchner, E., and Galizia, C. G. (2002). Genetically expressedameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Current biology : CB* *12*, 1877-1884.
- Fire, A. (1999). RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics* *15*, 358-363.
- Folkers, E., Drain, P., and Quinn, W. G. (1993). *Radish*, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 8123-8127.
- Folkers, E., Waddell, S., and Quinn, W. G. (2006). The *Drosophila* *radish* gene encodes a protein required for anesthesia-resistant memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 17496-17500.
- Foster, J. L., Guttman, J. J., Hall, L. M., and Rosen, O. M. (1984). *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* *259*, 13049-13055.

- Fujita, Y., Shirataki, H., Sakisaka, T., Asakura, T., Ohya, T., Kotani, H., Yokoyama, S., Nishioka, H., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., *et al.* (1998). Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. *Neuron* 20, 905-915.
- Galluscio, E. H. (1971). Retrograde amnesia induced by electroconvulsive shock and carbon dioxide anesthesia in rats: an attempt to stimulate recovery. *Journal of comparative and physiological psychology* 75, 136-140.
- Ganguly, A., and Lee, D. (2013). Suppression of inhibitory GABAergic transmission by cAMP signaling pathway: alterations in learning and memory mutants. *The European journal of neuroscience* 37, 1383-1393.
- Gao, Q., Yuan, B., and Chess, A. (2000). Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nature neuroscience* 3, 780-785.
- Gekel, I., and Neher, E. (2008). Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 7991-8002.
- Gelinas, J. N., Banko, J. L., Peters, M. M., Klann, E., Weeber, E. J., and Nguyen, P. V. (2008). Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus. *Learn Mem* 15, 403-411.
- Gervasi, N., Tchenio, P., and Preat, T. (2010). PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron* 65, 516-529.
- Giordano, E., Rendina, R., Peluso, I., and Furia, M. (2002). RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 160, 637-648.
- Godenschwege, T. A., Reisch, D., Diegelmann, S., Eberle, K., Funk, N., Heisenberg, M., Hoppe, V., Hoppe, J., Klagges, B. R., Martin, J. R., *et al.* (2004). Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour. *The European journal of neuroscience* 20, 611-622.
- Goodwin, S. F., Del Vecchio, M., Velinzon, K., Hogel, C., Russell, S. R., Tully, T., and Kaiser, K. (1997). Defective learning in mutants of the *Drosophila* gene for a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 8817-8827.
- Gracheva, E. O., Burdina, A. O., Holgado, A. M., Berthelot-Grosjean, M., Ackley, B. D., Hadwiger, G., Nonet, M. L., Weimer, R. M., and Richmond, J. E. (2006). Tomosyn inhibits synaptic vesicle priming in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS biology* 4, e261.
- Gracheva, E. O., Burdina, A. O., Touroutine, D., Berthelot-Grosjean, M., Parekh, H., and Richmond, J. E. (2007). Tomosyn negatively regulates both synaptic transmitter and neuropeptide release at the *C. elegans* neuromuscular junction. *The Journal of physiology* 585, 705-709.
- Graf, E. R., Valakh, V., Wright, C. M., Wu, C., Liu, Z., Zhang, Y. Q., and DiAntonio, A. (2012). RIM promotes calcium channel accumulation at active zones of the *Drosophila* neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 16586-16596.
- Groffen, A. J., Jacobsen, L., Schut, D., and Verhage, M. (2005). Two distinct genes drive expression of seven tomosyn isoforms in the mammalian brain, sharing a conserved structure with a unique variable domain. *Journal of neurochemistry* 92, 554-568.
- Guan, Z., Buhl, L. K., Quinn, W. G., and Littleton, J. T. (2011). Altered gene regulation and synaptic morphology in *Drosophila* learning and memory mutants. *Learn Mem* 18, 191-206.
- Guo, A., Li, L., Xia, S. Z., Feng, C. H., Wolf, R., and Heisenberg, M. (1996). Conditioned visual flight orientation in *Drosophila*: dependence on age, practice, and diet. *Learn Mem* 3, 49-59.
- Gupta, N., and Stopfer, M. (2012). Functional analysis of a higher olfactory center, the lateral horn. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 8138-8148.
- Guzowski, J. F., and McGaugh, J. L. (1997). Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for

