# Freie Universität Berlin Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie



## GENERIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER DELETIONSMUTANTEN DES G-PROTEIN GEKOPPELTEN REZEPTORS D2R VON DROSOPHILA MELANOGASTER

# DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

> vorgelegt von SABRINA SCHOLZ-KORNEHL

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 16.04.2010 bis 04.11.2014 an der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Schwärzel, Neurogenetik, angefertigt.

#### 1. Gutachter: Dr. Martin Schwärzel

Freie Universität Berlin, Institut für Biologie, Neurobiologie 2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Sigrist

Freie Universität Berlin, Institut für Biologie, Neurogenetik

**Disputationstermin:** 26.03.2015

Den Kopf halt hoch das Motto ist zu loben. Doch wichtiger noch ist: Man behält ihn oben!

H.G. Stengel

Für meine große Liebe Sebastian

# Zusammenfassung

Dopamin ist als Neurotransmitter unmittelbar an Prozessen der Gedächtnisbildung beteiligt, jedoch ist bis heute wenig über die genaue Funktionsweise dieses biogenen Amines bekannt. Die im Gehirn exprimierten Dopamin-Rezeptoren können entweder aktivierend oder auch inhibierend auf Neurone wirken, je nach gekoppeltem G-Protein. In dieser Arbeit wurde die Rolle des Dopamin-Rezeptors D2R in Drosophila untersucht, welcher zu den D2-ähnlichen G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehört und an ein inhibitorisches G-Protein koppelt. Um die Funktionsweise des D2R Rezeptors im Zusammenhang mit Gedächtnisprozessen und seinen Einfluss auf dynamisch verschiedene Gedächtnisphasen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Deletionsmutanten des Rezeptors generiert und mit Hilfe des gut etablierten olfaktorischen Konditionierungsparadigmas analysiert. Das aversive Lernparadigma macht sich die Duftkonditionierung zunutze, um dynamisch verschiedenen Gedächtnisphasen voneinander zu trennen. Dabei unterscheidet man die stabile Gedächtnisphase, welche bei einer Anästhesie nicht beeinträchtigt wird, und die labile Gedächtnisphase, welche dadurch ausgelöscht wird. So können entscheidende Fragen adressiert werden: Wie werden Gedächtnisse stabil konsolidiert oder lediglich labil implementiert und welche Rolle spielt das dopaminerge System, speziell der Rezeptor D2R, dabei?

Die hier generierten Deletionsmutanten wiesen eine Beeinträchtigung im aversiven olfaktorischen Gedächtnis auf. Bei der Analyse der D2R-Mutanten konnte die Gedächtnisreduktion auf einen Ausfall der stabilen Gedächtnisphase zurückgeführt werden, während die labile intakt blieb. Dieser Phänotyp konnte ebenfalls durch einen RNAi-bedingten D2R-Knockdown hervorgerufen werden und wurde durch die panneurale Expression der D2R-cDNA Isoform 606 in der Deletionsmutante gerettet. Die etablierte D2R-spezifische RNAi-Linie und das hier vorgestellte D2R-cDNA-Konstrukt wurden genutzt, um D2R-relevanten Strukturen zu identifizieren, die für die Bildung des aversiven Gedächtnisses zuständig sind. Bei dieser Analyse zeigten sich Unterschiede in den identifizierten Strukturen. Der spezifische RNAi-Knockdown wies Pilzkörper-extrinsische Neuronen wie die anterior-paarig lateralen Neuronen, die lokalen Interneuronen des Antennallobus oder die dopaminergen Neuronen sowie neuronale Subpopulationen des Pilzkörpers, die  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma$ -Loben, als relevante Strukturen für die Gedächtnisbildung aus, wohingegen die Rettung mit den cDNA-Konstrukt nur die  $\alpha/\beta$ und  $\gamma$ -Loben identifizierte. Die Inkongruenz in den Strukturdaten könnten sich auf die verschiedenen Isoformen des D2R-Rezeptors zurückführen lassen. Diese sind bereits für den homologen D2R-Rezeptor der Säuger nachgewiesen und es wurde gezeigt, dass seine Isoformen in ihren Expressionorten und ihrer Funktion variieren können.

Diese Arbeit liefert wertvolle Hinweise auf die Funktionalität des D2R-Rezeptors in den Prozessen des Lernens und Gedächtnisses und stellt mit der Etablierung der Mutante und dem cDNA-Konstrukt hilfreiche Werkzeuge für folgende Analysen zur Verfügung. Es konnte gezeigt werden, dass inhibitorische Dopaminsignale speziell zur Ausbildung der stabilen Gedächtnisphase benötigt werden, aber auch, dass die neuronale Integration dieser Signale hoch komplex ist. Die hier gezeigte Beteiligung des D2R-Rezeptors an der Konsolidierung des Gedächtnisses lässt auf eine Koregulierung mit den funktionell D1-ähnlichen, also aktivierenden Rezeptoren schließen und steht damit im Mittelpunkt von integrativen Mechanismen, welche dynamische Gedächtnisprozesse direkt steuern. Dabei kommen den einzelnen Isoformen unterschiedliche Wirkungsorte, Funktionen und Stellenwerte im Signalweg zu.

# Summary

Dopamine is one of the most important neurotransmitter and mediates memory dependent transmission in mushroom body neurons, however very few is known about the function of the biogenic amine. The dopamine-receptor, expressed in the brain, could be act stimulatory or inhibitory on the neurons, depending on the kind of coupled G-protein. In this thesis, the role of the dopamine receptor D2R in *Drosophila* is aimed to be examined. It belongs to the D2-like-G-Potein coupled receptors and couples on an inhibitory G-Protein. Dopamine has been shown to be involved in memory dependent processes and depletion of dopaminergic signaling was shown to impair memory formation in Drosophila. To examine the function of D2R in learning and memory and its effect on the dynamic phases of memory a deletion mutant of the receptor D2R was generated in this study and analysed in olfactory learningparadigm. The aversive paradigm of olfactory memories was established years ago and it uses odor conditioning to separate and examine different dynamic phases of memory. Thereby it is possible to distinguish between a stable anesthesia resistant phase and a labile anesthesia sensitive phase, which is erased by anesthetic treatment of the fly. So we could adress pivotal questions: How could be memories stable consolidated or labile implemented and which role plays the dopaminergic system, especially D2R?

The mutant indeed shows a reduction of the aversive olfactory memory. During the detailed analysis of the D2R-deletion mutant it could be shown, that the reduction of memory results from a loss of the stable phase while the labile phase is unaffected. This phenotype could be evoked by a D2R-spezific RNAi-knockdown and it could be rescued by panneural expressing the D2R-cDNA isoform 606. The established D2R-specific RNAi-line and the cDNA-construct introduced in this study were then used to identify the D2R-relevant structures, which are involved in the consolidation of stable memory. Here, an involvement of the  $\alpha/\beta$ - and  $\gamma$ -lobes of the D2R receptor was shown, which could be localized by the RNAi-line and the cDNA-rescue construct. But also an incongruity in both tools had been shown. A RNAi-knockdown in mushroombody-extrinsic neurons, the anterior paired neurons, the local interneurons of the antennal lobe or in dopaminergic

neurons lead to a loss of the stable memory phase, while its was not possible to rescue the phenotype in this structures. This difference could be due to the different isoforms of the D2R-receptor. It was shown that the homolog mammalian D2R-receptor has several isoforms, which vary in their expression and in their function. This leads to a changed affinity of the  $G_i$ -Proteins.

The present study gives useful evidences of the function of the D2R-receptor in learning and memory and it established the deletion mutant and the cDNAconstruct as helpful tools in following analyses. It could be shown, that inhibitory dopamine signals are specifically involved in the consolidation of stable memory in Drosophila and moreover, that the integration of these signals are highly complex. The results of this study highlight a possible coregulation between the activating D1-like and inhibitory D2-like-receptors. It seems that the quantitative and temporal regulation of the dopamine release and the receptor sensibility of ligands are crucial in the modulation of dopaminergic receptors, putting D2R at the heart of memory dependent signal integration that leads to the realization of different memory phases. Thereby the single isoforms have different areas of effect, functions and local values.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einl	Einleitung			
	1.1	Drosophila - Möglichkeiten der Manipulation	1		
		1.1.1 Das GAL4/UAS-System	2		
		1.1.2 Spezifischer Genknockdown mittels RNA Interferenz (RNAi)	4		
		1.1.3 Die FRT-FLP-Technik	6		
	1.2	Klassische Konditionierung	7		
	1.3	Olfaktorisches Lernen bei <i>Drosophila</i>	8		
	1.4	Gedächtniskomponenten	10		
	1.5	Gedächtnisbildung	12		
		1.5.1 CS- und US-Signalweg	13		
		1.5.2 cAMP Signaltransduktion	15		
	1.6	Biogene Amine	18		
		1.6.1 Dopamin	19		
	1.7	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	20		
		1.7.1 Dopamin-Rezeptoren	22		
	1.8	Ziel dieser Arbeit	26		
2	Mat	erial und Methoden	28		
	2.1	Drosophila melanogaster - Haltung und Genotypen	28		
	2.2	Generierung spezifischer Deletionsmutanten	28		
	2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30		
		2.3.1 Two-sided-PCR	31		
	2.4	Olfaktorische Konditionierung	32		
	2.5	Statistische Analyse	34		
	2.6	Verwendete Software	35		
3	Erg	ebnisse	36		
	3.1	Generierung spezifischer Deletionen von D2R	36		
	3.2	Phänotypisierung der Deletionsmutanten	38		
		3.2.1 Reduktion des Gedächtnisses trotz normaler Sensorik	39		

		3.2.2	D2R-Deletion verursacht Gedächtnisreduktion	40			
		3.2.3	Stabile Gedächtnisphase bereits im STM betroffen	42			
	3.3	Einordu	ung in den cAMP Signalweg	44			
	3.4	System	ische Analyse des D2R-Rezeptors mittels RNAi	46			
	3.5	5 Funktionelle Rettung des D2R-Rezeptors mittels cDNA-Konstruk					
	3.6	D2R wi	ird akut im adulten Gehirn für die Gedächtnisbildung benötig	t 49			
	3.7	D2R in	den Pilzkörperneuronen ist notwendig und hinreichend für				
		ein kon	solidiertes Gedächtnis	51			
	3.8	Identifi	zierte Strukturen für D2R im olfaktorischen Signalweg sind				
		inkong	ruent	56			
4 Diskussion							
	4.1	D2R be	einflusst das konsolidierte olfaktorische Gedächtnis	62			
	4.2	D2R-In	kongruenz zwischen notwendigen und hinreichenden Struk-				
		turen		64			
		4.2.1	Die APL-Neurone	65			
		4.2.2	Der Antennallobus (AL)	66			
		4.2.3	Die dopaminergen Neurone (DANs)	67			
		4.2.4	Die $\alpha/\beta$ - und $\gamma$ -Loben	68			
	4.3	D2R-Ise	oformen besitzen unterschiedliche Expression und Funktion	69			
	4.4	Oligom	erisierung von GPCR	73			
	4.5	Funktic	onsmodell des D2R-Rezeptors in der Gedächtnisbildung	74			
Lit	teratu	urverzei	chnis	80			
Abbildungsverzeichnis 1							
Та	Tabellenverzeichnis						
At	Abkürzungsverzeichnis						
Ar	Anhang						
Ρι	Publikationsverzeichnis						

Danksagung	114
Eidesstattliche Versicherung	115

# 1 Einleitung

Dopamin (DA) ist eines der wichtigsten biogenen Amine im Tierreich und beeinflusst als Neurotransmitter, Neuromodulator und Neurohormon unzählige physiologische und zelluläre Prozesse. In Vertebraten und Invertebraten spielt DA eine wichtige Rolle, so hat es im Belohnungssystem der Vertebraten eine zentrale Funktion als Neurotransmitter. Es ist immer noch unklar, wie genau dopaminerge Neuronen kontrolliert werden und was die Ausschüttung des Neurotransmitters DA für das gesamte System bedeutet, jedoch hat eine Störung im dopaminergen System schwerwiegende Folgen. Ein besseres Verständnis des Systems biogener Amine ist dringend erforderlich, um die Ursachen von Krankheiten und Fehlfunktionen besser zu verstehen. Aufgrund der vielen Homologien im Bereich der biogenen Amine ist es möglich diese komplexen Systeme an den physiologisch einfacheren Invertebraten zu untersuchen, um so ein fundiertes Grundverständnis zu schaffen. In dieser Arbeit steht der Modellorganismus Drosophila melanogaster mit seinem DA-Rezeptor D2R im Mittelpunkt. Aufgrund seiner hohen Fertilität, seiner kurzen Generationsdauer und seines vielseitiges Verhaltensrepertoires ist dieser Modellorganismus dafür ideal.

## 1.1 Drosophila - Möglichkeiten der Manipulation

Das Bedürfnis die Funktionsweise unseres Verstandes und Körpers zu verstehen, ist in Anbetracht schwerwiegender Krankheiten nur all zu natürlich. Jedoch gestaltet es sich angesichts einer solchen Komplexität von über 85 Millarden Neuronen - allein im menschlichen Gehirn - als große Herausforderung (Azevedo et al., 2009). Da erscheint es durchaus sinnvoll sich weniger komplexe Modellorganismen zunutze zu machen und nach Homologien und Unterschieden zu suchen, um die Hintergründe und Funktionsweisen zu erforschen. *Drosophila melanogaster* zum Beispiel (z.B.) gehört zu einem der best untersuchten, best etablierten und best charakterisierten Modellorganismen. Nicht nur in der Genetik, sondern auch in den Neurowissenschaften ist sie ein beliebtes Forschungsobjekt und im Laufe der Jahrzehnte ist eine Vielzahl genetischer Manipulationswerkzeuge für sie entwickelt worden. Nach heutigem Stand der Wissenschaft können einzelne Gene oder auch Gengruppen stillgelegt werden, um ihre Funktion und Wirkungsweise zu untersuchen. Dabei ist es möglich, ein Gen völlig oder nur temporär zu manipulieren, die Expression eines Gens völlig, temporär oder gewebespezifisch zu steuern oder ein Gen an ein fluoreszierendes Protein (GFP) zu koppeln, um es zu lokalisieren. Auch das Einbringen eines art-fremden Gens ist möglich. *Drosophila* bietet viele verschiedene Möglichkeiten der Manipulation (Neckameyer & Bhatt, 2012). In diesem Abschnitt sollen drei gängige und dieser Arbeit zugrunde liegende Manipulationswerkzeuge kurz umrissen werden.

#### 1.1.1 Das GAL4/UAS-System

Das GAL4/UAS-System ist eines der bekanntesten Werkzeuge in der Drosophila-Genetik (Brand & Dormand, 1995; Duffy, 2002). Unter Nutzung dieses Werkzeugs lassen sich Gene gezielt exprimieren. Upstream Activating Sequenz (UAS) steht dabei für die Aktivierungssequenz, an die der hefespezifische Transkriptionsfaktor GAL4 binden muss, um die stromabwärts liegende cDNA zu exprimiern. So können Mosaiktiere generiert werden, um die Funktion eines bestimmten Proteins gewebespezifisch zu untersuchen. Unter Mosaiktieren versteht man Fliegen, die für ein Gen mutant sind und das entsprechende Protein nicht mehr oder nur noch in geringem Maß synthetisieren können. Mittels des UAS/GAL4-Sytems ist es nun möglich dieses Gen auf cDNA-Basis in gewünschten Geweben oder auch im ganzen Körper wieder zur Verfügung zu stellen (Brand & Perrimon, 1993; Manseau et al., 1997). In Abbildung 1.1 ist die Wirkungsweise des GAL4/UAS-Systems schematisch dargestellt. Die Parentalgeneration ( $F_0$ ) besitzt die genetisch relevanten Elemente im Genom. Zum einen ist dies der kodierende Bereich für den Transkriptionsfaktor GAL4 (Treiberlinie), welcher ursprünglich aus der Hefe Saccharomyces stammt. Der Transkriptionsfaktor steht unter Kontrolle eines schwachen Promotors und eines gewebespezifischen Enhancers. Ein Enhancer ist ein Transkriptionsverstärker, welcher die Expression des nachfolgenden Genes

fördert. Durch die Nutzung spezifischer Enhancer ist es möglich, das Zielgen nur in bestimmten Geweben beziehungsweise (bzw.) zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. im Larvalstadium) wiederherzustellen.