- water maze training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2693-2698.
- Hammer, M. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366, 59-63.
- Hammond, S. M., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2, 110-119.
- Han, K. A., Millar, N. S., and Davis, R. L. (1998). A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 3650-3658.
- Han, K. A., Millar, N. S., Grotewiel, M. S., and Davis, R. L. (1996). DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* 16, 1127-1135.
- Han, P. L., Levin, L. R., Reed, R. R., and Davis, R. L. (1992). Preferential expression of the *Drosophila* rutabaga gene in mushroom bodies, neural centers for learning in insects. *Neuron* 9, 619-627.
- Harper, S. M., Wienk, H., Wechselberger, R. W., Bos, J. L., Boelens, R., and Rehmann, H. (2008). Structural dynamics in the activation of Epac. *The Journal of biological chemistry* 283, 6501-6508.
- Hatsuzawa, K., Lang, T., Fasshauer, D., Bruns, D., and Jahn, R. (2003). The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis. *The Journal of biological chemistry* 278, 31159-31166.
- Hebb, D. O. (1950). Animal and physiological psychology. *Annual review of psychology* 1, 173-188.
- Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Keller, A., and Stocker, R. F. (2001). A central neural circuit for experience-independent olfactory and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15336-15341.
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature reviews Neuroscience* 4, 266-275.
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., and Byers, D. (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *Journal of neurogenetics* 2, 1-30.
- Hepp, R., Cabaniols, J. P., and Roche, P. A. (2002). Differential phosphorylation of SNAP-25 in vivo by protein kinase C and protein kinase A. *FEBS letters* 532, 52-56.
- Herberg, F. W., Maleszka, A., Eide, T., Vossebein, L., and Tasken, K. (2000). Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *Journal of molecular biology* 298, 329-339.
- Hildebrand, J. G., and Shepherd, G. M. (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annual review of neuroscience* 20, 595-631.
- Honegger, K. S., Campbell, R. A. A., and Turner, G. C. (2011). Cellular-Resolution Population Imaging Reveals Robust Sparse Coding in the *Drosophila* Mushroom Body. *Journal of Neuroscience* 31, 11772-11785.
- Horiuchi, J., Yamazaki, D., Naganos, S., Aigaki, T., and Saitoe, M. (2008). Protein kinase A inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 20976-20981.
- Houslay, M. D., and Adams, D. R. (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochemical Journal* 370, 1-18.
- Hu, A., Zhang, W., and Wang, Z. (2010). Functional feedback from mushroom bodies to antennal lobes in the *Drosophila* olfactory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10262-10267.

- Huang, C., Zheng, X., Zhao, H., Li, M., Wang, P., Xie, Z., Wang, L., and Zhong, Y. (2012). A permissive role of mushroom body alpha/beta core neurons in long-term memory consolidation in *Drosophila*. *Current biology : CB* 22, 1981-1989.
- Hummel, T., and Klambt, C. (2008). P-element mutagenesis. *Methods Mol Biol* 420, 97-117.
- Iijima-Ando, K., Hearn, S. A., Shenton, C., Gatt, A., Zhao, L., and Iijima, K. (2009). Mitochondrial mislocalization underlies Abeta42-induced neuronal dysfunction in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *plos one* 4, e8310.
- Iourgenko, V., and Levin, L. R. (2000). A calcium-inhibited *Drosophila* adenylyl cyclase. *Biochimica et biophysica acta* 1495, 125-139.
- Isabel, G., Pascual, A., and Preat, T. (2004). Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *SCIENCE* 304, 1024-1027.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., and Yamamoto, D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761-771.
- Ito, K., Okada, R., Tanaka, N. K., and Awasaki, T. (2003). Cautionary observations on preparing and interpreting brain images using molecular biology-based staining techniques. *Microscopy research and technique* 62, 170-186.
- Ito, K., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D., and Strausfeld, N. J. (1998). The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5, 52-77.
- Jefferis, G. S., Potter, C. J., Chan, A. M., Marin, E. C., Rohlfsing, T., Maurer, C. R., Jr., and Luo, L. (2007). Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* 128, 1187-1203.
- Jenett, A., Rubin, G. M., Ngo, T. T., Shepherd, D., Murphy, C., Dionne, H., Pfeiffer, B. D., Cavallaro, A., Hall, D., Jeter, J., *et al.* (2012). A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell reports* 2, 991-1001.
- Jovanovic, J. N., Sihra, T. S., Nairn, A. C., Hemmings, H. C., Jr., Greengard, P., and Czernik, A. J. (2001). Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 7944-7953.
- Kalderon, D., and Rubin, G. M. (1988). Isolation and characterization of *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase genes. *Genes & development* 2, 1539-1556.
- Kamyshev, N. G., Iliadi, K. G., and Bragina, J. V. (1999). *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory. *Learn Mem* 6, 1-20.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *SCIENCE* 294, 1030-1038.
- Kandel, E. R., and Schwartz, J. H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *SCIENCE* 218, 433-443.
- Kandel, E. R., and Spencer, W. A. (1968). Cellular neurophysiological approaches in the study of learning. *Physiological reviews* 48, 65-134.
- Kaneko, M., and Takahashi, T. (2004). Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *Journal of Neuroscience* 24, 5202-5208.
- Kapiloff, M. S., Piggott, L. A., Sadana, R., Li, J., Heredia, L. A., Henson, E., Efendiev, R., and Dessauer, C. W. (2009). An adenylyl cyclase-mAKAPbeta signaling complex regulates cAMP levels in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 284, 23540-23546.
- Kapiloff, M. S., Schillace, R. V., Westphal, A. M., and Scott, J. D. (1999). mAKAP: an A-kinase anchoring protein targeted to the nuclear membrane of differentiated myocytes. *Journal of cell science* 112 ( Pt 16), 2725-2736.

- Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E., and Graybiel, A. M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *SCIENCE* 282, 2275-2279.
- Keene, A. C., Stratmann, M., Keller, A., Perrat, P. N., Vosshall, L. B., and Waddell, S. (2004). Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. *Neuron* 44, 521-533.
- Keene, A. C., and Waddell, S. (2007). *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nature reviews Neuroscience* 8, 341-354.
- Kim, Y. C., Lee, H. G., and Han, K. A. (2007). D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 7640-7647.
- Kim, Y. C., Lee, H. G., Seong, C. S., and Han, K. A. (2003). Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene expression patterns : GEP* 3, 237-245.
- Kitamoto, T. (2001). Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *Journal of neurobiology* 47, 81-92.
- Kittel, R. J., Wichmann, C., Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., Wagh, D. A., Pawlu, C., Kellner, R. R., Willig, K. I., *et al.* (2006). Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca<sup>2+</sup> channel clustering, and vesicle release. *SCIENCE* 312, 1051-1054.
- Klein, M., and Kandel, E. R. (1980). Mechanism of Calcium Current Modulation Underlying Presynaptic Facilitation and Behavioral Sensitization in Aplysia. *P Natl Acad Sci-Biol* 77, 6912-6916.
- Knapek, S., Gerber, B., and Tanimoto, H. (2010). Synapsin is selectively required for anesthesia-sensitive memory. *Learn Mem* 17, 76-79.
- Knapek, S., Sigrist, S., and Tanimoto, H. (2011). Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 3453-3458.
- Krashes, M. J., DasGupta, S., Vreede, A., White, B., Armstrong, J. D., and Waddell, S. (2009). A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell* 139, 416-427.
- Krashes, M. J., Keene, A. C., Leung, B., Armstrong, J. D., and Waddell, S. (2007). Sequential use of mushroom body neuron subsets during *drosophila* odor memory processing. *Neuron* 53, 103-115.
- Lane, M. E., and Kalderon, D. (1993). Genetic investigation of cAMP-dependent protein kinase function in *Drosophila* development. *Genes & development* 7, 1229-1243.
- Lee, P. T., Lin, H. W., Chang, Y. H., Fu, T. F., Dubnau, J., Hirsh, J., Lee, T., and Chiang, A. S. (2011). Serotonin-mushroom body circuit modulating the formation of anesthesia-resistant memory in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 13794-13799.
- Lee, T., Lee, A., and Luo, L. (1999). Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126, 4065-4076.
- Levin, L. R., Han, P. L., Hwang, P. M., Feinstein, P. G., Davis, R. L., and Reed, R. R. (1992). The *Drosophila* Learning and Memory Gene *Rutabaga* Encodes a Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Responsive Adenylyl Cyclase. *Cell* 68, 479-489.
- Li, L., and Chin, L. S. (2003). The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 942-960.
- Li, W., Tully, T., and Kalderon, D. (1996). Effects of a conditional *Drosophila* PKA mutant on olfactory learning and memory. *Learn Mem* 2, 320-333.
- Liu, X., and Davis, R. L. (2009). The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning. *Nature neuroscience* 12, 53-59.

- Liu, X., Krause, W. C., and Davis, R. L. (2007). GABAA receptor RDL inhibits *Drosophila* olfactory associative learning. *Neuron* 56, 1090-1102.
- Livingstone, M. S. (1985). Genetic dissection of *Drosophila* adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 5992-5996.
- 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.
- Lonart, G., and Sudhof, T. C. (2000). Assembly of SNARE core complexes prior to neurotransmitter release sets the readily releasable pool of synaptic vesicles. *The Journal of biological chemistry* 275, 27703-27707.
- Lu, Y., Lu, Y. S., Shuai, Y., Feng, C., Tully, T., Xie, Z., Zhong, Y., and Zhou, H. M. (2007). The AKAP Yu is required for olfactory long-term memory formation in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13792-13797.
- Ma, N., Abel, T., and Hernandez, P. J. (2009). Exchange protein activated by cAMP enhances long-term memory formation independent of protein kinase A. *Learn Mem* 16, 367-370.
- Mao, Z., and Davis, R. L. (2009). Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Frontiers in neural circuits* 3, 5.
- Margulies, C., Tully, T., and Dubnau, J. (2005). Deconstructing memory in *Drosophila*. *Current biology : CB* 15, R700-713.
- Marin, E. C., Jefferis, G. S., Komiyama, T., Zhu, H., and Luo, L. (2002). Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell* 109, 243-255.
- Masse, N. Y., Turner, G. C., and Jefferis, G. S. (2009). Olfactory information processing in *Drosophila*. *Current biology : CB* 19, R700-713.
- Mayford, M., Siegelbaum, S. A., and Kandel, E. R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- McEwen, J. M., Madison, J. M., Dybbs, M., and Kaplan, J. M. (2006). Antagonistic regulation of synaptic vesicle priming by Tomosyn and UNC-13. *Neuron* 51, 303-315.
- McGuire, S. E., Deshazer, M., and Davis, R. L. (2005). Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Progress in neurobiology* 76, 328-347.
- McGuire, S. E., Le, P. T., and Davis, R. L. (2001). The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *SCIENCE* 293, 1330-1333.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., and Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *SCIENCE* 302, 1765-1768.
- McManus, M. T., and Sharp, P. A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3, 737-747.
- Mei, F. C., Qiao, J. B., Tsygankova, O. M., Meinkoth, J. L., Quilliam, L. A., and Cheng, X. D. (2002). Differential signaling of cyclic AMP - Opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 11497-11504.
- Menzel, R., and Erber, J. (1978). Learning and Memory in Bees. *Sci Am* 239, 102-&.
- Menzel, R., Hammer, M., Muller, U., and Rosenboom, H. (1996). Behavioral, neural and cellular components underlying olfactory learning in the honeybee. *Journal of physiology, Paris* 90, 395-398.
- Michels, B., Chen, Y. C., Saumweber, T., Mishra, D., Tanimoto, H., Schmid, B., Engmann, O., and Gerber, B. (2011). Cellular site and molecular mode of synapsin action in associative learning. *Learn Mem* 18, 332-344.
- Miesenbock, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192-195.