**Abbildung 1.1: GAL4/UAS-System.** Durch Kreuzung der Parentalgeneration ( $F_0$ ) gelangen die genetisch relevanten Elemente in die Individuen der Nachkommengeneration ( $F_1$ ). Der gewebespezifische Enhancer verstärkt die Expression des Transkriptionsfaktors GAL4. Dieser bindet an das UAS-Motiv und ermöglicht die Expression des Zielgens bzw. der cDNA. Daraus resultiert die gewebespezifische Transkription und Translation des Zielproteins (Fischer et al., 1988; Brand & Dormand, 1995; Manseau et al., 1997; Brand & Dormand, 1995; Duffy, 2002).

Das andere genetisch relevante Element ist das UAS-Motiv mit dem sich anschließenden Zielgen (Effektorlinie). Durch Bindung des GAL4 an das UAS-Motiv kann dieses aktiviert werden und das Zielgen wird exprimiert (Fischer et al., 1988; Brand & Dormand, 1995; Manseau et al., 1997). Nur die Nachkommen (F<sub>1</sub>) besitzen alle Elemente gemeinsam. Weitere Verwendungsmöglichkeiten dieses Werkzeugs sind die Überexpression eines Zielgens oder die Expression eines Fremdgens in *Drosophila*, ebenso wie die Lokalisierung bestimmter Strukturen oder Proteine unter Kopplung des oben genannten GFPs an das Zielgen (Dutta et al., 2002).

# 1.1.2 Spezifischer Genknockdown mittels RNA Interferenz (RNAi)

Die RNA Interferenz (RNAi) ist 1998 von Fire und Mello in *Caenorhabditis elegans* entdeckt worden (Fire et al., 1998; Tabara et al., 1998). Sie konnten zeigen, dass künstlich in den Organismus eingebrachte doppelsträngige RNA (dsRNA) einen sequenzspezifischen Abbau der komplementären endogenen messenger RNA (mRNA) initiiert, was einen Verlust des korrespondierenden Proteins verursacht. Dieser Vorgang wird als posttranskriptionale Genstilllegung (Gene Silencing) bezeichnet, da er ausschließlich posttranskriptional stattfindet. Spezifisches Gene Silencing wirkt gen-regulierend und scheint ein Verteidigungsmechanismus der Zelle gegen Fremd-RNA (z.B. virale RNA) zu sein (Fire et al., 1998; Tabara et al., 1998).

Die Nutzung des GAL4/UAS-Systems erlaubt eine zeitliche und räumliche Steuerung der RNAi-Expression (Duffy, 2002). Dieses Verfahren ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Auch bei dieser Methode werden die oben beschriebene Treiberlinie (GAL4-Linie) und Effektorlinie (UAS-Linie) miteinander verkreuzt, um alle genetisch notwendigen Strukturen in den Nachkommen ( $F_1$ ) zu erhalten. Mit ihrer Aktivierung des UAS-Motivs wird die Expression der nachfolgenden invertierten und wiederholten Sequenz (Inverse Repeat) initiiert, welche aus einem kurzen Abschnitt des Zielgens besteht. Wird nun das Inverse Repeat exprimiert, entsteht eine Haarnadel-ähnliche doppelsträngige RNA (dsRNA). Diese sogenannten Hairpins interferieren mit der homologen mRNA. In Folge dessen wird die mRNA bei der Bindung der 19 und 23 bp langen small interfering RNA (siRNA) degradiert und es kommt zur verminderten Proteinsynthese (Elbashir et al., 2001; Hannon, 2002; Kuttenkeuler & Boutros, 2004). Die RNAi findet in vielen Bereichen der Forschung ihren Einsatz. Jedoch kommt es hier nicht zu einem "Knockout" des betroffenen Gens, sondern zu einer unvollständigen Repression, einem "Knockdown". Damit ist eine verminderte Expression gemeint. RNAi in Drosophila arbeitet zellautonom. So ist es möglich, wildtypische und manipulierte Zellen gleichzeitig und im selben Organismus zu untersuchen.



Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines RNAi-Knockdown bei Drosophila. Die Treiberlinie und die Effektorlinie ( $F_0$ ) tragen die genetisch relevanten Elemente in ihrem Genom und vererben diese an die  $F_1$ -Generation weiter. Nur zusammen können diese Elemente genetisch aktiv werden. Der gewebespezifische Enhancer fördert die Expression des Transkriptionsfakors GAL4. Dieser bindet an die UAS und aktiviert es, womit das Inverse Repeat abgelesen und transkribiert wird. Das Inverse Repeat ist genspezifisch und besteht aus einer kurzen Sequenz des Zielgens, welche dahinter invers wiederholt wird. Es entstehen doppelsträngige RNAs (dsRNAs), welche haarnadelähnliche Strukturen (Hairpins) bilden. Sie induzieren Ribonukleaseaktivität und werden zu small interfering RNA (siRNA) degradiert. Die siRNAs interferieren mit der homologen Ziel-mRNA. Die homologe mRNA wird degradiert, was zu einer verminderten Proteinsynthese des Zielproteins führt (Ni et al., 2009).

Mit dieser Methode lässt sich fast jedes beliebige Gen in *Drosophila* manipulieren und untersuchen (Dietzl et al., 2007). Das Vienna Drosophila Research Center (VDRC) verwaltet und vertreibt eine einzigartige und vielfältige Kollektion an RNAi-Linien (Dietzl et al., 2007).

#### 1.1.3 Die FRT-FLP-Technik

Die *Drosophila*-Forschung hat in den letzten Jahren viele Möglichkeiten entwickelt, um genetische Mutanten zu generieren mit denen das entsprechende Gen untersucht, charakterisiert, kartographiert und seine Expression lokalisiert werden kann. Speziell im Bereich der chromosomalen Deletionen hat sich die FRT-FLP-Technik als besonders effizient und gut umsetzbar erwiesen (Parks et al., 2004).

Diese Methode basiert auf der gleichzeitigen Remobilisierung zweier FRTtragender P-Elemente im Bereich eines definierten Genlokus (Thibault et al., 2004; Parks et al., 2004). Kreuzt man die Hitzeschock-FLP-Rekombinase ein, kommt es zu einer Trans-Rekombination zwischen den beiden FRT-tragenden P-Elementen. Dies führt zu einer genomischen Deletion, bei der die inneren Randbereiche der P-Elemente samt des dazwischen liegenden Chromosomenbereichs eliminiert werden und nur die äußeren Randbereiche der P-Elemente erhalten bleiben (Abbildung 1.3). Im Bereich der 199 bp großen FRT-Motive beider Transposons erfolgt die homologe Rekombination. Bei dieser homologen Rekombination handelt es sich um eine intrachromosomale Rekombination, welche durch ein Crossing-over-Ereignis während der ersten meiotischen Teilung initiiert wird. Es gibt drei verschiedene Typen der FRT-tragenden-Transposons: XP-Transposons, RB-Transposons und WH-Transposons. Diese drei Typen unterscheiden sich in der Lage und Anzahl ihrer FRT-Motive. Entscheidend ist, dass nur typgleiche Transposons für eine Deletion genutzt werden können. Die Verifizierung einer chromosomalen Deletion erfolgt mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und für Etablierung von Stämmen mit positiven Deletionsereignissen werden Balancer genutzt, welche die entstandene Deletionsmutation stabil in ihrem Genom tragen. Dabei handelt es sich um Fliegenstämme mit Balancer-Chromosomen, durch welche eine erneute Rekombination mittels diverser Insertionen verhindert wird.



**Abbildung 1.3: FRT-FLP-Rekombination.** Generation einer definierten Deletion durch Remobilisierung zweier FRT-tragernder P-Elemente. Die homologe Rekombination durch Erzeugung eines Doppelstrangbruches in den FRT-Motiven der P-Elemente finden in Anwesenheit der FLP-Rekombinase statt.

## 1.2 Klassische Konditionierung

Aufgrund ihres vielfältigen Verhaltsrepertoire ermöglicht *Drosophila* die Untersuchung der Prozesse des Lernens und Gedächtnisses. Die Grundlagen und angewandten Techniken hierfür entwickelten sich aus der klassischen Konditionierung bei Vertebraten. Unter der Konditionierung bzw. dem assoziativen Lernen versteht man die Kopplung eines ursprünglich neutralen Reizes mit einer bestimmten Reaktion. Dabei wird klar zwischen der operanten (oder auch instrumentellen) und der klassischen Konditionierung unterschieden. Burrhus Frederic Skinner prägt 1938 die operante Konditionierung maßgeblich (Skinner, 1955, 1988). Er konditionierte naive Ratten darauf, bei Erleuchten eines Lämpchens einen Hebel zu betätigen. Sofern die Tiere dies in einer definierten Zeit taten, erhielten sie eine Futterbelohnung. Die operante Konditionierung ist dadurch gekennzeichnet, dass eine ursprünglich spontane Reaktion (das Drücken des Hebels) durch Belohnung oder Bestrafung positiv bzw. negativ verstärkt wird. Das operante Lernen kann somit auch als Lernen durch Versuch und Irrtum bezeichnet werden. Eine zeitliche Nähe von Reaktion und Reiz sind für den Lernerfolg entscheidend.

Bei der klassischen Konditionierung wird eine Assoziation zwischen einem ursprünglich neutralen Reiz und einer Belohnung (appetitiv) oder einer Bestrafung (aversiv) hergestellt. Bei erneutem Auftreten des Reizes kann die Belohnung bzw. Bestrafung vorhergesagt werden, je nach Lernerfolg. Der konditionierte Reiz allein ruft nun ein angeborenes Verhaltensmuster hervor und auch hier ist die zeitliche Nähe von Belohnung/Bestrafung und Reiz entscheidend für den Lernerfolg. Das wohl berühmteste Experiment zur klassischen Konditionierung führte Iwan Pavlov 1927 durch (Pavlov, 1951). Er konditionierte Hunde auf das Ertönen einer Glocke: Beim Ertönen dieser Glocke wurde den Hunden Futter gegeben, was zu einem verstärkten Speichelfluss führte. Nach erfolgreicher Assoziation erfolgte bei den Hunden auch dann Speichelfluss, wenn nur die Glocke ertönte und kein Futter dargereicht wurde.

### 1.3 Olfaktorisches Lernen bei Drosophila

Seit Skinner und Pavlov sind viele Paradigmen zum assoziativen Lernen entwickelt worden - sowohl für Vertebraten als auch für Invertebraten. Dabei kristallisierte sich das olfaktorische Lernparadigma bei *Drosophila melanogaster* als besonders erfolgreich heraus (Quinn et al., 1974). Diesem Lernparadigma zugute kommt die umfassend erforschte Hirnstruktur, die geringe Anzahl von Neuronen im Vergleich zu Primaten, sowie eine Reihe komplexer Verhaltensmuster (Busto et al., 2010). Das olfaktorische Lernparadigma bei *Drosophila*  liegt der klassischen Konditionierung nach Pavlov zu Grunde und macht sich angeborene Reflexe der Tiere zu Nutze. Mittels dieses Paradigmas lassen sich appetitive und aversive Lernprozesse konditionieren. Hierzu wird eine Zuckerlösung als Belohnung (appetitiv) bzw. Elektroschocks als Bestrafung (aversive) mit einem Duft als neutralen Reiz kombiniert. Dabei wird der vorher neutrale Reiz zum konditionierten Stimulus (CS). Dieser CS wird während des Trainings mit einem positiven (Zuckerlösung) oder negativen (Elektroschock) Reiz assoziiert. Die Zuckerlösung bzw. der elektrische Stromschock stellen dabei den unkonditionierten Stimulus (US) dar. Das gebildete aversive und appetitive Gedächtnis entsteht auf unterschiedlichen Signalwegen und unter Beteiligung unterschiedlicher Neurone (Schwaerzel et al., 2003; Zars, 2010; Waddell, 2013).

In dieser Arbeit wurde das aversive Lernparadigma genutzt (Tully & Quinn, 1985). Wie Quinn bereits 1985 zeigte, sind Fliegen in der Lage, einen gegebenen Duft mit gleichzeitig gegebenen Elektroschocks zu assoziieren. In einer anschließenden Testsituation, in der die Tiere zwischen zwei Düften wählen können, meiden sie den assoziierten Duft. Dieses Experiment wird in einer T-Maze durchgeführt. Abbildung 1.4 zeigt den detaillierten Ablauf dieses Paradigmas. Die Fliegen werden in ein mit Kupferdraht ausgekleidetes Röhrchen transferiert. Über einen Zeitraum von 1 min werden die Tiere dem Duft A (CS+) ausgesetzt. Zeitgleich werden ihnen 12 elektrische Schocks (US) verabreicht. Dies wird als eine CS+/US-Paarung bzw. ein Trainingsintervall definiert, welche durch eine Ruhephase von 30 s abgelöst wird. Im Anschluss erfolgt die Gabe des Dufts B (CS-) über 1 min, welcher unassoziiert bleibt. Für den Abruf des Gedächtnisses werden die Fliegen nun in die Testsituation überführt. Hier können sie 30 s lang zwischen zwei Röhrchen mit den beiden Düften A bzw. B wählen. Nach der Testphase werden die Tiere in jedem Röhrchen gezählt. Ein einziges Traingsintervall (eine CS/US-Paarung) genügt um ein Gedächtnis zu bilden, welches direkt nach dem Training abgerufen werden kann. Aus dem Verhältnis der Tiere in den Röhrchen wird der Performance-Index berechnet (siehe 2.4). Er stellt die Vermeidung des bestraften Duftes dar und gilt somit als Maß für den Lernerfolg. Bei wildtypischen Fliegen liegt er zwischen 60 bis 75 %, das heißt (d.h.) 60 bis 75 % der getesteten Fliegen entscheiden sich für den nicht bestraften Duft.





**Abbildung 1.4: Schema des aversiven olfaktorischen Lernparadigma.** Fliegen werden in einem mit Kupferdraht ausgekleideten Röhrchen für 1 min mit einer CS+/US Paarung exponiert. Dabei stellt ein Duft A den CS und 12 aufeinander folgende Elektroschocks den US dar. Anschließend erfolgt die Gabe von Frischluft für 30 s. Darauffolgend werden die Tiere 1 min lang einem Kontrollduft B (CS-) ausgesetzt. Um das STM abzurufen, werden die Tiere in der Testsituation vor die Wahl zwischen dem bestraften Duft (CS+) und dem unbestraften Kontrollduft (CS-) gestellt wobei sich 60-75 % der wildtypischen Fliegen für den CS- entscheiden. konditionierter Stimulus (CS), unkonditionierter Stimulus (US), Kurzzeitgedächtnis /Short-Term-Memory (STM)

Um auszuschließen, dass die ermittelte Performance auf eine natürliche Attraktivität oder Abstoßung der verwendeten Düfte zurückzuführen ist, wird ein reziproker Durchgang zeitgleich mit dem ersten durchgeführt und anschließend mit ihm verrechnet (Abschnitt 2.4).

## 1.4 Gedächtniskomponenten

Die Akquise und die Konsolidierung eines Gedächtnisses sind dynamische Prozesse (McGaugh, 2000). So lassen sich bei *Drosophila*, je nach Zeitpunkt des Gedächtnisabrufs, unterschiedliche Gedächtniskomponenten bestimmen, an deren Bildung verschiedene Mechanismen beteiligt sind (Tully et al., 1996; Yin et al., 1994; Bailey et al., 1996; Yin et al., 1994; Tully et al., 2003; Isabel et al., 2004; Margulies et al., 2005; Keene & Waddell, 2007; Knapek et al., 2010, 2011). Das STM wird sofort nach dem Training ausgebildet und erlischt im Verlauf einer Stunde. Schon zu diesem Zeitpunkt lassen sich eine labile und eine stabile Gedächtnisphase voneinander unterscheiden (Quinn & Dudai, 1976; Margulies et al., 2005; Knapek et al., 2011). Beide Phasen sind koexistent und von unterschiedlicher Dauer, sie klingen nach 5-6 h (labile Phase) bzw. nach 48 h (stabile Phase) ab. Zum Zeitpunkt ihrer maximalen Ausprägung, 3 h nach dem Training, bilden beide gemeinsam das Mittelzeitgedächtnis /Mid-Term-Memory (MTM) (Margulies et al., 2005).



**Abbildung 1.5:** Gedächtnisphasen von *Drosophila melanogaster*. Das messbare Gedächtnis bei *Drosophila* ist graduell abfallend und kann in verschiedene Komponenten unterteilt werden. Direkt nach dem Training wird das STM ausgeprägt, welches im Verlauf einer Stunde abklingt. Schon zu diesem Zeitpunkt lassen sich eine labile und eine stabile Gedächtnisphase nachweisen, welche über 5-6 h, im Falle der labilen, bzw. bis zu 48 h, im Falle der stabilen Phase, anhalten. Diese beiden Phasen sind koexistent und bilden nach 3 h zu ihrer höchsten Ausprägung zusammen das MTM. Das translationsabhängige LTM wird durch Space-Training konsolidiert. Es bildet sich erst nach mehreren Stunden und bleibt über Tage abrufbar (Tully et al., 1996; Yin et al., 1994; Bailey et al., 1996; Tully et al., 2003; Isabel et al., 2004; Margulies et al., 2005; Keene & Waddell, 2007). Die Abbildung entstand in Anlehnung an Tully et al., 2003; Margulies et al., 2005. Kurzzeitgedächtnis /Short-Term-Memory (STM), Mittelzeitgedächtnis /Mid-Term-Memory (MTM), Langzeitgedächtnis /Long-Term-Memory (LTM)

Labile und stabile Phasen können durch eine kältebedingte Anästhesie getrennt werden (Abschnitt 2.4, Isabel et al., 2004), wobei die labile Gedächtnisphase Anästhesie sensitiv ist und auslöscht wird, während die stabile Phase konsolidiert wird und erhalten bleibt (Isabel et al., 2004). Dabei ist die stabile Gedächtnisphase nicht translationsabhängig, im Gegensatz zum LTM. Das LTM steht noch nach einem längeren Zeitraum (Stunden/Tage) zur Verfügung und wird nur durch ein Space-Training, eine mehrfache Wiederholung eines Trainingsintervalls mit dazwischenliegenden Ruhephasen, generiert (Milner et al., 1998). Die dem LTM zugrunde liegende Transalation kann durch bestimmte Pharmazeutika unterbunden werden, was zu einer Inhibierung des LTM führt. In Abbildung 1.5 sind diese Gedächtnisphasen dargestellt. Es wurde mehrfach gezeigt, dass Mutanten bei *Drosophila* unterschiedliche Gedächtniskomponenten betreffen können. Insbesondere Gene, welche am cAMP-Signalweg beteiligt sind, tragen maßgeblich zur Bildung der einzelnen Gedächtnisphasen bei.

Zwei Protagonisten des cAMP-Signalweges sind die Gene *dunce (dnc)* und *rutabaga (rut)*. Die Phosphodiesterase (PDE)-Mutante dnc1 zeigt einen Ausfall in der Ausbildung der stabilen Gedächtnisphase (Dudai et al., 1976; Scheunemann et al., 2012), während die Adenylatzyklase (AC)-Mutante rut1 einen Verlust der labilen Gedächtnisphase aufweist (Dudai, 1983; Scheunemann et al., 2012). Beide sind unterschiedlich an der Bildung der einzelnen Gedächtnisphasen beteiligt und es konnte ein *dnc*-abhängiger und *rut*-abhängiger cAMP-Signalweg identifiziert werden, welcher den jeweiligen Gedächtniskomponenten zugeordnet werden konnten (Scheunemann et al., 2012).

## 1.5 Gedächtnisbildung

Im Falle des assoziativen Lernens werden zwei Reize miteinander verknüpft und führen zur Etablierung eines erlernten Verhaltensmusters, welches bei erneuter Reizgabe zum Abruf des angelegten Gedächtnisses führt. Hierzu müssen sowohl der CS und der US wahrgenommen, weitergeleitet und verarbeitet werden. Die Bildung eines Gedächtnisses ist ein sehr komplexer Vorgang, welcher verschiedene Ebenen umfasst.

#### 1.5.1 CS- und US-Signalweg

Der CS und der US werden durch unterschiedliche Rezeptoren aufgenommen und bis in die Pilzkörper (PK) zur integrativen Verarbeitung weitergeleitet. Abbildung 1.6 zeigt eine schematische Darstellung des adulten Gehirns von *Drosophila* und seine Innervierung (Aso et al., 2012). Anhand dieser abstrahierten Übersichtszeichnung sollen anschließend zum einen die olfaktorische Signalweiterleitung des CS und zum andern die Signalweiterleitung des US durch die dopaminerger Neuronen (DANs) bis hin zur integrativen Verarbeitung beider Reize in den PK erläutert werden.

Die PK stellen eine paarige und sehr dominante Struktur im Gehirn vieler Arthropoden dar. Bei *Drosophila* bestehen sie aus ca. 2500 intrinsischen Zellen, die als Kenyonzellen bezeichnet werden. Die Zellkörper der Kenyonzellen (KZ) liegen im dorsal-posterioren Gehirnbereich, während ihre Dendriten in die Kalyx der PK münden. Die Kalyx ist der neuropile Bereich in dem die Neuronen der PK auf die Synapsen der Projektionsneuronen (PNs) treffen, um die olfaktorische Information aufzunehmen (R. L. Davis, 2004; Tomchik et al., 2013). Die Axone der KZ bilden dabei den Pedunkel. Weiterführend verzweigen sie sich stärker, um die wichtigsten Verarbeitungsstrukturen des PK zu bilden: die morphologischunterschiedlichen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Loben und die  $\alpha'$ ,  $\beta'$  -Loben. In diesen Loben nehmen die KZ Kontakt zu extrinsischen Neuronen auf, welche ihrerseits die Information an andere Neuronenpopulationen über Synapsen weiterleiten. Dabei konnte eine Rückkopplungsschleife von den  $\alpha$ -Loben zur Kalyx nachgewiesen werden (R. L. Davis, 2005).



Abbildung 1.6: Übersicht über die dopaminerge Innervierung und die olfaktorische Transduktion im adulten Gehirn bei Drosophila. Der olfaktorische Stimulus wird von den ~2600 ORNs aufgenommen und an die einzelnen Glomeruli (~43) im AL weitergeleitet. Hier formen die ORNs Synapsen mit den i/e LNs und mit den PNs. Die PNs leiten die empfangenen Informationen in die Kalyx der PK über den iACT weiter und projizieren von dort in die KZ. Die PNs enden im Lateralen Horn. Einige der PN-Synapsen projizieren ausschließlich in das Laterale Horn über den mACT (R. L. Davis, 2004; Didelot et al., 2006; Keene & Waddell, 2007). Die drei Lobensysteme der PK  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  innervieren mit ihren Dendriten die Kalyx und nehmen so die olfaktorische Information auf (R. L. Davis, 2005). Es gibt acht verschiedene dopaminerge Neuronencluster im adulten Gehirn. Von ihnen innverieren drei die Lobensysteme: das PAM, das PPL1 und das PPL2ab (Aso et al., 2012). Diesen drei Clustern ist eine Beteiligung an der Weiterleitung des US in die Pilzkörper-Loben nachgewiesen (Aso et al., 2010, 2012). Olfaktorische Rezeptorneurone (ORNs), Antenallobus (AL), inhibitorische und exzitatorische lokale Interneurone (i/e LNs), Projektionsneurone (PNs), innerer antennocerebraler Trakt (iACT), medialer antenno-cerebraler Trakt (mACT), Pilzkörper (PK), Kenyonzellen (KZ), Protocerebrales anterior mediales Cluster (PAM), Protocerebrales posterior laterales Cluster 1 (PPL1), Protocerebrales posterior laterales Cluster 2ab (PPL2ab)

Die anterior-paarig lateralen Neurone (APLs) stellen bilaterale Neuronen dar, welche die GABAerge Rezeptoren in den PK innervieren (X. Liu et al., 2007, 2009, 2009) und einen inhibitorischen Signalweg darstellen. Die dorsal-paarig mediale Neuronen (DPM)-Aktivität wird beim olfaktorischen Lernen spezifisch erhöht, während gleichzeitig die Aktivität der APLs durch die Prozessierung des konditionierten Duftes reduziert wird (Yu et al., 2005; X. Liu et al., 2009). Infolgedessen kann angenommen werden, dass die APLs eine nichtselektive Querinhibierung darstellen, welche zur synaptischen Spezifität in den DPM-PK-APL-Verbindungen führt (Pitman et al., 2011). Diese inhibitorische Rückkopplung zwischen den PK und den APLs ist durchaus vorstellbar, zumal auch schon andere inhibitorische Rückkopplungen aus der synaptischen Plastizität im Lernen bekannt sind (S. D. Chang & Liang, 2012; Weinberger, 2004).

Der olfaktorische Reiz, der CS, wird durch die ~2600 Olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs) in den Antennen und den Maxillarpalpen aufgenommen und mittels ihrer Axone zu den ~43 Glomeruli im Antennallobus (AL) weitergeleitet, wo die Informationsweitergabe durch die Synapsen erfolgt. Zum einen formen die ORNs Synapsen mit den lokalen Interneuronen (LNs), welche axonlos sind und exzitatorisch oder inhibitorisch seinen können und zum anderen mit den PNs. Die PNs innervieren jedes Glomeruli im AL einzeln und leiten die olfaktorische Information in die PK und das Laterales Horn (LH) weiter, wo sie in den PK verarbeitet wird.

Bis jetzt ist die Weiterleitung des elektrischen Schocks, des US, und seiner inneliegenden Information wenig verstanden. Der US wird den PK durch die drei dopaminergen Cluster protocerebrales anteriomediales Cluster (PAM), protocerebrales posteriolaterales Cluster 1 (PPL1) und protocerebrales posteriolaterales Cluster 2ab (PPL2ab) präsentiert, welche DA an die PK-Synapsen freisetzen (R. L. Davis, 2005; Busto et al., 2010). Das DA aktiviert die DA-Rezeptoren und führen zu einer Modulation der AC und somit ebenfalls zu einer Regulation der cAMP-Produktion. Das koinzidente Auftreten des CS und des US erhöht den cAMP-Spiegel und führt zum Ausbilden eines Gedächtnisses.

#### 1.5.2 cAMP Signaltransduktion

Jeder physiologische Prozess in einem mehrzelligen Organismus wie z.B. Wachstum, Apoptose, Genregulation, Vermehrung und auch die Ausbildung



eines Gedächtnisses wird durch Stimuli reguliert (Pawson & Nash, 2000).

**Abbildung 1.7:** Schematische Darstellung der cAMP-Signaltransduktion und ihrer Bedeutung bei der Gedächtnisbildung. Der CS löst in den PK-Neuronen die Ausschüttung des Neurotransmitters ACh aus, welcher an die Ca<sup>2+</sup>-Kanäle bindet. Zeitgleich kommt die Erregung durch den US in den Neuronen an, welcher den GPCR durch DA aktiviert. Koinzident öffnen sich die Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, wodurch ein Ca<sup>2+</sup>-Influx beginnt und die Dissoziation des G-Proteins beginnt. Beide Ereignisse führen zur Aktivierung der AC, welche nun cAMP produziert. Der cAMP-Spiegel in der Zelle erhöht sich drastisch und es beginnt die intrazelluläre Signaltranduktion: cAMP bindet an verschiedene Proteine und aktiviert diese. Z.B. wird die PKA aktiviert, wodurch deren katalytische Untereinheit sich abspaltet. Sie phosphoryliert verschiedene Substrate, die bei der Gedächtnisbildung nötig sind (R. L. Davis, 2005; Kasuya et al., 2009; Busto et al., 2010; Tomchik et al., 2013). Die PDE baut cAMP wieder ab und beeinflusst damit den Zustand der Ca<sup>2+</sup>und K<sup>+</sup>-Kanälen (Delgado et al., 1991). Acetylcholin (ACh), Phosphodiesterase (PDE), Adenylatzyklase (AC), zyklisches Adenosinmonophospat (cAMP)

Dabei ist die Signaltransduktion, die gezielte und zeitnahe Weiterleitung dieses

Stimulus, von elementarer Bedeutung. Man unterscheidet zwischen extrazellulären und intrazellulären Signalen und demnach zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Signaltransduktion. Hierbei gelten Neurotransmitter, Hormone oder Ionen als extrazelluläre Signale. Aber auch Düfte, Licht, elektrische bzw. mechanische Reize und Wärme können als solche dienen. Dagegen beruht eine intrazelluläre Signaltransduktion auf Protein-Protein Interaktionen oder aber auf der Weiterleitung durch Sekundäre Botenstoffe (Second Messenger), wie z.B. cAMP und Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Der cAMP-Signalweg ist eine der wichtigsten Signaltransduktionswege. Durch ihn können äußere Reize schnell und effizient ins Zellinnere weitergeleitet und dort verarbeiten werden. cAMP dient hier als Sekundärer Botenstoff und wird durch die Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) durch eine membranständige AC gewonnen. Die Signaltransduktion von US und CS, welche zur Ausbildung eines Gedächtnisses führt, soll hier an einem molekularen Model direkt an einem PK-Neuron erklärt werden (Abbildung 1.7). Der olfaktorische Stimulus (CS) wird durch den Antennal Cerebral Tract (ACT) an die PK-Neurone weitergeleitet und der Neurotransmitters ACh wird in die KZ ausgeschüttet. Diese Neuronen bilden die Kalyx und mit ihnen interagieren die Dendriten der drei PK-Areale ( $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  und  $\gamma$  Loben Keene & Waddell, 2007; Busto et al., 2010). Durch die Ausschüttung des ACh erfolgt der Ca<sup>2+</sup>-Influx. Zeitgleich findet die Erregung durch den US, den elektrischen Schock, statt. Der US wird durch die Ausschüttung des Neurotransmitters DA präsentiert und aktiviert den G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Der Ca<sup>2+</sup>-Influx aktiviert das Ca<sup>2+</sup>-abhängige Calmodulin (CAM), welches die AC aktiviert. Dies führt zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels. Ebenso führt die Aktivierung des GPCR zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels, denn durch die Aktivierung des GPCR spaltet sich seine  $G_{\alpha}$ -Untereinheit ab und aktiviert ihrerseits ebenfalls die AC (Blenau & Baumann, 2003). Es kommt zu einer Koinzidenzdetektion, wobei CS und US gleichzeitig zur Aktivierung der AC führen. Diese drastische Steigerung des cAMP-Spiegels führt zur Aktivierung des PKA-Tetrames. cAMP bindet an PKA, wodurch die katalytische Untereinheit von der regulatorischen Untereinheit dissoziiert. Die katalytische Untereinheit der PKA ist somit in der Lage eine Vielzahl von Substraten zu phosphorylieren.

Für die Etablierung eines Gedächtnisses sind zahlreiche Gene potentiell wichtig. Ihre Bedeutungen im Einzelnen sind allerdings noch nicht vollständig klar. So weiß man, dass das Gen Nebula (nla) für eine normale Gedächtnisbildung nötig ist, da es die Protein-Phosphotase (P-Ptase)-Aktivität kontrolliert (D. J. Chang et al., 2003). Volado (Vol) und Fas II sind zellanhängende Rezeptoren, die die Signalübertragung vermitteln oder physikalische Anderung der synaptischen Verbindungen der PK steuern (Cremer et al., 1994). Eine solche morphologische Änderung ist für die Gedächtnisbildung essentiell. Weiterhin ist die Beteiligung des Genes Notch am LTM bekannt (Costa et al., 2002; Ge et al., 2004). Genauso essentiell für das LTM ist das Protein CREB (cAMP response element-binding Protein). Es wird durch die katalytische Untereinheit der PKA phosphoryliert und ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Proteinsynthese und somit die translationsabhängige Bildung des LTM begünstigt (Montminy et al., 1990). cAMP kann und muss jedoch auch abgebaut werden, um z.B. eine Habituation oder Ubererregung der Zelle zu vermeiden. Diese Aufgabe wird von der PDE übernommen. Sie degradiert cAMP zu 5'AMP. Dieses wird dann in einem Recyclingprozess wieder für die Signaltransduktion nutzbar gemacht. Die PDE ist so in der Lage Ionenkanäle zu beeinflussen und deren Zustände zu ändern. Ein Ausfall der PDE, wie z.B. bei der Mutante dunce führt zu einem sehr hohen cAMP-Level in der Zelle und somit zu einer Beeinträchtigung des olfaktorischen Lernens (Dudai et al., 1976).