- Milner, B., Squire, L. R., and Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.
- Müller, U. (1997). Neuronal cAMP-dependent protein kinase type II is concentrated in mushroom bodies of *Drosophila melanogaster* and the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of neurobiology* 33, 33-44.
- Müller, U. (2000). Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* 27, 159-168.
- Murthy, M., Fiete, I., and Laurent, G. (2008). Testing odor response stereotypy in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* 59, 1009-1023.
- Müssig, L., Richlitzki, A., Rossler, R., Eisenhardt, D., Menzel, R., and Lebouille, G. (2010). Acute disruption of the NMDA receptor subunit NR1 in the honeybee brain selectively impairs memory formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 7817-7825.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature biotechnology* 19, 137-141.
- Nassel, D. R., and Winther, A. M. (2010). *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in neurobiology* 92, 42-104.
- Neckameyer, W. S., and Argue, K. J. (2013). Comparative approaches to the study of physiology: *Drosophila* as a physiological tool. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 304, R177-188.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., and Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371, 297-300.
- Ng, M., Roorda, R. D., Lima, S. Q., Zemelman, B. V., Morcillo, P., and Miesenbock, G. (2002). Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly. *Neuron* 36, 463-474.
- Nighorn, A., Healy, M. J., and Davis, R. L. (1991). The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* 6, 455-467.
- Nijholt, I. M., Dolga, A. M., Ostroveanu, A., Luiten, P. G., Schmidt, M., and Eisel, U. L. (2008). Neuronal AKAP150 coordinates PKA and Epac-mediated PKB/Akt phosphorylation. *Cellular signalling* 20, 1715-1724.
- O'Kane, C. J., and Gehring, W. J. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9123-9127.
- Okada, R., Awasaki, T., and Ito, K. (2009). Gamma-aminobutyric acid (GABA)-mediated neural connections in the *Drosophila* antennal lobe. *The Journal of comparative neurology* 514, 74-91.
- Ostroveanu, A., van der Zee, E. A., Eisel, U. L., Schmidt, M., and Nijholt, I. M. (2010). Exchange protein activated by cyclic AMP 2 (Epac2) plays a specific and time-limited role in memory retrieval. *Hippocampus* 20, 1018-1026.
- Ouyang, M., Zhang, L., Zhu, J. J., Schwede, F., and Thomas, S. A. (2008). Epac signaling is required for hippocampus-dependent memory retrieval. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11993-11997.
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., *et al.* (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nature cell biology* 2, 805-811.
- Parnas, M., Lin, A. C., Huetteroth, W., and Miesenbock, G. (2013). Odor discrimination in *Drosophila*: from neural population codes to behavior. *Neuron* 79, 932-944.
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes; an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*, (London: Oxford University Press: Humphrey Milford).

- Pawson, T., and Scott, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *SCIENCE* 278, 2075-2080.
- Piggott, L. A., Bauman, A. L., Scott, J. D., and Dessauer, C. W. (2008). The A-kinase anchoring protein Yotiao binds and regulates adenylyl cyclase in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13835-13840.
- Pitman, J. L., Huetteroth, W., Burke, C. J., Krashes, M. J., Lai, S. L., Lee, T., and Waddell, S. (2011). A pair of inhibitory neurons are required to sustain labile memory in the *Drosophila* mushroom body. *Current biology : CB* 21, 855-861.
- Placais, P. Y., Trannoy, S., Isabel, G., Aso, Y., Siwanowicz, I., Belliard-Guerin, G., Vernier, P., Birman, S., Tanimoto, H., and Preat, T. (2012). Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*. *Nature neuroscience* 15, 592-599.
- Pobbati, A. V., Razeto, A., Boddener, M., Becker, S., and Fasshauer, D. (2004). Structural basis for the inhibitory role of tomosyn in exocytosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 47192-47200.
- Ponsioen, B., Gloerich, M., Ritsma, L., Rehmann, H., Bos, J. L., and Jalink, K. (2009). Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP. *Molecular and cellular biology* 29, 2521-2531.
- Powell, C. M. (2006). Gene targeting of presynaptic proteins in synaptic plasticity and memory: across the great divide. *Neurobiology of learning and memory* 85, 2-15.
- Putz, G., and Heisenberg, M. (2002). Memories in *drosophila* heat-box learning. *Learn Mem* 9, 349-359.
- Qin, H., Cressy, M., Li, W., Coravos, J. S., Izzi, S. A., and Dubnau, J. (2012). Gamma neurons mediate dopaminergic input during aversive olfactory memory formation in *Drosophila*. *Current biology : CB* 22, 608-614.
- Qin, H., and Dubnau, J. (2010). Genetic disruptions of *Drosophila* Pavlovian learning leave extinction learning intact. *Genes, brain, and behavior* 9, 203-212.
- Quinn, W. G., and Dudai, Y. (1976). Memory phases in *Drosophila*. *Nature* 262, 576-577.
- Quinn, W. G., Harris, W. A., and Benzer, S. (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 708-712.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome research* 11, 1114-1125.
- Renger, J. J., Ueda, A., Atwood, H. L., Govind, C. K., and Wu, C. F. (2000). Role of cAMP cascade in synaptic stability and plasticity: ultrastructural and physiological analyses of individual synaptic boutons in *Drosophila* memory mutants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 3980-3992.
- Richmond, J. E., and Broadie, K. S. (2002). The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Current opinion in neurobiology* 12, 499-507.
- Riedel, G., Platt, B., and Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural brain research* 140, 1-47.
- Riemensperger, T., Voller, T., Stock, P., Buchner, E., and Fiala, A. (2005). Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Current biology : CB* 15, 1953-1960.
- Risinger, C., and Bennett, M. K. (1999). Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms. *Journal of neurochemistry* 72, 614-624.
- Roberts, A. C., and Glanzman, D. L. (2003). Learning in *Aplysia*: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends in neurosciences* 26, 662-670.
- Roman, G., and Davis, R. L. (2001). Molecular biology and anatomy of *Drosophila* olfactory associative learning. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23, 571-581.