### 1.6 Biogene Amine

Als biogene Amine, wie z.B. DA, bezeichnet man kleine, häufig basische Moleküle, welche eine Aminogruppe als funktionelle Gruppe tragen. Sie werden daher auch als Monoamine bezeichnet. Biogene Amine fungieren als Neurohormone, Neuromodulatoren oder als Neurotransmitter, sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten und regulieren hier eine große Anzahl an zellulären und physiologischen Prozessen (Dewhurst et al., 1972; Monastirioti, 1999; Blenau & Baumann, 2001). Das Belohnungssystem des Menschen und anderen Säugern umfasst eine Region im Gehirn, in welcher der Neurotransmitter DA ausgeschüttet wird, wenn der Mensch eine positive Bestätigung erfährt (Kadzielawa, 1974; Routtenberg, 1978). Das ausgeschüttete DA aktiviert eine Reihe anderer Hirnzentren, die für die Steuerung von Motivation, Verhalten und Lernfähigkeit verantwortlich sind (Di Chiara & Bassareo, 2007). Im Striatum und dem orbitofrontalen Cortex werden dabei Informationen verarbeitet, welche das Verhalten steuern (Linnet et al., 2012). Serotonin, Histamin, Tyramin, Dopamin und Octopamin sind die biogenen Amine, welche in *Drosophila melanogaster* identifiziert (Monastirioti, 1999), dabei ist z.B. Dopamin direkt an der Formation des Gedächtnisses beteiligt und vermittelt bestrafte und belohnte Situationen in *Drosophila melanogaster* (Schwaerzel et al., 2003; Busto et al., 2010; Waddell, 2010, 2013).

#### 1.6.1 Dopamin

DA gehört zur Gruppe der Katecholamine und ist in Invertebraten und Vertebraten als Neurotransmitter elementar. DA beeinflusst nicht nur die synaptische Modulation, sondern auch die Plastizität des Verhaltens (Monastirioti, 1999) und vermittelt neurologische und endokrine Funktionen (Draper et al., 2007). Es moduliert in *Drosophila* Lokomotor-Aktivität (Draper et al., 2007; Riemensperger et al., 2013), Sexualfunktionen (Chen et al., 2010) und steuert die Reaktionen im Körper auf Drogen wie Nikotin und Alkohol (H. Li et al., 2000; Bainton et al., 2000; Hearn et al., 2002). Wie neuere Studien zeigten, sind DA und die dopaminergen Neurone nicht nur an der Signaltransduktion des aversiven Lernens, sondern auch an der des appetitiven Lernens maßgeblich beteiligt (Waddell, 2013). Insgesamt sind acht dopaminerge Neuronencluster im Gehirn von *Drosophila* nachgewiesen (Mao & Davis, 2009), allerdings ist nur den drei genannten (PAM, PPL1 und PPL2ab) eine Rolle bei der Prozessierung und Verarbeitung im aversiven Lernen nachgewiesen (Aso et al., 2010, 2012).

## 1.7 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Fast in allen Phyla stößt man auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Sie sind nicht nur in Invertebraten und Vertebraten nachgewiesen, sondern auch in Protozoen, Pilzen und Pflanzen. Allein beim Menschen sind derzeit fast 800 GPCRs identifiziert. Dabei ist ihre Aufgabe stets die gleiche: Die Transduktion eines extrazellulären Signals/Reizes ins Zellinnere! Die Gruppe der GPCRs besitzt als typisierende Strukturmerkmale sieben Transmembrandomänen (TM), welche durch drei bis vier intrazelluläre Schleifen (IL) und durch drei extrazelluläre Schleifen (EL) miteinander verbunden sind. Zur Bildung der 4. IL kommt es jedoch nur, wenn die Cystein-Reste im C-Terminus posttranslational palmitoyliert wurden. Der C-Terminus befindet sich intrazellulär und der N-Terminus extrazellulär (Abbildung 1.8, Blenau & Baumann, 2003). Die sieben TM und ihre dazugehörigen EL und IL weisen hoch konservierte Motive auf, welche in vielen Tiergruppen wiederzufinden sind und somit die Vorhersage der TM ermöglichen (Baldwin, 1994; Vernier et al., 1995; Baldwin et al., 1997; Valdenaire & Vernier, 1997; Palczewski et al., 2000). Die GPCRs lassen sich aufgrund ihrer Sequenzen und ihrer Spezifität gegenüber Liganden in verschiedene Familien einteilen (Fredriksson et al., 2003). Dabei sind z.B. die Rhodopsin-ähnlichen-Rezeptoren und die Glutamatrezeptoren gewiss die Bekanntesten. Diesen Superfamilien gehören viele weitere Familien an wie z.B. die adrenergen Rezeptoren, die Serotoninrezeptoren oder auch die DA-Rezeptoren. Die GPCRs gehören zu den metabotropen Rezeptoren, d.h. dieser Membranrezeptortyp hat keinen direkten Einfluss auf die Ionenkonzentration, sondern setzt mit seiner Aktivierung eine weitere Signalkaskade auf der intrazellulären Seite des Rezeptors in Gang. Dies kann entweder zu einer Konzentrationsänderung eines sekundären Botenstoffes (z.B. cAMP) oder zu einer Permeabilitätsänderung der Zellmembran (Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>) führen (Blenau & Baumann, 2001). Innerhalb der Gruppe der GPCRs unterscheidet man die Rezeptoren anhand ihres gekoppelten Guaninnucleotidbindenden Proteins (G-Protein).



Abbildung 1.8: Schematische Darstellung eines GPCR. GPCR kennzeichnen sich durch sieben  $\alpha$ -helikale TM. Diese sind intrazellulär durch drei bis vier IL (intrazelluläre Schleifen/Loops) und extrazellulär durch drei EL (extrazelluläre Schleifen/Loops) verbunden. Die 4.IL bildet sich nur, wenn die Cystein-Reste am C-Terminus posttranslational palmitoyliert werden. Dabei befindet sich der C-Terminus auf der intrazellulären und der N-Terminus auf der extrazellulären Seite (Blenau & Baumann, 2001, 2003).

 $G_s$ -Proteine sind an cAMP-abhängigen Reaktionen beteiligt, sie wirken also stimulierend. Dagegen handelt es sich bei  $G_i$ -Proteinen um inhibitorische G-Proteine, während  $G_q$ -Proteine an die Phospholipase gekoppelt sind (Wess, 1997; M. I. Simon et al., 1991; Luttrell, 2008). Es sind drei Subklassen der inhibitorischen G-Proteine bekannt, welche sich in ihrer  $\alpha$ -Untereinheit unterscheiden (Bray et al., 1987; Jones & Reed, 1987; Ang et al., 2012). Jedes G-Protein setzt sich aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) und einem Guanindiphosphat (GDP) zusammen. Man bezeichnet es deshalb auch als Heterotrimer. Das Wirkungsprinzip ist bei allen G-Proteinen stets dasselbe: das an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundene G-Protein wird durch die Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden veranlasst, sein gebundenes GDP durch ein Guanintriphosphat (GTP) zu ersetzen. Hierdurch dissoziieren die  $\alpha$ -Untereinheit und die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit. und die  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert/inhibiert einen membrangebundenen Effektor wie z.B. die AC. Nach der

Interaktion mit dem Effektor reassoziiert das G-Protein und die  $\alpha$ -Untereinheit spaltet GTP in GDP+P. Die Bindung eines Liganden führt jedoch nicht nur zur Aktivierung des Rezeptors, sondern auch zu einer Desensibilisierung und zu einer Reorganisation des Rezeptors. Die Desensibilisierung des Rezeptors stellt dabei einen wichtigen Mechanismus dar, der zum einen vor einer Überstimulation des Rezeptors schützt und zum anderen als Filter dient. So ist es möglich aus zahlreichen Rezeptorinformationen ein spezifisches Signal zu generieren und schwächere, weniger relevante Rezeptorsignale zu inaktivieren (Krasel et al., 2008; Reiner et al., 2009). Diese Reorganisation findet intrazellulär und entkoppelt von der Zellmembran statt. Sie wird auch als Internalisierung bezeichnet (Pierce et al., 2002). Bei der Dissoziation des G-Proteins rekrutiert die frei gewordene  $\beta/\gamma$ -Untereinheit eine G-Protein-Rezeptor Kinase zum Rezeptor. Diese phosphoryliert den durch den Liganden aktivierten Rezeptor und es erfolgt die Bindung des  $\beta$ -Arrestin an den Rezeptor, welcher in einem Endosom internalisiert wird. Dies hat Dephosphorylierung des Rezeptors mit anschließender Reorganisation oder Degradation zur Folge (Pierce et al., 2002).

#### 1.7.1 Dopamin-Rezeptoren

GPCRs vermitteln viele physiologische Prozesse. Unter anderem (u.a.) sind DA-Rezeptoren sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten an der Bildung und dem Abruf des Gedächtnisses (Fujishiro et al., 2005; Xing et al., 2012) und an der Weiterleitung des US beteiligt (Busto et al., 2010). Die DA-Rezeptoren gehören zu den Rhodopsin-ähnlichen-Rezeptoren (Mustard et al., 2005). In Vertebraten können je nach Wirkungsweise und aktiviertem Signalweg zwei Gruppen unterteilt werden: D1-ähnliche Rezeptoren und D2-ähnliche Rezeptoren (Brody & Cravchik, 2000; Mustard et al., 2005). D1-ähnliche Rezeptoren sind durch ihr stimulatorisches G-Protein gekennzeichnet. Dieses triggert die Aktivierung der AC (Sugamori et al., 1995). Die D2-ähnlichen Rezeptoren sind durch inhibitorisches G-Protein charakterisiert, welches zu einer Inhibierung der AC führt und somit zu einer Modulation der Ionenkanäle (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994; Missale et al., 1998; Emilien et al., 1999; Vallone et al., 2000). In den Invertebraten lassen sich die DA-Rezeptoren durch Sequenzvergleiche in drei Gruppen einteilen (Mustard et al., 2005). Zusätzlich zu den D1-und D2ähnlichen Rezeptoren tritt hier noch die Gruppe der Invertebraten Dopamin-Rezeptoren (INDRs) in Erscheinung. Sie unterscheiden sich nur strukturell von den D1-ähnlichen Rezeptoren und sind aufgrund ihrer Sequenzhomologien näher mit den Octopamin-Rezeptoren der Invertebraten verwandt (Mustard et al., 2005). Sie sind jedoch funktionell wie D1-ähnliche Rezeptoren - auch sie stimulieren, bei einer Aktivierung durch DA, die AC und führen zu einer Erhöhung des cAMPs (Mustard et al., 2005). DA-Rezeptoren weisen hoch konservierte Aminosequenzen auf, welche in vielen Phyla wiederzufinden sind. Der Rezeptor D2R besitzt eine Homologie zum D2-ähnlichen Rezeptor der Säugetiere auf (Hearn et al., 2002). DA-Rezeptoren sind verstärkt in den PK exprimiert (Han et al., 1996, 1998), die im Gehirn von Drosophila für die Bildung und den Abruf eines intakten Gedächtnisses essentiell sind (Abbildung 1.6). In Drosophila melanogaster sind vier DA-Rezeptoren bekannt. dDA1 gehört der Gruppe der D1ähnlichen Rezeptoren an, welche an ein stimulatorisches G-Protein gekoppelt sind (Abbildung 1.9, Brody & Cravchik, 2000; Kim et al., 2007b). Der Rezeptor DAMB ist ebenfalls an ein stimulatorische G-Protein gekoppelt und aktiviert somit auch die Signalwege der D1-ähnlichen Rezeptoren, jedoch weisen Sequenzvergleiche auf seine Zugehörigkeit zu den INDRs hin (Han et al., 1996; Mustard et al., 2005; Selcho et al., 2009). Diese Rezeptorgruppe ist strukturell näher mit den Octopamin-Rezeptoren der Invertebraten verwandt (Mustard et al., 2005). Beide Rezeptoren werden stark in den PK exprimiert. Frühere Studien belegten für beide Rezeptoren eine Beteiligung am olfaktorischen Gedächtnis (Sugamori et al., 1995; Han et al., 1996; Kim et al., 2003; Berry et al., 2012). Für den Rezeptor dDA1 wurden zwei Mutanten identifiziert, die beide sowohl im aversiven als auch im appetiven olfaktorischen Lernparadigma eine Reduktion der Lernperformance aufweisen (Kim et al., 2007a). Dabei ist die gezeigte Beeinträchtigung im aversiven Lernen größer, als die im appetitiven. Beide Phänotypen konnten durch die Expression der cDNA des Rezeptors in den PK völlig wiederhergestellt werden. Weiterführende Studien belegten auch die Rolle des DA-Rezeptors dDA1 in der Gedächtnisakquise (Berry et al., 2012).



**Abbildung 1.9:** Klassifizierung der Dopaminrezeptoren bei *Drosophila melanogaster*. Es sind 4 Dopaminrezeptoren bei *Drosophila melanogaster* bekannt. Diese werden phylogenetisch und funktionell in verschiedene Gruppen eingeteilt. Phylogenetisch werden die Invertebraten Dopamin-Rezeptoren (INDRs) und die D1- bzw. D2-ähnlichen Rezeptoren unterschieden (Brody & Cravchik, 2000; Mustard et al., 2005). Funktionell wird nur zwischen den D1-ähnlichen und den D2-ähnlichen bzw. dem DopEcR unterschieden. Dabei wird der Rezeptor dDA1 phylogenetisch zu den D1-ähnlichen Rezeptoren gezählt, während der Rezeptor D2R zu den D2-ähnlichen Rezeptoren gehört. Der Rezeptor DAMB wird strukturell zu den INDRs gezählt, verhält sich funktionell jedoch wie ein D1ähnlicher Rezeptor. Der Rezeptor DopEcR bindet sowohl an Dopamin als auch an Ecdyson und ist noch unklassifiziert (Brody & Cravchik, 2000; Srivastava et al., 2005; Ishimoto et al., 2013; Evans et al., 2014).

Für den Rezeptor DAMB wurde eine Koinzidenz mit der rutagbaga AC nachgewiesen (Han et al., 1996), welche maßgeblich an der Bildung der labilen Gedächtnisphase beteiligt ist (Dudai, 1983; Scheunemann et al., 2012). Die identifizierte DAMB-Mutante ist zwar am olfaktorischen Lernen beteiligt, jedoch beschränkt sich dieses nur auf das aversive Lernparadigma an Larven (Han et al., 1996; Selcho et al., 2009). Neuere Studien belegten, dass DAMB im Prozess des Vergessens eine Rolle spielt (Berry et al., 2012). DAMB-Mutanten zeigten eine geringere Lernperformance als wildtypische Fliegen, können jedoch das Gelernte längere Zeit abrufen. Der dritte bekannte Rezeptor ist der D2R-Rezeptor, welcher zu den D2-ähnlichen Rezeptoren gehört. Er ist an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt (Hearn et al., 2002) und zeigt eine hohe pharmakologische und strukturelle Ähnlichkeit zu dem menschlichen D2-ähnlichen Rezeptor (Wess,

1997). Sein Expressionsmuster weist auf eine starke räumliche Nähe zu den dopaminergen Neuronen hin (Draper et al., 2007) und ist besonders dominant exprimiert im adulten Hirn und dem larvalen ZNS (Chintapalli et al., 2007; Draper et al., 2007). Erstmalig ist der D2R-Rezeptor 2002 charakterisiert worden (Hearn et al., 2002). In Hearns Studie wurden acht verschiedene Spleißvarianten für den D2R-Rezeptor nachgewiesen und analysiert. Die Isoformen wiesen hohe Homologien untereinander auf und variierten in der Sequenz ihrer 3.IL, welche im Bereich des 6. und 7. Exons liegt. Die Inhibierung des D2R-Rezeptors durch Pertussis Toxin (PTX) blockiert alle dopaminergen Effekte und zeigt so, dass D2R an der  $G_{i/o}$ -vermittelten Signalweiterleitung beteiligt ist (Hearn et al., 2002). PTX ist ein selektiver Inhibitor für die  $G_{i/o}$ -vermittelte Signalweiterleitung (Spiegel et al., 1992). Draper und Kollegen generierten 2007 in ihrer Studie eine spezifische RNAi-Linie, welche sie für Verhaltensanalysen im Bereich der Lokomotion nutzten. Tiere mit reduzierter D2R-Expression zeigten eine verminderte Lokomotion. Dieser Phänotyp konnte durch Verabreichung des synthetischen D2R-Agonisten Bromocriptin vollständig wiederhergestellt werden (Draper et al., 2007). Bromocriptin ist ein selektiver D2-ähnlicher Agonist, welcher die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion triggert (Hearn et al., 2002; Draper et al., 2007; G. Lee et al., 2013). Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen in Säugetieren (Baik et al., 1995; Emilien et al., 1999; Fowler et al., 2002). Der Vergleich von Säugetieren und Invertebraten hat gezeigt, dass einige Elemente der dopaminergen Neurotransmission hoch konserviert sind. Den Rezeptor D2R genauer zu untersuchen und seine Funktionsweise besser zu verstehen, ist ein Ziel dieser Arbeit.

Der vierte Rezeptor ist der DA-Rezeptor DopEcR (Brody & Cravchik, 2000; Srivastava et al., 2005; Evans et al., 2014), welcher vorrangig im Nervensystem und im adulten Gehirn in den PK exprimiert ist (Srivastava et al., 2005; Ishimoto et al., 2013). Er weist eine hohe Homologie zu den  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren der Vertebraten auf und bindet sowohl DA als auch Ecdyson als Liganden (Srivastava et al., 2005; Ishimoto et al., 2013). Ecdyson ist das dominanteste Steroidhormon in *Drosophila* und auch im adulten Tier essentiell, z.B. bei der angeborenen Immunabwehr, der Stressresistenz und der Bildung des Gedächtnisses beim Balzverhalten (Koelle et al., 1991; Riddiford, 1993; Thummel, 1996; Riddiford et al., 2000; Truman & Riddiford, 2002; Srivastava et al., 2005; Flatt et al., 2008; A. F. Simon et al., 2003; Ishimoto et al., 2009; Ishimoto & Kitamoto, 2010). Der DopEcR-Rezeptor moduliert eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden (Srivastava et al., 2005). Seine Aktivierung durch DA führt zu einer Erhöhung des cAMP-Levels und zur Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweges (Srivastava et al., 2005). Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) ist ein Enzym, welches eine große Rolle in der Signaltransduktion verschiedener Prozesse spielt (L. Li et al., 2008). Die dokumentierte Wirkungsweise des Rezeptors bei Bindung des Liganden Ecdyson ist jedoch widersprüchlich. Zum einen führt sie zu einer Inhibierung der dopaminergen Effekte (Srivastava et al., 2005) und zum andern zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMPs (Ishimoto et al., 2013). Derzeit ist ebenfalls noch unklar, ob die beiden Liganden konkurrierend an einer überlappenden Bindestelle, wie derzeit vermutet, oder nicht konkurrierend an zwei räumlich getrennten Bindestellen interagieren (Kenakin, 2004; Srivastava et al., 2005). Je nach Ligandenbindung zeigt der DopEcR-Rezeptor eine agonist-spezifische Kopplung. wobei die Bindung von DA zur Aktivierung der AC führt, während die Ecdyson-Bindung zu einer schnellen Aktivierung des mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalweges und zur Inhibierung der DA-Bindung führt (Ishimoto et al., 2013). Eine agonist-spezifische Kopplung ist auch beim DA-Rezeptor DAMB gezeigt worden (Reale et al., 1997). Die Bindung eines spezifischen Agonisten entscheidet, welche Signalwege der Rezeptor ansteuert.

### 1.8 Ziel dieser Arbeit

Biogene Amine und ihre Rezeptoren gehören zu den wichtigsten Neuromodulatoren in Vertebraten und Invertebraten. Sie weisen zahlreiche Homologien in den verschiedenen Phyla auf und beteiligt sich an unzähligen zellphysiologischen Prozessen. Bei *Drosophila* beeinträchtigt eine Störungen des dopaminergen Systems die Bildung und den Abruf des Gedächtnisses, ebenso wie die Steuerung des Bewegungsapparats und die circadiane Rhythmik. Trotz ihrer großen Bedeutung
in der Wissenschaft herrscht über das System der biogenen Amine und ihrer Rezeptoren weiterhin große Unklarheit.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung und den Einfluss des relativ unbekannten DA-Rezeptors D2R in Drosophila zu untersuchen. Der Einfluss des Rezeptors D2R auf Lernen, Gedächtnis und seine Beteiligung an der synaptischen Plastizität stehen hier im Fokus. Diese Studie soll helfen Aufschluss über die Funktionalität des Rezeptors zu geben, um mögliche Interaktionen und Interferenzen aufklären. Des Weiteren sollen die räumliche und die temporäre Wirkung des Rezeptors untersucht werden, um Aussagen über die Strukturen, in denen D2R relevant ist, und eine mögliche Koregulation mit D1-ähnlichen Rezeptoren machen zu können. Diese Arbeit liefert mit der Etablierung der Deletionsmutante und seiner ersten Charakterisierung extrem nützliche Werkzeuge, mittels deren Hilfe sich viele Möglichkeiten bieten das dopaminerge System weiter zu untersuchen. Die gewonnen Daten aus der hier durchgeführten Verhaltensanalyse können zudem helfen die Rolle des Rezeptors D2R im aversiven olfaktorischen Lernen und seines Mitwirkens an der Bildung der einzelnen Gedächtnisphasen besser zu verstehen. Sie können weiterhin Aufschluss über die Beteiligung der PK-Loben am olfaktorischen Gedächtnis geben und erlauben den Vergleich mit anderen Phyla. So wird es möglich sein das dopaminerge System besser zu verstehen und die Stellung des DA-Rezeptors D2R besser einzuordnen.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Drosophila melanogaster - Haltung und Genotypen

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Drosophila melanogaster* wurden nach Standardbedingungen bei 24°C und 60 % Luftfeuchtigkeit in einem 12/12 h Tag-Nachtzyklus gehalten. Das Maismehlfutter wurde nach der Würzburger Rezeptur (Guo et al., 1996) zubereitet. Die Haltung der Kreuzungen geschah ebenfalls nach genannten Standardbedingungen und nach dem Standardverfahren. Alle Fliegen für die olfaktorischen Verhaltensexperimente waren 2-5 Tage alte F1 Nachkommen mit dem in den Abbildungen angegebenen Genotyp und Geschlecht. Sie wurden 48 h vor dem Experimenten auf frisches Maismehlfutter gesetzt.

Versuchstiere mit dem Repressor GAL80<sup>ts</sup> wurden 30 h vor dem Experiment auf frisches Futter überführt und anschließend auf 30°C gehalten, um den Repressor GAL80<sup>ts</sup> zu inaktivieren. Eine Kontrollgruppe dieser Tiere mit GAL80<sup>ts</sup> verblieb bis zum Experiment auf 18°C.

Die für den RNAi-Knockdown verwendeten Versuchstiere wurden standardmäßig auf 30°C gehalten.

In Tabelle I (Anhang) sind alle parentalen Fliegenstämme aufgelistet, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Dargelegt sind ebenfalls die expliziten Genotypen, ihre Bezugsquellen sowie der hier verwendete Name.

### 2.2 Generierung spezifischer Deletionsmutanten

Zur Erzeugung spezifischer chromosomaler Deletionen am Genlokus des D2R-Rezeptors wurde die FRT-FLP-Technik genutzt (Abschnitt 1.1.3). An dem Rezeptor D2R wurden 2 Deletionen vorgenommen. Die hierfür verwendeten Transposons sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 2.1: Verwendete Transposons.** Aufgelistet sind die für die chromosomalen Deletion verwendeten Transposons am D2R-Lokus mit resultierender Deletionsgröße (siehe auch I (Anhang)).

Rezeptor	Transposon 1	Transposon 2	Deletionsgröße
D2R	f02905	f06521	32386 bp
D2R	f02905	f02891	46005 bp

Für eine erfolgreiche Deletion mussten die beiden entsprechenden Transposons zusammen mit der Hitzeschock-FLP-Rekombinase in eine Fliege eingekreuzt werden. Der Hitzeschock von 37°C im adulten Tier führte zum Crossing-over-Ereignis und somit zu einer chromosomalen Deletion in der nächsten Generation.

F <sub>o</sub>		4			3		
	Х	2.	3.	Х	2.	3.	
		+	+	W1118	+	hsFLP,Sb	
		+	+	Y	+	TM₀,Tb	
F <sub>1</sub>		f		8			
	Х	2.	3.	Х	2.	3.	
		+	+		+	hsFLP,Sb	
		+	+	Y	+	+	
		+					
F <sub>2</sub>		f			8		
	Х	2.	3.	Х	2.	3.	
		+	hsFLP,Sb	FM7a	+	+	
		+	+	Y	+	+	
F <sub>3</sub>		f			8		
	Х	2.	3.	Х	2.	3.	
	$\overline{\mathbf{v}}$	+	+	FM7a	+	+	
	FM7a	+	+	Y	+	+	

Abbildung 2.1: Exemplarisches genetisches Kreuzungsschema für eine FLP-FRTbasierte Deletion des D2R Rezeptors. Durch die Kreuzungen wurden zwei FRT-tragende P-Elemente (blaues bzw. gelbes Dreieck) in Transstellung gebracht. Durch das zusätzliche Einkreuzen der hitzeschockaktivierten FLP-Rekombinase kam es zu einer homologen Rekombination in den FRT-Motiven. Diese resultierte in einer Deletion.

In Abbildung 2.1 ist das Kreuzungsschema abgebildet, welches die Hybridisierung der FRT-tragenden Transposons und der hitzeschockregulierten FLP- Rekombinase darstellt. Um FLP-FRT-basierte Deletionen zu erzeugen, war es notwendig beide FRT-tragenden P-Elemente und die hitzeschockregulierte FLP-Rekombinase in ein Individuum einzukreuzen. Im DA-Rezeptor D2R sind die Transposons auf dem X-Chromosom lokalisiert, dem Genlokus des Rezeptors entsprechend. Die genutzte FLP-Rekombinase ist eine Hitzschock-Flippase, welche auf dem 3. Chromosom liegt und mit Stubble/Stoppelborsten (Sb) markiert ist. Die Aktivierung bei 37°C katalysierte eine trans-Rekombination in der 1. Reifeteilung (Abbildung  $2.1 \rightarrow F_2$ ).

Eine erfolgreiche Rekombination mit Deletion ließ sich über die in Abschnitt 2.3.1 im Detail erörtert Two-sided-PCR nachweisen. Wurde eine Deletion als positiv bestätigt, wurde sie mittels eines Balancers als stabiler Stamm etabliert. Für die Etablierung der Deletionsmutanten von D2R wurde der Balancerstamm FM7a;+;+ genutzt. Dieser ist durch den Marker Bar (nierenförmige Augen) gekennzeichnet.

### 2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Standard-PCR umfasst im Wesentlichen drei Phasen: die Denaturierungsphase, die Annealingphase und die Elongationsphase.

Die Denaturierung der Desoxyribonucleinsäure (DNA) fand unter Standardbedingungen bei 94°C statt. Die so entstandenen Einzelstränge stellten die Template-DNA dar. In der anschließenden Annealingphase lagerten sich die Oligonukliotidprimer an die Template-DNA. Dies geschah im Regelfall bei einer Temperatur von 55°C. Die Primer waren spezifisch auf für die gewünschte Amplifikation designt und entsprachen somit der Template-DNA. In der nachfolgenden Elongationsphase lagerte sich die DNA-Polymerase an die Template-DNA an und verlängerte den Primer bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Dieser neu synthetisierte DNA-Doppelstrang glicht exakt der ursprünglichen Template-DNA. Somit wurden beide DNA-Einzelstränge verdoppelt. Nun begann der Replikationsprozess erneut mit der Denaturierungsphase, an welche sich die Annealingphase und die Elongationsphase anschlossen. Diese Kettenreaktion wurde 32-mal wiederholt, um so eine vielfache DNA-Menge zu erhalten.

#### 2.3.1 Two-sided-PCR

Je nachdem welches der drei FRT-tragenden Transposonkonstrukte für die FLP-FRT-basierte Deletion genutzt wurde, gab es verschiedene PCRs zum Nachweis (Parks et al., 2004). Bei den hier verwendeten WH-Transposons entstand nach erfolgreicher Deletion ein neues intaktes FRT-tragendes Transposon (Abbildung 1.3). Die Two-sided-PCR wurde zur Verifizierung genutzt.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der Two-sided-PCR. Die Two-sided-PCR wurde zum Nachweisen einer FLP-FRT-basierten Deletion mit den WH-Transposons genutzt. Jeweils ein Primer im genomischen Bereich (GP-F/R) und ein Primer im Transposon (WH'5/3) flankieren den zu amplifizierenden Bereiche von 300 bp. A) Darstellung der inneren Randbereiche. Sie umfassen den inneren, zum Deletionsbereich hingewandten, Teil der Transposons. Diese Randbereiche wurden durch die PCRs I und II nachgewiesen. B) Darstellung der äußeren Randbereiche. Ihr Nachweis erfolgte durch die PCRs III und IV. Die äußeren Randbereiche beinhalten den der Deletion abgewandten Bereich der Transposons.

Ein Nachweis mittels Two-sided-PCR bestand im Wesentlichen aus 4 einzelnen PCRs. Mit ihrer Hilfe wurde auf die Existenz der inneren und äußeren Randbereiche der beiden Transposons gescreent. Eine schematische Darstellung dieser PCRs wurde in Abbildung 2.2 gegeben. Je nach zu screenender Randbereich wurde WH'5 als Forward-Primer (F) bzw. WH'3 als Reverse-Primer (R) mit einem genomischen Primer-Forward (GP-F) bzw. genomischen Primer-Reverse (GP-R) kombiniert. Die genomischen Primer (GP) wurden mit dem Namen des flankierenden Transposons und der Orientierung des Primers (Forward/Reverse) benannt (siehe Tabelle 2.2). Die WH'5 und WH'3 Primer konnten an allen WH-Elementen binden und wurden so bei jeder Two-sided-PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer für die Two-sided-PCRs sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt.

**Tabelle 2.2: Verwendete Primer.** Liste der verwendeten Primer für den Nachweis einer Deletion via Two-sided-PCR. Aufgeführt sind Name, Sequenz und Bindebereich der einzelnen Primer.

Primer	Sequenz 5'→3'	Transposon	Randbereich
F-f02905	CGCGCTATAGCTTCAACTTCCTGCCA	f02905	äußere
R-f02905	CGCGCATTGTAGGCCCTGTGACTTTT	f02905	innere
F-f06521	CGCGCACTGAAATAATGTTATGCCAC	f06521	äußere
R-f06521	CGCGCCATAAATACCAATCAGGAGC	f06521	innere
F-f02891	CGCGCTCGTCTCTGCTCCTTTATTTT	f02891	äußere
R-f02891	CGCGCTGTGATGATGTCCAGTACTTG	f02891	innere
WH5′	TCCAAGCGGCGACTGAGATG	f07155	Transposon
			FWD
WH3'	CCTCGATATACAGACCGATAAAAC	f07155	Transposon
			REV

### 2.4 Olfaktorische Konditionierung

Die olfaktorische Konditionierung der Fliegen erfolgte nach dem Standardprotokoll (Tully & Quinn, 1985), (Schwaerzel et al., 2002).