- Rubin, C. S. (1994). A kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP. *Biochimica et biophysica acta* 1224, 467-479.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., *et al.* (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *SCIENCE* 287, 2204-2215.
- Sachse, S., Rueckert, E., Keller, A., Okada, R., Tanaka, N. K., Ito, K., and Vosshall, L. B. (2007). Activity-dependent plasticity in an olfactory circuit. *Neuron* 56, 838-850.
- Sakaba, T., and Neher, E. (2003). Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* 424, 775-778.
- Sakisaka, T., Yamamoto, Y., Mochida, S., Nakamura, M., Nishikawa, K., Ishizaki, H., Okamoto-Tanaka, M., Miyoshi, J., Fujiyoshi, Y., Manabe, T., and Takai, Y. (2008). Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. *The Journal of cell biology* 183, 323-337.
- Scheunemann, L., Jost, E., Richlitzki, A., Day, J. P., Sebastian, S., Thum, A. S., Efetova, M., Davies, S.-A., and Schwarzel, M. (2012). Consolidated and Labile Odor Memory Are Separately Encoded within the *Drosophila* Brain. *J Neuroscience* 32, 17163-17171.
- Scheunemann, L., Skroblin, P., Hundsrucker, C., Klussmann, E., Efetova, M., and Schwarzel, M. (2013). AKAPS act in a two-step mechanism of memory acquisition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 17422-17428.
- Schmidt, M., Dekker, F. J., and Maarsingh, H. (2013). Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacological reviews* 65, 670-709.
- Schwaerzel, M., Heisenberg, M., and Zars, T. (2002). Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* 35, 951-960.
- Schwaerzel, M., Jaeckel, A., and Mueller, U. (2007). Signaling at A-kinase anchoring proteins organizes anesthesia-sensitive memory in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 1229-1233.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., and Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 23, 10495-10502.
- Seino, S., and Shibasaki, T. (2005). PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiological reviews* 85, 1303-1342.
- Shang, Y., Claridge-Chang, A., Sjulson, L., Pypaert, M., and Miesenbock, G. (2007). Excitatory local circuits and their implications for olfactory processing in the fly antennal lobe. *Cell* 128, 601-612.
- Si, A., Helliwell, P., and Maleszka, R. (2004). Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 77, 191-197.
- Siegel, R. W., and Hall, J. C. (1979). Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3430-3434.
- Silva, A. J., Rosahl, T. W., Chapman, P. F., Marowitz, Z., Friedman, E., Frankland, P. W., Cestari, V., Cioffi, D., Sudhof, T. C., and Bourchouladze, R. (1996). Impaired learning in mice with abnormal short-lived plasticity. *Current biology : CB* 6, 1509-1518.
- Skinner, B. F. (1938). *The behavior of organisms*, (New York,: Appleton-Century-Crofts).
- Skoulakis, E. M., and Grammenoudi, S. (2006). Dunces and da Vincis: the genetics of learning and memory in *Drosophila*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 975-988.
- Skoulakis, E. M., Kalderon, D., and Davis, R. L. (1993). Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron* 11, 197-208.

- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E. J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in biochemical sciences* *24*, 181-185.
- Soderling, S. H., and Beavo, J. A. (2000). Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Current opinion in cell biology* *12*, 174-179.
- Sokolowski, M. B. (2001). *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nat Rev Genet* *2*, 879-890.
- Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* *362*, 318-324.
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* *3*, 176-188.
- Ster, J., De Bock, F., Guerineau, N. C., Janossy, A., Barrere-Lemaire, S., Bos, J. L., Bockaert, J., and Fagni, L. (2007). Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in cerebellar neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 2519-2524.
- Stocker, R. F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell and tissue research* *275*, 3-26.
- Stocker, R. F., Heimbeck, G., Gendre, N., and de Belle, J. S. (1997). Neuroblast ablation in *Drosophila* P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons. *Journal of neurobiology* *32*, 443-456.
- Stocker, R. F., Lienhard, M. C., Borst, A., and Fischbach, K. F. (1990). Neuronal architecture of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *Cell and tissue research* *262*, 9-34.
- Sudhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* *375*, 645-653.
- Sudhof, T. C. (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* *28*, 317-320.
- Sudhof, T. C. (2013). A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nature medicine* *19*, 1227-1231.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., and Gilman, A. G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annual review of pharmacology and toxicology* *36*, 461-480.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* *395*, 347-353.
- Tanaka, N. K., Awasaki, T., Shimada, T., and Ito, K. (2004). Integration of chemosensory pathways in the *Drosophila* second-order olfactory centers. *Current biology : CB* *14*, 449-457.
- Tanaka, N. K., Endo, K., and Ito, K. (2012). Organization of antennal lobe-associated neurons in adult *Drosophila melanogaster* brain. *The Journal of comparative neurology* *520*, 4067-4130.
- Tanaka, N. K., Ito, K., and Stopfer, M. (2009). Odor-evoked neural oscillations in *Drosophila* are mediated by widely branching interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *29*, 8595-8603.
- Tanaka, N. K., Tanimoto, H., and Ito, K. (2008). Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of comparative neurology* *508*, 711-755.
- Technau, G., and Heisenberg, M. (1982). Neural reorganization during metamorphosis of the corpora pedunculata in *Drosophila melanogaster*. *Nature* *295*, 405-407.
- Technau, G. M. (1984). Fiber number in the mushroom bodies of adult *Drosophila melanogaster* depends on age, sex and experience. *Journal of neurogenetics* *1*, 113-126.
- Tempel, B. L., Bonini, N., Dawson, D. R., and Quinn, W. G. (1983). Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *80*, 1482-1486.
- Terrenoire, C., Houslay, M. D., Baillie, G. S., and Kass, R. S. (2009). The cardiac IKs potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. *The Journal of biological chemistry* *284*, 9140-9146.