Die Verhaltenstiere wurden 48 h vor dem Experiment auf frisches Maismehlfutter gesetzt. Alle Verhaltenstests fanden bei 70 % Luftfeuchtigkeit und Rotlicht statt. Dabei wurden je 60-80 Fliegen entweder mit 4-Methylcyclohexanol (Verdünnung 1:100, Sigma Aldrich) oder mit 3-Octanol (Verdünnung 1:150, Sigma Aldrich) als Stimulus exponiert. Die Düfte wurden mit dünnflüssigem Paraffinöl (Carl Roth GmbH) verdünnt und den Fliegen in 14 mm Näpfchen als CS präsentiert. Der US wurde als 12 aufeinanderfolgende elektrische Schocks (120 V) mit einer Dauer von 1,3 s in einem Intervall von 3,6 s präsentiert. Pro Versuch wurden zwei Gruppen an Tieren trainiert, welche als zusammengehörige reziproke Teilexperimente und somit als eine Trainingseinheit (N) zu betrachten sind. Zum einen wurden 4-Methylcyclohexanol (MCH) als CS+ in Kombination mit 12 Schocks (US) dargeboten. Nach dieser CS-US-Paarung wurde 30 s lang frische Luft durch die T-Maze geleitet. Anschließend erfolgte die Gabe des CS-, welches die Präsentation des unbestraften Duftes, in diesem Fall 3-Octanol (OCT), ist. Bei einem gleichzeitigen reziproken Durchgang diente demnach OCT als CS+ und MCH als CS-. Nach einer Trainingseinheit wurden die Tiere in der T-Maze 30 s lang getestet und gezählt (Abbildung 1.4). Anschließend wird der Performanz Index (PI) durch folgende Formel berechnet:

$$PI = [(MCH^{-} - OCT^{+})/(MCH^{-} + OCT^{+}) * 100 + (OCT^{-} - MCH^{+})/(OCT^{-} + MCH^{+}) * 100]/2$$

Der zeitliche Abstand zwischen Test und Training variierte je nach zu untersuchender Gedächtnisphase (Abbildung 1.5).

#### Kurzzeitgedächtnisphase

Bei Untersuchungen des STM erfolgte der Test der trainierten Tiere 3 min nach dem Training.

#### 5 min-Gedächtnisphase

Bereits im 5 min-Gedächtnis kann zwischen einer kältestabilen und einer kältelabilen Gedächtnisphase unterschieden werden. Um diese beiden Phasen ermitteln zu können, wurden nacheinander zwei Trainingseinheiten (Ns) mit jeweils naiven Tieren durchgeführt. Hierbei erfuhr ein N ( $N_{vor}$ ) einen 90 s Kälteschock vor dem Training und das andere N ( $N_{nach}$ ) direkt nach dem Training. Für den Kälteschock wurden die trainierten Tiere in ein leeres vorgekühltes Plastikröhrchen überführt, welches 90 s in ein Eisbad gestellt wurde. Anschließend wurden die Tiere in ein leeres Plastikröhrchen transferiert und verblieben hier bei Raumtemperatur bis zum Test bzw. Training. Beide Ns werden exakt 5 min nach dem Training getestet. Die labile Gedächtnisphase wurde durch den Kälteschock ausgelöscht und zurück bleibt lediglich die stabile Gedächtnisphase. Die labile Gedächtnisphase wurde errechnet nach der Formel:

$$PI_{labil5min} = N_{vor} - N_{nach}$$

Eine grafische Darstellung des detaillierten zeitlichen Ablaufs dieses Experiments befindet sich in Abbildung 3.5A.

#### Mittelzeitgedächtnis

Das Mittelzeitgedächtnis wurde 3 h nach dem Training abgerufen und lässt sich ebenfalls in eine kältestabile und kältelabile Phase aufspalten. Um beide Phasen zu ermitteln, wurden zwei Ns von Tieren gleich trainiert. Nach 2,5 h wurde eine Trainingseinheit ( $N_+$ ) 90 s durch einen Kälteschock anästhesiert, die andere Trainingseinheit ( $N_-$ )dagegen verblieb unbehandelt bis zum Test. Der Kälteschock erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie beim 5 min-Gedächtnis. Die labile Phase wurde durch die Kälteanästhesierung ausgelöscht und wurde mittels folgender Gleichung berechnet:

$$PI_{labil3h} = N_- - N_+$$

#### 2.5 Statistische Analyse

Alle gezeigten Daten stellen den Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und den statistisch signifikanten Unterschieden dar. Diese wurden in den Abbildungsunterschriften gekennzeichnet. Alle Daten wurden mit einem einfaktoriellen ANOVA oder mit dem t-Test analysiert. Statistische Unterschiede wurden beim einfaktoriellen ANOVA mithilfe des LSD posthoc-Vergleiches mit einem Signifikanzniveau von P<0,01 ermittelt. Im Falle des t-Tests wurden die Daten durch die Varianzhomogenität mit dem Levene-Test auf einem Signifikanzniveau von P<0,05 verglichen. Die Wahl des verwendeten Tests wurde in der Abbildungsunterschrift vermerkt.

### 2.6 Verwendete Software

Die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden alle selbstständig und mit Corel DRAW X5 erstellt. Die statistischen Tests wurden mit der Software IBM SPSS Statistics 21 durchgeführt und Sequenzvergleiche bzw. Annotierungen erfolgten mit der Software Geneious 7.

# 3 Ergebnisse

Der Rezeptor D2R ist einer der vier DA-Rezeptoren in *Drosophila*. Er gehört zu der Familie der D2-ähnlichen Rezeptoren und ist an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt (Blenau & Baumann, 2001). Die Aktivierung des D2R-Rezeptors durch seinen Liganden führt zu einer Inhibierung der AC (Hearn et al., 2002). Er weist eine hohe Homologie zum D2R-Rezeptor der Säuger auf (Hearn et al., 2002). Expressionsstudien zeigen eine dominante Lokalisation im adulten Gehirn und dem larvalen ZNS (Draper et al., 2007; Chintapalli et al., 2007). D2R ist an der larvalen Lokomotion (Draper et al., 2007) und der Ausprägung der circadianen Rhythmik (G. Lee et al., 2013) beteiligt. Eine Inhibierung durch PTX führt zu einer völligen Blockade des D2R-Rezeptors. Dies unterbindet alle dopaminergen Prozesse ausgehend von einem G<sub>i</sub>-Protein (Spiegel et al., 1992; Hearn et al., 2002). Trotz dieser Erkenntnisse sind die D2R-abhängigen Mechanismen, sowie die Beteiligung und die Funktionsweise des Rezeptors D2R an vielen zellphysiologischen Prozessen noch immer unklar.

DA ist an zahlreichen Signalwegen beteiligt und ihm ist eine Rolle bei der Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses nachgewiesen (Schwaerzel et al., 2003; Berry et al., 2012; Waddell, 2010; Burke et al., 2012; Waddell, 2013). Demnach ist eine Beteiligung des D2R-Rezeptors sehr wahrscheinlich.

### 3.1 Generierung spezifischer Deletionen von D2R

In dieser Arbeit wurde eine Charakterisierung des Rezeptors durch die Untersuchung einer Deletionsmutante durchgeführt, um ein besseres Verständnis von Wirkungsweise und Funktionalität zu erhalten.

Der Genlokus des Rezeptor D2R befindet sich auf dem X-Chromosom. Zur Generierung rezeptorspezifischer Deletionsmutanten wird die FRT-FLP-Technik eingesetzt (Abschnitt 1.1.3, Parks et al., 2004).



Abbildung 3.1: Genlokus des DA-Rezeptors D2R. D2R ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Es gibt drei P-Elemente, welche für eine Deletion genutzt werden können. Die daraus resultierenden Deletionen D2R  $\Delta 1$  und  $\Delta 2$  umfassen den größten Teil des kodierenden Bereichs des Rezeptors, sowie den kompletten Lokus des Gens CG17003. Die partielle Defizienz BSC587 deckt den nicht deletierten Bereich des Rezeptors ab.

Hierbei werden P-Elemente mit einem FRT-Motiv mittels Rekombinase remobilisiert. Die daraus resultierenden Doppelstrangbrüche flankieren eine Deletion mit definierten Endpunkten. Dargestellt ist der Genlokus von D2R (Abbildung 3.1) mit seiner Genspanne, welche den kodierenden Bereich abdeckt. Die eingetragenen P-Elemente können zur Generierung zweier Deletionen unterschiedlich kombiniert werden. So entstand bei der Remobilisierung der P-Elemente f02905 und f06521 die Deletion D2R  $\Delta$  1 mit rund 32 Kilobasenpaaren (kb). Bei der Kombination der P-Elemente f02905 und f02891 hingegen entstand die Deletion D2R  $\triangle$  2 mit rund 46 kb. Beide Deletionen umfassen den größten Teil des Lokus, einschließlich des Gens CG17003. Über das Gen CG17003 ist wenig bekannt. Es wird seine Zughörigkeit zu den Acetyltransferasen diskutiert. Die generierten Deletionen konnten mit Hilfe von Two-sided-PCRs molekular nachgewiesen werden (Abschnitt 2.3.1, Abbildung 3.2). Bei einer positiven Deletion wurden die inneren Randbereiche und der umspannte Genlokus deletiert. Es entstand ein neues Transposon aus den verbleibenden äußeren Randbereichen. Demnach detektierte nur PCR III und VI eine rund 300 bp große Bande.

Die durchgeführten Two-sided-PCRs zeigten klar ein Deletionsereignis (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2: Two-sided-PCR zur Verifizierung einer Deletion.** Bei erfolgreicher Deletion ist nur bei PCR III (linke äußere Randbereich) und bei PCR IV (rechte äußere Randbereich) eine Bande amplifiziert. Bei den PCRs I (linke innere Randbereich) und II (rechte innere Randbereich) ist kein Fragment zu erwarten, da die P-Elementbereiche deletiert wurden. Gescreent wurden jeweils Männchen der F<sub>0</sub> und der F<sub>1</sub> Generation. Die PCRs wurden dreimal wiederholt.

Die PCRs III und IV wiesen eine ca. 300 bp große Bande auf. Demnach waren die äußeren Randbereiche beider P-Elemente vorhanden. Da die PCRs I und II jedoch kein PCR-Produkt amplifizieren, waren die inneren Randbereiche der P-Elemente nicht vorhanden. Dieses ist nur der Fall, wenn ein positives Deletionsereignis durch homologe Rekombination stattgefunden hat.

### 3.2 Phänotypisierung der Deletionsmutanten

Bei dem hier untersuchten DA-Rezeptor D2R handelt es sich um einen D2ähnlichen-Rezeptor, welcher an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt ist (Hearn et al., 2002; Draper et al., 2007). In Abschnitt 3.1 ist die Generierung von zwei chromosomalen Deletionsmutanten dieses Rezeptors beschrieben. Auf diese Art konnten zwei Deletetionsmutanten generiert und verifiziert werden. Beide Stämme sind homozygot stabil und zeigen morphologisch keine Auffälligkeiten. Beide Geschlechter sind fertil. Die Beteiligung DANs und auch speziell von DA-Rezeptoren am olfaktorischen Gedächtnis ist wiederholt gezeigt (Han et al., 1996; Kim et al., 2003; Schwaerzel et al., 2003; Kim et al., 2007b; Waddell, 2010). Ist auch der Rezeptor D2R am olfaktorischen Gedächtnis beteiligt, und wenn ja, lässt sich seine Beteiligung bestimmten Gedächtnisphasen zuordnen?

#### 3.2.1 Reduktion des Gedächtnisses trotz normaler Sensorik

Durchgeführte Immunoreaktionstests zeigten eine Expression des D2R-Rezeptors im larvalen und adulten Nervensystem, speziell im Bereich dopaminerger Neuronen (Draper et al., 2007). Dazu passend sind Daten aus der Datenbank *Flyatlas*, welche eine Anreicherung der mRNA im adulten Gehirn und im larvalen ZNS beschreibt (Chintapalli et al., 2007).



Abbildung 3.3: Olfaktorische Phänotypisierung der Rezeptormutanten D2R  $\Delta 1$ und D2R  $\Delta 2$ . A) Beide Mutanten wiesen im olfaktorischen Lernparadigma eine Reduktion des Kurzzeitgedächtnisses nach 3 min auf. B) Bei einer Aufspaltung des Mittelzeitgedächtnisses nach 3 h (hellblau) ist eine Performancereduktion der D2R  $\Delta 1$ und D2R  $\Delta 2$  zu sehen. Bei der Aufspaltung des MTM in die stabile und labile Phase, zeigte sich, dass die Reduktion auf die stabile Gedächtnisphase (dunkelblau) beschränkt ist. Die labile Gedächtnisphase bliebt auch bei den Mutanten wildtypisch. C) Die sensorischen Kontrollen waren dagegen unbeeinflusst. Daraus lässt sich eine Beteiligung des D2R-Rezeptors am olfaktorischen Gedächtnis ableiten. Alle Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$ SEM; N  $\geq$  8, p $\leq$ 0,01. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind beide Geschlechter.

Um zu klären, ob D2R an den Prozessen des olfaktorischen Lernens beteiligt ist, wurden die Deletionsmutanten D2R  $\Delta 1$  und  $\Delta 2$  im aversiven Lernparadigma der klassischen olfaktorischen Konditionierung untersucht. Die Mutanten wiesen bereits nach 3 min eine reduzierte Performance auf. Hier zeigte sich eine gleich stark ausgeprägte Reduktion bei beiden Mutanten D2R  $\Delta 1$  und D2R  $\Delta 2$ (Abbildung 3.3A). Eine Aufspaltung in die labile und die stablie Gedächtnisphase nach 3 h zeigte eine signifikant Reduktion der stabilen Phase (Abbildung 3.3B), während die labile auf wildtypischem Niveau blieb. Die durchgeführten sensorischen Kontrollexperimente zeigten keinen Unterschied im Vergleich zur genetischen Kontrolle W1118, sowohl die olfaktorischen als auch die schocksensorischen Wahrnehmungen waren auf dem wildtypischen Niveau (Abbildung 3.3C). Das lässt den Schluss zu, dass die Reduktion der Gedächtnisleistung nicht auf einer Beeinträchtigung in der Wahrnehmung des Schocks oder der Düfte beruht, sondern spezifisch für die chromosomale Deletion ist. Somit ist der D2R-Rezeptor an der Bildung des aversiven olfaktorischen Gedächtnisses beteiligt und wird speziell benötigt für die stabile Gedächtnisphase.

#### 3.2.2 D2R-Deletion verursacht Gedächtnisreduktion

Bei den generierten Mutanten ist es nötig nachzuweisen, dass die gefundenen Phänotypen tatsächlich auf die Deletion des D2R-Rezeptors zurückzuführen sind und nicht auf zufällige Mutationen oder durch eine Beeinträchtigung anderer Gene. Um dieses auszuschließen wurde ein Komplementationstest durchgeführt (Abbildung 3.4). Hierzu wurden die beiden Deletionen jeweils mit der partiellen Deletion BSC587 verkreuzt und in Transstellung untersucht. Tritt der dokumentierte Phänotyp der D2R Deletionsmutanten auch hier auf, lässt er sich auf die Deletion des D2R-Rezeptors zurückführen. Weiterhin wurden D2R  $\Delta$ 1 und  $\Delta$ 2 mit W1118 verkreuzt, um ihre heterozygote Ausprägung zu untersuchen. Beide Mutationen verhielten sich heterozygot wildtypisch (Abbildung 3.4), woraus man schließen kann, dass es sich um rezessive Allele handelt.



Abbildung 3.4: Komplementationstest zum Nachweis der Spezifität der Mutante D2R  $\triangle$  1 und  $\triangle$  2. Die Mutationen D2R  $\triangle$  1 und  $\triangle$  2 verhielten sich im heterozygoten Zustand wildtypisch. Sowohl beide Mutanten in Transstellung also auch jede der Mutationen in Transstellung mit der partiellen Defizienz BSC587 führten wie in den homozygoten Mutanten zu einer Reduktion des Kurzzeitgedächtnis. Die partielle Defizienz BSC587 umfasst das vordere Drittel des D2R-Genlokus. Diese Experimente belegen, dass der gezeigte Phänotyp der Mutanten D2R  $\triangle$  1 und  $\triangle$  2 tatsächlich auf die Deletion am D2R-Lokus zurückzuführen ist. Alle Daten zeigen die Mittelwerte ± SEM; N  $\ge$  8, p $\le$ 0,01. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind Weibchen.