- Tomchik, S. M., and Davis, R. L. (2009). Dynamics of learning-related cAMP signaling and stimulus integration in the *Drosophila* olfactory pathway. *Neuron* *64*, 510-521.
- Trudeau, L. E., Emery, D. G., and Haydon, P. G. (1996). Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron* *17*, 789-797.
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., and Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* *87*, 1327-1338.
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S. C., and Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. In *Cell*, pp. 35-47.
- Tully, T., and Quinn, W. G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* *157*, 263-277.
- Turner, G. C., Bazhenov, M., and Laurent, G. (2008). Olfactory representations by *Drosophila* mushroom body neurons. *Journal of neurophysiology* *99*, 734-746.
- Ueno, K., Naganos, S., Hirano, Y., Horiuchi, J., and Saitoe, M. (2013). Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body in cultured *Drosophila* brain. *The Journal of physiology* *591*, 287-302.
- Volders, K., Scholz, S., Slabbaert, J. R., Nagel, A. C., Verstreken, P., Creemers, J. W., Callaerts, P., and Schwarzel, M. (2012). *Drosophila rugose* is a functional homolog of mammalian Neurobeachin and affects synaptic architecture, brain morphology, and associative learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *32*, 15193-15204.
- Vosshall, L. B., and Stocker, R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual review of neuroscience* *30*, 505-533.
- Vosshall, L. B., Wong, A. M., and Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* *102*, 147-159.
- Waddell, S. (2013). Reinforcement signalling in *Drosophila*; dopamine does it all after all. *Current opinion in neurobiology* *23*, 324-329.
- Waddell, S., Armstrong, J. D., Kitamoto, T., Kaiser, K., and Quinn, W. G. (2000). The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell* *103*, 805-813.
- Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Durrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M. C., Schmidt, M., Qin, G., *et al.* (2006). Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* *49*, 833-844.
- Wang, Y., Mamiya, A., Chiang, A. S., and Zhong, Y. (2008). Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *28*, 4368-4376.
- Weimbs, T., Low, S. H., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Bucher, P., and Hofmann, K. (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: A new superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 3046-3051.
- Weissman, A. (1967). Drugs and retrograde amnesia. *International review of neurobiology* *10*, 167-198.
- Willoughby, D., and Cooper, D. M. F. (2007). Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiological reviews* *87*, 965-1010.
- Wilson, C., Pearson, R. K., Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Grossniklaus, U., and Gehring, W. J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes & development* *3*, 1301-1313.
- Wilson, R. I. (2013). Early olfactory processing in *Drosophila*: mechanisms and principles. *Annual review of neuroscience* *36*, 217-241.

- Wilson, R. I., and Laurent, G. (2005). Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 9069-9079.
- Wolf, R., and Heisenberg, M. (1991). Basic organization of operant behavior as revealed in *Drosophila* flight orientation. *J Comp Physiol A* 169, 699-705.
- Wong, W., and Scott, J. D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 959-970.
- Wu, C. L., Shih, M. F., Lai, J. S., Yang, H. T., Turner, G. C., Chen, L., and Chiang, A. S. (2011). Heterotypic gap junctions between two neurons in the *drosophila* brain are critical for memory. *Current biology : CB* 21, 848-854.
- Wu, C. L., Shih, M. F., Lee, P. T., and Chiang, A. S. (2013). An Octopamine-Mushroom Body Circuit Modulates the Formation of Anesthesia-Resistant Memory in *Drosophila*. *Current biology : CB*.
- Wu, C. L., Xia, S., Fu, T. F., Wang, H., Chen, Y. H., Leong, D., Chiang, A. S., and Tully, T. (2007). Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Nature neuroscience* 10, 1578-1586.
- Wustmann, G., and Heisenberg, M. (1997). Behavioral manipulation of retrieval in a spatial memory task for *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* 4, 328-336.
- Xia, S., Miyashita, T., Fu, T. F., Lin, W. Y., Wu, C. L., Pyzocha, L., Lin, I. R., Saitoe, M., Tully, T., and Chiang, A. S. (2005). NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in *Drosophila*. *Current biology : CB* 15, 603-615.
- Xie, Z., Huang, C., Ci, B., Wang, L., and Zhong, Y. (2013). Requirement of the combination of mushroom body gamma lobe and alpha/beta lobes for the retrieval of both aversive and appetitive early memories in *Drosophila*. *Learn Mem* 20, 474-481.
- Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A. R., Neher, E., and Jahn, R. (1999). Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell* 99, 713-722.
- Yamada, A., Sekiguchi, T., Suzuki, H., and Mizukami, A. (1992). Behavioral analysis of internal memory states using cooling-induced retrograde amnesia in *Limax flavus*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12, 729-735.
- Yamamoto, Y., Mochida, S., Kurooka, T., and Sakisaka, T. (2009). Reciprocal intramolecular interactions of tomosyn control its inhibitory activity on SNARE complex formation. *The Journal of biological chemistry* 284, 12480-12490.
- Yamamoto, Y., Mochida, S., Miyazaki, N., Kawai, K., Fujikura, K., Kurooka, T., Iwasaki, K., and Sakisaka, T. (2010). Tomosyn inhibits synaptotagmin-1-mediated step of Ca<sup>2+</sup>-dependent neurotransmitter release through its N-terminal WD40 repeats. *The Journal of biological chemistry* 285, 40943-40955.
- Yamazaki, D., Horiuchi, J., Miyashita, T., and Saitoe, M. (2010). Acute inhibition of PKA activity at old ages ameliorates age-related memory impairment in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 15573-15577.
- Yamazaki, D., Horiuchi, J., Nakagami, Y., Nagano, S., Tamura, T., and Saitoe, M. (2007). The *Drosophila* DCO mutation suppresses age-related memory impairment without affecting lifespan. *Nature neuroscience* 10, 478-484.
- Yang, M. Y., Armstrong, J. D., Vilinsky, I., Strausfeld, N. J., and Kaiser, K. (1995). Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. *Neuron* 15, 45-54.
- Yang, Y., Shu, X., Liu, D., Shang, Y., Wu, Y., Pei, L., Xu, X., Tian, Q., Zhang, J., Qian, K., *et al.* (2012). EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation. *Neuron* 73, 774-788.
- Yin, J. C., Del Vecchio, M., Zhou, H., and Tully, T. (1995). CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 81, 107-115.

- Yin, J. C., and Tully, T. (1996). CREB and the formation of long-term memory. *Current opinion in neurobiology* 6, 264-268.
- Yin, J. C., Wallach, J. S., Del Vecchio, M., Wilder, E. L., Zhou, H., Quinn, W. G., and Tully, T. (1994). Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 49-58.
- Yizhar, O., Lipstein, N., Gladycheva, S. E., Matti, U., Ernst, S. A., Rettig, J., Stuenkel, E. L., and Ashery, U. (2007). Multiple functional domains are involved in tomosyn regulation of exocytosis. *Journal of neurochemistry* 103, 604-616.
- Yokoyama, S., Shirataki, H., Sakisaka, T., and Takai, Y. (1999). Three splicing variants of tomosyn and identification of their syntaxin-binding region. *Biochemical and biophysical research communications* 256, 218-222.
- Yu, D., Keene, A. C., Srivatsan, A., Waddell, S., and Davis, R. L. (2005). *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell* 123, 945-957.
- Yu, D., Ponomarev, A., and Davis, R. L. (2004). Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning; memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron* 42, 437-449.
- Yu, D. H., Akalal, D. B. G., and Davis, R. L. (2006). *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* 52, 845-855.
- Zaccolo, M., Magalhaes, P., and Pozzan, T. (2002). Compartmentalisation of cAMP and Ca(2+) signals. *Current opinion in cell biology* 14, 160-166.
- Zars, T. (2010). Short-term memories in *Drosophila* are governed by general and specific genetic systems. *Learn Mem* 17, 246-251.
- Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., and Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *SCIENCE* 288, 672-675.
- Zhang, S., and Roman, G. (2013). Presynaptic inhibition of gamma lobe neurons is required for olfactory learning in *Drosophila*. *Current biology : CB* 23, 2519-2527.
- Zhong, N., and Zucker, R. S. (2005). cAMP acts on exchange protein activated by cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange protein to regulate transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 208-214.
- Zhong, Y., Budnik, V., and Wu, C. F. (1992). Synaptic plasticity in *Drosophila* memory and hyperexcitable mutants: role of cAMP cascade. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12, 644-651.
- Zhong, Y., and Wu, C. F. (1991). Altered synaptic plasticity in *Drosophila* memory mutants with a defective cyclic AMP cascade. *SCIENCE* 251, 198-201.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten GAL4- Linien.....	28
Tabelle 2: Reaktion auf die Duft- und Schockwahrnehmung.....	45