Die für den Komplementationstest genutzte partielle Defizienz BSC587 umspannt nur den vorderen Teil des Genlokus von D2R. In diesem Bereich liegen lediglich die 5'untranslatierte Region (5'UTR) sowie drei Exons. Die Defizienz schließt sich direkt an die Mutation D2R  $\Delta$  1 an und überlappt in einem relativ kleinen Bereich mit D2R  $\Delta$  2. Bei einer Transstellung zwischen D2R  $\Delta$  1 und BSC587 liegen beide heterozygot vor. Ihre einzige Gemeinsamkeit befindet sich dann in der Deletion des Genlokus des Dopamin-Rezeptors D2R. Bei D2R  $\Delta$  1 wird die Transkription von D2R zwar wahrscheinlich gestartet, endet aber bereits nach dem dritten Exon. Es ist anzunehmen, dass dies nicht zur Synthese eines funktionstüchtigen DA-Rezeptor führt. Im Falle der Defizienz BSC587 ist lediglich die 3'untranslatierte Region (3'UTR) sowie der Großteil der Exons vorhanden. Hier fehlt jedoch der 5'UTR und somit der Transkriptstart. Da keine alternative 5'UTR für diesen Rezeptor bekannt ist, wird auch hier wahrscheinlich kein funktionstüchtiger Rezeptor translatiert. Wenn D2R  $\Delta$  1 und BSC587 in heterozygoter Transstellung vorliegen, zeigte sich die selbe signifikante Reduktion der Gedächtnisperformance wie bei der homozygoten D2R  $\Delta$  1 Mutante (Abbildung 3.4). Eine ähnliche Situation ergibt sich bei der Transstellung von D2R  $\Delta$  2 und BSC587. Zwar gibt es hier einen überlappenden Bereich zwischen der Deletion und der Defizienz, jedoch fehlt auch bei D2R  $\Delta$  2 der Transkriptionsstart. Genauso wie in der homozygoten Mutante zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gedächtnisleistung (Abbildung 3.4). Eine Verkreuzung der Mutanten D2R  $\Delta$ 1 und  $\Delta$  2 legte beide Deletionen in Transstellung übereinander und führte gleichermaßen zu einer signifikanten Reduktion des Gedächtnisses. In allen Kreuzungskombination, sowie den homozygoten Mutanten konnte eine gleichstark ausgeprägte Verminderung der Gedächtnisleistung dokumentiert werden. Diese befanden sich auf einem gemeinsamen Niveau und waren signifikant von der wildtypischen Kontrolle W1118 und den heterozygoten Mutanten. Folglich resultiert der dokumentierte Phänotyp aus der chromosomalen Deletion des Rezeptors D2R. Da beide Mutationen D2R  $\triangle$  1 und D2R  $\triangle$  2 die gleiche Ausprägung im Phänotyp zeigen, wurde die weitere Verhaltensanalyse nur noch mit D2R  $\Delta$  1 fortgeführt.

#### 3.2.3 Stabile Gedächtnisphase bereits im STM betroffen

Bereits in der Gedächtniskomponente STM (Kurzzeitgedächtnis) lassen sich verschiedene Phasen identifizieren (Quinn & Dudai, 1976; Margulies et al., 2005; Knapek et al., 2011) - schon hier ist die stabile und die labile Gedächtnisphase nachweisbar (Abschnitt 1.4). Um diese beiden Phasen zu ermitteln, wird die Performance der Versuchstiere 5 min nach dem Training abgerufen. Dabei erhält eine Gruppe eine kältebedingte Betäubung vor dem Training (Kontrollgruppe) und die andere nach dem Training (Testgruppe, Abbildung 3.5A). Die labile Phase wird errechnet aus der Differenz aus dem kompletten 5 min Gedächtnis (Betäubung vor dem Training) und dem verbleibenden 5 min Gedächtnis nach der Anästhesie dar (Abschnitt 2.4). Die in Abbildung 3.5 dargestellten Experimente zeigen, dass ein Kälteschock vor dem Training zu einer anterograden Amnesie führte (Knapek et al., 2011). Die Kälteanästhesie nach dem Training hingegen führt zu einer retrograden Amnesie, also zum Löschen der labilen

Gedächtnisphase, wobei nur das konsolidierte und stabile Gedächtnis erhalten blieb (Abbildung 3.5B). Der Vergleich dieser beiden Experimente macht klar, dass die Reduktion der konsolidierten Gedächtnisphase nicht auf die kältebedingte Amnesie zurückzuführen ist, sondern tatsächlich auf die Deletion des D2R-Rezeptors.



Abbildung 3.5: Reduktion der stabilen Gedächtnisphase im 5 min Gedächtnis. A) Schema der verwendeten Lernparadigmen zur Aufspaltung des 5 min Gedächtnisses in eine stabile und eine labile Gedächtnisphase. Die Kälteanästhesierung nach dem Training löscht die labile Gedächtnisphase. B) Bereits nach 5 min ist die stabile Gedächtnisphase bei D2R  $\Delta 1$  im Vergleich zu W1118 reduziert. Dagegen verhält sich die labile Gedächtniskomponente wildtypisch und ist unbeeinflusst. D2R ist demnach an der Bildung des konsolidierten bzw. stabilen 5 min-Gedächtnis beteiligt. Alle Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM; N  $\geq$  10. Ausgewertet mit einem t-TEST(Levene-Test auf einem Signifikanzniveau von P < 0,05). Dargestellt sind beide Geschlechter.

Ebenso wie beim Kälteschockexperiment nach 3 h, war bereits nach 5 min die Performance der D2R  $\Delta$  1 um 50% reduziert. Eine Aufspaltung in stabile und labile Gedächtnisphase zeigte, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe W1118 eine signifikante Reduktion der stabilen Komponente bei der D2R  $\Delta$ 1 Mutante auftrat. Im Gegensatz dazu zeigte sich die labile Komponente unbeeinflusst. Mit diesem Experiment lässt sich die Existenz der labilen und stabilen Gedächtnisphase im 5 min STM nachweisen. Eine Reduktion des stabilen Gedächtnisses ist auch zu diesem Zeitpunkt D2R-bedingt und lässt sich auf die Deletion des Rezeptors zurückführen.

### 3.3 Einordung in den cAMP Signalweg

Bei der Aktivierung des Rezeptors D2R inhibiert sein G-Protein die AC und bewirkt so eine Senkung des cAMP-Spiegels (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994; Missale et al., 1998; Emilien et al., 1999; Vallone et al., 2000; Hearn et al., 2002). Folglich ist anzunehmen, dass die Mutante D2R  $\Delta$  1 einen erhöhten cAMP-Spiegel aufweist (Hearn et al., 2002). Aus anderen Studien ist bekannt, dass die Ausschaltung der AC rut zu einer Inhibierung der labilen Gedächtnisphase führt (Livingstone et al., 1984; Scheunemann et al., 2012), wohingegen ein Knockdown der PDE dnc zu einer Auslöschung der stabilen Gedächtnisphase führt (Dudai et al., 1976; Scheunemann et al., 2012). Rut ist für die Bildung des cAMPs zuständig und dnc für dessen Degradation, jedoch steuern beide nicht den gleichen cAMP-Pool an, sondern agieren in getrennten Signalwegen (Scheunemann et al., 2012). Um zu klären, wo der DA-Rezeptor D2R in diesen Signalwegen einzuordnen ist, wurde die Mutante D2R  $\Delta$  1 mit der jeweiligen RNAi-Linie von rut bzw. dnc kombiniert. Da alle drei Gene auf dem X-Chromosom lokalisiert sind, ist eine Prüfung von Doppelmutanten nicht ohne weiteres möglich. Alternativ wurde ein spezifischer RNAi-Knockdown genutzt mit dem das entsprechende Gen zwar nicht ganz ausgeschaltet wird, jedoch die Synthese seines Proteins großteils unterbunden wird. Abbildung 3.6 zeigte die verschiedenen Kombinationen der Mutante D2R A 1 mit den spezifischen Linien rut-RNAi, dnc-RNAi und D2R-RNAi. Die dnc-Mutante ist durch den Verlust der stabilen Gedächtnisphase charakterisiert (Dudai et al., 1976; Scheunemann et al., 2012), ebenso wie die D2R-Mutante (Abbildung 3.3). Der Knockdown des jeweiligen Gens allein reproduziert den von ihrer Mutante gezeigten Phänotyp (Abbildung 3.6), womit die Potenz und die Spezifität der entsprechenden RNAi untermauert wurden.

Ein D2R-Knockdown im Hintergrund der D2R-Mutante  $\Delta$  1 führte nicht zu einem additiven Phänotyp. Weiterhin blieb nur die stabile Gedächtnisphase von einer signifikanten Reduktion betroffen (Abbildung 3.6, links). Das selbe Bild zeigte sich bei der Kombination mit einem dnc-Knockdown. In beiden Fällen war das MTM um die Hälfte reduziert (Abbildung 3.6, mitte).



Abbildung 3.6: Einordnung des D2R-Rezeptors in den cAMP-Signalweg. Kombination der RNAi-Linien für D2R, dnc bzw. rut mit der DA-Rezeptormutante D2R  $\Delta$ 1. Ein RNAi-Knockdown des D2R-Rezeptors im Hintergrund der D2R  $\Delta$  1 Mutante führte nicht zu einem additiven Effekt. Das MTM (hellblaue Balken) war in allen Fällen im gleichen Maße reduziert. Ebenso wie die Kombination eines dnc-Knockdowns mit der D2R-Mutante. In beiden Fällen war die stabile Gedächtnisphase (dunkelblaue Balken) fast völlig ausgelöscht, während die labile unbeeinflusst blieb (nicht gezeigt). Ein ausschließlicher Knockdown der PDE dnc bzw. des Rezeptors D2R resultieret ebenfalls in einer völligen Reduktion des stabilen Gedächtnisses, sowie auch bei den jeweiligen Mutanten von D2R und dnc (Scheunemann et al., 2012). Im Kontrast dazu führte die Kombination eines rut-Knockdowns mit der D2R  $\Delta$  1 Mutante zu einer Eliminierung des kompletten Mittelzeitgedächtnisses (hellblaue Balken). Weder die stabile, noch die labile Phase waren nachweisbar. Der einzelne rut-Knockdown, sowie die rut-Mutante, zeigten hingegen lediglich eine Auslöschung des labilen Gedächtnisses (Livingstone et al., 1984; Scheunemann et al., 2012). Die kombinierte Reduktion von rut und D2R führte zu einem additiven Effekt, der Auslöschung des gesamten Gedächtnisses, bestehend aus labiler und stabiler Phase. Diese Daten erlauben den Schluss, dass rut und D2R nicht im selben cAMP-Signalweg agieren, wohl aber die PDE dnc und D2R. Alle Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM; N  $\geq$  8. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind Männchen.

Dies kann auf die Auslöschung der labilen Gedächtnisphase zurückgeführt werden, wobei die stabile erhalten bleibt. Allein der rut-Knockdown im Hintergrund der  $\Delta$  1 Mutante zeigte einen additiven Effekt, in dem das gesamte MTM ausgelöscht wurde. Hier wurde nicht nur die stabile Gedächtnisphase reduziert, sondern auch die labile (Abbildung 3.6, rechts). In allen drei Fällen verhält sich die Wildtypkontrolle der RNAi-Linien wie die wildtypische Kontrolle W1118. Diese Befunde legen nahe, dass sich dnc und D2R im gleichen cAMP-Signalweg befinden, während sich D2R und rut in zwei unterschiedlichen agieren. Es ist nachgewiesen, dass es in Drosophila mehrere ACs und PDEs existieren (Levin et al., 1992; Day et al., 2005). Die Experimente lassen demnach auf die Beteiligung einer anderen AC im cAMP-Signalweg von D2R und dnc schließen, welche an dieser Stelle noch nicht identifiziert ist. Die Betrachtung der Daten der Kombination des dnc-Knockdowns mit der Mutante  $\Delta$  1, sowie des alleinigen rut-Knockdowns lassen den Schluss zu, dass die Bildung der verschiedenen Gedächtnisphasen von der Höhe des cAMP-Spiegels beeinflusst wird. Dies erscheint durchaus sinnvoll, wenn man bedenkt, dass die für die Gedächtnisbildung nötige synaptische Plastizität u.a. durch cAMP moduliert wird (Abschnitt 1.5.2, Busto et al., 2010; Tomchik et al., 2013).

## 3.4 Systemische Analyse des D2R-Rezeptors mittels RNAi

Bereits im Jahr 2007 etablierten Isabelle Draper und ihre Kollegen anhand der Isoform 606 aa eine spezifische RNAi-Linie für den DA-Rezeptor D2R. Sie wiesen eine drastische Reduktion des Proteinlevels des D2R Rezeptors nach (Hearn et al., 2002; Draper et al., 2007). Sie zeigten außerdem, dass ein Knockdown des D2R-Rezeptors in Fliegen zu einer verminderten Lokomotion führt. Diese RNAi-Linie stellt ein potentes Werkzeug zur funktionellen Untersuchung des D2R-Rezeptors dar. In diesem Experiment soll überprüft werden, ob ein panneuraler D2R-Knockdown mittels des GAL4-Treibers elav<sup>III</sup> zu einer Reduktion des Gedächtnisses führt und ob dieser Phänotyp mit dem der D2R-Mutante vergleichbar ist. Außerdem sollen die für D2R notwendigen Strukturen in der Anatomie von *Drosophila* identifiziert werden. Als notwendige Strukturen für D2R werden jene bezeichnet, in denen eine Repression des Rezeptors zu einem Verlust des Gedächtnisses führt.



Abbildung 3.7: RNAi-Knockdown des D2R führt zur gleichen Gedächtnisreduktion wie die D2R-Mutante. Der D2R spezifische Knockdown bei panneuraler Expression durch den GAL4 Treiber elav<sup>III</sup> zeigte die gleiche Reduktion des Kurzzeitgedächtnisses wie die Mutante D2R  $\Delta$  1. Eine Kombination der Mutante D2R  $\Delta$  1 und des RNAi-Knockdowns zeigten keinen additiven Effekt in der Gedächtnisleistung. Dies ist ein Beweis für die D2R-Spezifität der hier verwendeten RNAi-Linie. Alle Daten zeigen die Mittelwerte ± SEM; N ≥ 8, p≤0,01. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind Männchen.

Der RNAi-Knockdown getrieben durch die GAL4-Linie elav <sup>III</sup> wies dieselbe signifikante Reduktion der Gedächtnisperfomance wie die Mutante D2R  $\Delta$  1 auf (Abbildung 3.7). Die Gedächtnisleistung des STM war dabei um mehr als die Hälfte reduziert. Eine Kombination der RNAi und der D2R  $\Delta$  1 hingegen führte nicht zu einem additiven Effekt. Dieser Befund ist ein Beweis für die Spezifität der D2R-RNAi und untermauert somit die Befunde von Draper und ihren Kollegen (Draper et al., 2007). Der Knockdown des D2R-Rezeptors im Nervengewebe führte zu einer Reduktion des Gedächtnisses. Dies ermöglicht den vertiefenden Einsatz der D2R-RNAi im nächsten Teil dieser Arbeit zur Lokalisierung D2R-spezifischer Strukturen in *Drosophila*. Mittels gewebespezifischer Expression der D2R-RNAi unter Kontrolle verschiedener GAL4-Treiber können die Hirnstrukturen ermittelt werden, in welchen der Rezeptor D2R notwendig für die Ausprägung eines normalen Gedächtnisses ist.

## 3.5 Funktionelle Rettung des D2R-Rezeptors mittels cDNA-Konstrukt

Durch die gezielte Expression eines cDNA-Konstruktes eines Gens lassen sich Aussagen über die Funktion des Gens und seiner morphologisch hinreichenden Strukturen machen (Abschnitt 3.4). Führt die Expression der cDNA des D2R-Rezeptors zu einer Rettung des Phänotyps der Mutante, lässt sich damit nochmals bekräftigen, dass der observierte Phänotyp der D2R  $\Delta$  1 Mutante ihren Ursprung tatsächlich in der Deletion des Rezeptorgens hat. Für die Generierung des D2R-cDNA-Konstruktes wurde die cDNA der durch Hearn 2002 beschriebenen Isoform 606 gewählt (Hearn et al., 2002). Auch Draper nutzte diese Isoform als Grundlage für ihre Arbeit (Draper et al., 2007). Um die Wirksamkeit des generierten cDNA-Konstruktes zu testen, wurde dieses unter Kontrolle des panneuralen GAL4-Treibers elav<sup>III</sup> exprimiert. Abbildung 3.8 zeigt die Expression der D2R-cDNA in einem D2R-mutanten Hintergrund. Sowohl das ungetriebene Rettungskonstrukt als auch die Mutante D2R  $\triangle$  1 zusammen mit dem GAL4-Treiber elav <sup>III</sup> zeigten keine Erhöhung der Gedächtnisleistung. Die Expression der cDNA unter Kontrolle des panneuralen GAL4-Treibers elav <sup>111</sup> führte zur Rettung des Kurzzeitphänotyps der D2R  $\Delta$  1 Mutante auf das wildtypische Niveau. Demnach führte eine panneurale Expression der D2R-cDNA zu einer Wiederherstellung des Gedächtnisses. Die Reduktion des Gedächtnisses ist auf die Deletion des D2R-Rezeptors zurückzuführen. Die panneurale Expression des D2R-Rezeptors ist für eine normale Gedächtnisausbildung hinreichend. Durch Nutzung des cDNA-Konstruktes unter Kontrolle verschiedener gewebespezifischer GAL4-Treiber ist es möglich jene Gehirnstrukturen zu identifizieren, in denen D2R hinreichend ist.