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das GAL4/UAS System. ....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz.....	6
Abbildung 3: Das assoziative Gedächtnis besteht aus unterschiedlichen Gedächtniskomponenten. ....	9
Abbildung 4: Schematische und anatomische Darstellung des olfaktorischen Systems. ....	11
Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der molekularen Mechanismen der aversiven Gedächtnisbildung.....	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung der aversiven olfaktorischen Konditionierung. ....	29
Abbildung 7: Dissoziation des Mittelzeitgedächtnisses (MTM) in Anästhesie-resistentes Gedächtnis (ARM) und Anästhesie-sensitives Gedächtnis (ASM).....	30
Abbildung 8: Eine gezielte Degradation der <i>DCO</i> Untereinheit von PKA führt zu einer graduellen Reduktion der PKA Aktivität. ....	35
Abbildung 9: Eine graduelle Herunterregulation der <i>DCO</i> Untereinheit von PKA führt zu einer aktivitätsabhängigen Beeinträchtigung mehrerer Gedächtniskomponenten. ....	36
Abbildung 10: Immunohistologische Darstellung der verwendeten Gal4-Linien, die den olfaktorischen Pfad markieren.....	38
Abbildung 11: PKA Signale werden in unterschiedlichen Strukturen des olfaktorischen Systems benötigt.....	40
Abbildung 12: PKA Signale auf der Ebene der LNs und der PNs tragen zur Bildung des ARM bei. ....	42
Abbildung 13: Auf der Ebene der Kenyonzellen beeinflussen unterschiedliche PKA Signale die Bildung von STM, ARM und ASM. ....	44
Abbildung 14: PKA zeigt sowohl einen akuten als auch einen entwicklungsbedingten Verhaltensdefekt. ....	48
Abbildung 15: EPAC wird für die Bildung des STM und des labilen ASM benötigt. ....	49
Abbildung 16: Spezifische genetische Manipulation von EPAC.....	51
Abbildung 17: EPAC ist auf der Ebene der KCs für die Bildung des STM und des ARM notwendig. ....	52
Abbildung 18: EPAC ist in den KCs hinreichend für die Bildung des STM und des ASM...	53
Abbildung 19: Schematische Gegenüberstellung der PKA-spezifischen und EPAC- spezifischen Funktion bei der Bildung des STM, ASM und ARM.....	54

Abbildung 20: Eine panneurale Manipulation reduziert Tomosyn auf RNA- und Proteinebene. ....	56
Abbildung 21: Tomosyn wird für die Bildung des labilen ASM benötigt. ....	57
Abbildung 22: Zeitliche Dynamik der Gedächtnisphasen im Wildtyp und in der Tomosynmutante $\Delta 924$ . ....	58
Abbildung 23: Tomosyn wird auf der Ebene der KCs für die Bildung des ASM benötigt. ...	59
Abbildung 24: Die tomosynspezifische cDNA ist funktionell in der Lage den ASM Effekt zu retten. ....	60
Abbildung 25: Tomosyn ist auf der Ebene der KCs für die Bildung des ASM ausreichend. .	61
Abbildung 26: Tomosyn ist innerhalb der KCs in den $\gamma$ Loben für die Bildung des ASM hinreichend. ....	62
Abbildung 27: Modellvorstellung zur Bildung <i>rut</i> -abhängiger Gedächtniskomponenten. ....	74
Abbildung 28: Modell der Beteiligung von PKA innerhalb eines komplexen Netzwerkes und auf molekularer Ebene bei der Bildung des <i>rut</i> -unabhängigen ARM. ....	80

## 10 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase ( <i>adenyl cyclase</i> )
ACh	Acetylcholin
AKAP	A-Kinase Ankerprotein
ALs	Antennalloben
amn	amnesiac
APL	anterior gepaart lateral
ARM	anesthesia-resistant memory
ASM	anesthesia-sensitive memory
ATP	Adenosintriphosphat
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CR	konditionierte Reaktion
CREB	cAMP response element binding protein
CS	konditionierter Stimulus
DA	Dopamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dnc	dunce
DPM	dorsal gepaart medial
dsRNA	doppelsträngige RNA
EPAC	exchange protein directly activated by cAMP
FDD	FRT-derived deletion
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor ( <i>guanine nucleotide exchange factor</i> )
G-Protein	GTP bindenes Protein
iACT	inneren Antennocerebraltrakt
LH	laterales Horn
LN <sub>s</sub>	lokale Interneurone
LTM	Langzeitgedächtnis ( <i>long-term memory</i> )
mACT	medianen Antennocerebraltrakt
MB <sub>s</sub>	Pilzkörper (mushroom bodies)
Mch	4-Methylcyclohexanol
MTM	Mittelzeitgedächtnis ( <i>middle-term memory</i> )
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NMJ	neuromuscular junction
nt	Nukleotide
OA	Octopamin
Oct	3-Octanol
OR	olfaktorische Rezeptoren
ORNs	olfaktorische Rezeptorneurone
PACAP	Hypophysen-Adenylatcyclase-aktivierendes Peptid
PDE	Phosphodiesterase
PI	Performanceindex
PKA	Proteinkinase A
PNs	Projektionsneurone
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rut	rutabaga
SNARE	soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor
STM	Kurzzeitgedächtnis ( <i>short-term memory</i> )
SVs	synaptische Vesikel
UAS	upstream activating sequenz, upstream activation sequence
UR	unkonditionierte Reaktion
US	unkonditionierter Stimulus
VUM <sub>mx1</sub>	ventrales ungepaartes medianes Neuron

## 11 Publikationen

Müssig, L., **Richlitzki, A.**, Rossler, R., Eisenhardt, D., Menzel, R., and Leboulle, G. (2010). Acute disruption of the NMDA receptor subunit NR1 in the honeybee brain selectively impairs memory formation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 7817-7825.

Chen, K., **Richlitzki, A.**, Featherstone, D. E., Schwarzel, M., and Richmond, J. E. (2011). Tomosyn dependent regulation of synaptic transmission is required for a late phase of associative odor memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 18482-18487.

Scheunemann, L., Jost, E., **Richlitzki, A.**, Day, J. P., Sebastian, S., Thum, A. S., Efetova, M., Davies, S.-A., and Schwarzel, M. (2012). Consolidated and Labile Odor Memory Are Separately Encoded within the *Drosophila* Brain. *J Neuroscience* 32, 17163-17171.

## **12 Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 15.07.2014

Antje Richlitzki