Abbildung 3.8: cDNA Rettung von D2R  $\triangle$  1. Der dokumentierte STM-Phänotyp der Mutante D2R  $\triangle$  1 kann mittels eines cDNA-Rettungskontruktes auf wildtypisches Niveau gehoben werden. Das cDNA-Konstrukt wurde dazu unter Kontrolle des panneuralen GAL4-Treiber elav <sup>III</sup> gestellt. Dabei führte das cDNA-Konstrukt oder auch der GAL4-Treiber allein nicht zu einer Wiederherstellung des Gedächtnisses. Der observierte Phänotyp der D2R-Mutante ist demnach auf die chromosomale Deletion des D2R-Rezeptors zurückzuführen, da die Expression seiner cDNA zu einer Rettung des Phänotyps führte. Alle Daten zeigen die Mittelwerte ± SEM; N ≥ 8, p≤0,01. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind Männchen.

Dies wird im folgenden Teil dieser Arbeit durchgeführt. Unter hinreichenden Strukturen versteht man Strukturen, in denen der funktionstüchtige Rezeptor mindestens vorhanden sein muss, um ein normales Gedächtnis bilden zu können.

## 3.6 D2R wird akut im adulten Gehirn für die Gedächtnisbildung benötigt

Viele Gene sind maßgeblich an der Entwicklung eines gesunden Individuums beteiligt. Wird ihre Expression ganz oder nur temporär unterbunden, kann dies zu Entwicklungsdefiziten führen. Diese können sich auf unterschiedliche Weise bemerkbar machen. Z.B. kann es zu einer Einschränkung in der körperlichen Entwicklung kommen, so dass die Tiere motorische Defizite aufweisen. In anderen Fällen kann es auch zu einer Veränderung der Morphologie kommen, was nicht selten gravierende neuronale Störungen zur Folge hat. Bei der generierten Deletionsmutante D2R  $\Delta$  1 soll untersucht werden, ob der dokumentierte Phänotyp auf eine Störung der Entwicklung zurückzuführen ist oder ob das Fehlen des Rezeptors akut bei den zellphysiologischen Prozessen der Gedächtnisbildung zum Tragen kommt.

Um eine akute Expression des DA-Rezeptors D2R zu erzielen, wird der verwendete GAL4-Treiber mb247 unter die Kontrolle eines temperatursensitiven GAL80<sup>ts</sup>-Repressors gestellt. Der GAL4-Treiber mb247 exprimiert nur in den Pilzkörpern und wird so lange unterdrückt, bis der GAL80<sup>ts</sup>-Repressors durch eine Erhöhung der Temperatur abgebaut wird. Erst dann kann der Transkriptionsfaktor GAL4 in den PK-Neuronen exprimiert werden und das Ablesen der D2R-cDNA in diesem Bereich ermöglichen. In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse dieses Experiments dargestellt. Zu sehen sind zwei Gruppen, welche sich lediglich in der Aktivität der GAL80<sup>ts</sup> unterscheiden. Die Tiere in der ersten Gruppe (schwarze Balken) wurden bis zum Zeitpunkt des Trainings auf 18°C gehalten. Hier wurde Gal80<sup>ts</sup> aktiv und blockiert den Transkriptionsfaktor GAL4 und die Expression der D2RcDNA in den Pilzkörpern. Tiere der zweiten Gruppe (graue Balken) wurden 30 h vor dem Training auf 30°C überführt und verblieben hier bis zum Training. In dieser Gruppe wurde GAL80<sup>ts</sup> durch den Temperaturshift inaktiviert. Die D2R-cDNA kann abgelesen und exprimiert werden. Wie die beiden Gruppen in Abbildung 3.9 zeigen, war eine akute Expression des DA-Rezeptors D2R im adulten Tier 30 h vor dem Training ausreichend, um eine Rettung des Phänotyps auf das wildtypische Niveau zu erreichen. Dies lässt den Schluss zu, dass D2R  $\Delta$ 1 nicht zu einem Entwicklungsdefizit führt, auf welches die Gedächtnisreduktion zurückzuführen ist. Eine akute Expression des Rezeptors D2R im adulten Tier war ausreichend um ein normales Gedächtnis ausbilden zu können.



Abbildung 3.9: Akute Expression von D2R in adulten Fliegen. Die akute Expression der cDNA des Rezeptors D2R (graue Balken) in 2-5 Tage alten Fliegen führte zu einer vollen Wiederherstellung des Kurzzeitgedächtnisses auf Wildtypniveau. Die cDNA-Expression steht dabei unter der Kontrolle, des temperatursensitiven GAL80<sup>ts</sup>-Treibers. In der Kontrollgruppe (schwarze Balken) war dieser die ganze Zeit aktiv und verhindert so eine Expression der D2R-cDNA. Lediglich bei der Testgruppe (graue Balken) wurde er durch einen Temperaturshift 30 h vor dem Training auf 30°C inaktiviert. D2R ist für die Entwicklung der Tiere demnach nicht essentiell. Eine akute Bereitstellung des Rezeptors in den PK 30 h vor dem Training war ausreichend, um das STM voll auszubilden. Alle Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM; N  $\geq$  6. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind Männchen.

## 3.7 D2R in den Pilzkörperneuronen ist notwendig und hinreichend für ein konsolidiertes Gedächtnis

Zahlreiche Studien in Drosophila und anderen Modellorganismen zeigen die essentielle Beteiligung des Pilzkörpers und seiner Bestandteile beim olfaktorischen Lernen und Gedächtnis (Schafer et al., 1994; I. Davis et al., 1993; Roman & Davis, 2001; Zars, 2000; Waddell & Quinn, 2001; Heisenberg, 2003; R. L. Davis, 2005; Akalal et al., 2006; Mao & Davis, 2009; Hu et al., 2010). Jedoch ist bis heute ungeklärt, ob diese Lobensysteme exklusiv für bestimmte Gedächtniskomponenten verantwortlich sind oder ob mehrere Lobensysteme an der Bildung einer Phase beteiligt sind (Zars, 2000; Akalal et al., 2006; Scheunemann et al., 2012). Um eine Aussage treffen zu können, in welchen Strukturen der Rezeptor D2R im Pilzkörper notwendig für das olfaktorische Gedächtnis ist, wurde eine Lokalisation mittels der D2R-RNAi und spezifischer GAL4-Treiber durchgeführt. Das GAL4-System bietet eine umfangreiche Auswahl an verschiedenen GAL4-Treibern, welche im Gehirn und verschiedene anderen Geweben exprimieren. Dabei überlappen einige GAL4-Treiber in ihrer Expression teilweise räumlich, sprechen jedoch gleichzeitig unterschiedliche Neuronen an und/oder variieren in ihrer Expressionsstärke. Aus diesem Grund werden, sofern möglich, verschiedene GAL4-Treiber für die gleichen Neuropile verwendet. Die Lokalisation im PK und seinem Lobensystem zeigten verschiedene Strukturen auf, die an der Bildung des Gedächtnisses beteiligt sind. Dabei wurde ihre Beteiligung an der stabilen Gedächtnisphase (Abbildung 3.10A, dunkelblaue Balken) sowie ihre generelle Beteiligung am MTM (hellblaue Balken) untersucht. Die GAL4-Linie mb247 exprimiert in den gesamten PK, jedoch nicht in anderen Arealen wie dem AL oder dem Zentralkomplex (ZK) (Akalal et al., 2006). Der Knockdown in den  $\alpha/\beta$ -Loben wurde dabei mit den GAL4-Linien 17d und 189y getrieben (Akalal et al., 2006), während der Knockdown in den  $\gamma$ -Loben mit den Linien NP1131 und H24 kontrolliert wurde. Die Linie NP1131 exprimiert wesentlich stärker in den  $\gamma$ -Loben als die Linie H24. Die Linie H24 exprimiert zusätzlich auch in den LNs des AL (Aso et al., 2009; Tanaka et al., 2012). Ein D2R-Knockdown im gesamten PK mit der GAL4-Linie mb247 führte dabei ebenso zum Verlust der stabilen Gedächtnisphase wie ein separater Knockdown in den  $\alpha/\beta$ -Loben oder den  $\gamma$ -Loben (Abbildung 3.10). Die labile Gedächtnisphase blieb dabei unbeeinflusst. Eine differenzierte Betrachtung des Lobensystems weist somit auf eine Beteiligung der  $\alpha/\beta$  bzw.  $\gamma$  Loben hin. Ein spezifischer D2R-Knockdown in den  $\alpha'/\beta'$ -Loben mit den Linien c320 und c305a hingegen führte nicht zu einer Repression der stabilen Gedächtnisphase (Abbildung 3.10, Krashes et al., 2007; Aso et al., 2009). Auch der Knockdown mit der Linie c232, welche im ZK



exprimiert, blieb ohne Effekt (Young & Armstrong, 2010).

Abbildung 3.10: Lokalisation notwendiger Strukturen für D2R im Pilzkörper mittels RNAi-Knockdown. A) Ein RNAi-Knockdown im gesamten PK mit der GAL4-Linie mb247 führte zu einer Reduktion des MTM (hellblaue Balken) und zur Auslöschung der stabilen Gedächtnisphase (dunkelblaue Balken). Die labile Gedächtnisphase war nicht betroffen und fand sich in der verbliebenen MTM-Perfomance wieder. Knockdowns mit den GAL4-Linien 17d und 189y in den  $\alpha/\beta$ -Loben sowie NP1131 und H24 in den  $\gamma$ -Loben führten ebenfalls zu einer Reduktion des MTM und einer Eliminierung der stabilen Phase. Ein Knockdown mit den Linien c320 und c305 für die  $\alpha'/\beta'$ -Loben und mit der Linie c232 für den Zentralkomplex führte hingegen nicht zu einer Reduktion des MTM. Die  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma$ -Loben zählen zu den notwendigen Strukturen im PK für die Ausprägung eines normalen Gedächtnisses. Alle Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM; N  $\geq$  8, p $\leq$ 0,01. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind Weibchen. B) Schema des neuronalen Netzwerks im adulten Kopf von Drosophila melanogaster. Neurone, in denen der RNAi-Knockdown mittels des entsprechenden GAL4-Treibers zu einer Repression der Performance der stabilen Gedächtnisphase führte, sind rot markiert. protocerebrales anteriomediales Cluster (PAM), protocerebrales posteriolaterales Cluster 1 (PPL1), protocerebrales posteriolaterales Cluster 2ab (PPL2ab), Projektionsneuronen (PNs), lokalen Interneuronen (LNs), Olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs), anteriorpaarig lateralen Neurone (APLs)

Alle GAL4-Treiber zeigten heterozygot im Wildtyphintergrund keine Reduktion

des MTM oder der stabilen Gedächtnisphase. Zusammenfassend lassen sich die  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  Loben im PK als die D2R notwendigen Strukturen identifizieren, um ein normales Gedächtnis zu bilden.

Als nächstes stellt sich die Frage, ob die identifizierten notwendigen Strukturen für D2R auch kongruent mit den hinreichenden sind. Hierfür bietet sich die Nutzung des cDNA-Konstruktes an. Eine gewebespezifische Expression der D2R-cDNA in den PK bzw. den einzelnen Lobensystemen in der D2R  $\Delta$  1 Mutante kann hier Aufschluss geben. Um vergleichbare Daten erheben zu können, wurde die Expression des D2R-cDNA-Konstrukts unter die Kontrolle derselben GAL4-Treiber gestellt, die auch für RNAi-Lokalisation genutzt wurden. Da kein Unterschied zwischen GAL4-Treibern für das gleiche Gewebe detektiert werden konnte, wurde in einigen Fällen nur ein GAL4-Treiber genutzt. Das cDNA-Konstrukt wurde in den  $\alpha/\beta$ -Loben nur unter Kontrolle der Linie 17d exprimiert und die  $\alpha'/\beta'$ -Loben nur unter Kontrolle der Linie c320 (Akalal et al., 2006). Erneut wurden MTM (Abbildung 3.11, hellblaue Balken) und die stabile Gedächtnisphase (dunkelblaue Balken) untersucht und dargestellt. Die Expression der cDNA im gesamten PK mittels der GAL4-Linie mb247 führte zu einer vollen Wiederherstellung des MTM und der stabilen Gedächtnisphase (Abbildung 3.11). Somit gehören die PK auch zu den hinreichenden Strukturen für D2R, um eine wildtypisches Gedächtnis auszuprägen. Die Lokalisation mit Hilfe des cDNA-Konstrukts in den Lobensystemen zeigte eine eindeutige Beteiligung der  $\alpha/\beta$ -Loben, sowie der  $\gamma$ -Loben. Die Expression des D2R-cDNA in diesen Neuropilen führte zur Wiederherstellung der Gedächtnisperformance auf das wildtypische Niveau. Im Gegensatz dazu war eine Rettung der stabilen Gedächtnisphase durch die Expression in den  $\alpha'/\beta'$ -Loben oder dem ZK nicht möglich. Die Kontrollgruppen mit den GAL4-Treibern allein im D2R  $\Delta$  1-Hintergrund zeigten keine Steigerung der Gedächtnisperformance, sondern die signifikante Reduktion des MTM und eine völlige Auslöschung der stabilen Gedächtnisphase. Die Lokalisation mittels cDNA identifizierte die  $\alpha/\beta$ -Loben, sowie die y-Loben als hinreichende Strukturen für D2R. Diese Loben gehören auch zu den für D2R notwendigen Strukturen. In beiden Fällen zeigten die  $\alpha'/\beta'$ - Loben, sowie der ZK keinerlei Einfluss auf das MTM oder die stabile Gedächtnisphase



allein. Jedoch sind die identifizierten Strukturen nicht kongruent.

Abbildung 3.11: Lokalisation hinreichender Strukturen für D2R im Pilzkörper mittels cDNA-Konstrukt. A) Eine Expression der cDNA im gesamten Pilzkörper durch die Nutzung des GAL4-Treibers mb247 führte zu einer vollen Wiederherstellung der MTM-Performance (hellblaue Balken), ebenso wie der stabilen Gedächtnisperformance (dunkelblaue Balken). Eine Expression in den  $\alpha/\beta$ -Loben durch die Linie 17d bzw. in den γ-Loben durch die Linien NP1131 und H24 führte zu einer stabilen Gedächtnisphase auf wildtypischem Niveau. Lediglich eine Expression in den  $\alpha'/\beta'$ -Loben durch die Linie c320 und dem Zentralkomplex durch c232 führten nicht zu einer Wiederherstellung der stabilen Phase. Die  $\alpha/\beta$ -Lobe und die  $\gamma$ -Loben gehören zu den hinreichenden Strukturen für D2R. Die Expression der cDNA hatte keinen Einfluss auf die labile Gedächtnisphase, welche sich in der Performance des MTM wiederfindet.  $\pm$  SEM; N  $\geq$  10. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind Männchen. B) Schema des neuronalen Netzwerks im adulten Kopf von Drosophila melanogaster. Neurone, in denen die cDNA-Expression mittels des entsprechenden GAL4-Treibers zu einer Wiederherstellung der Performance des MTM und des stabilen Gedächtnisphase führte, sind grün markiert. protocerebrales anteriomediales Cluster (PAM), protocerebrales posteriolaterales Cluster 1 (PPL1), protocerebrales posteriolaterales Cluster 2ab (PPL2ab), Projektionsneuronen (PNs), lokalen Interneuronen (LNs), Olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs), anteriorpaarig lateralen Neurone (APLs)

Die Expression der D2R cDNA in den  $\alpha/\beta$ -Loben führte zu einer vollen Wiederherstellung der Gedächtnisleistung (Abbildung 3.11), wobei im Umkehrexperiment, der Knockdown, in den  $\alpha/\beta$ -Loben zu einer drastischsten Reduktion der Gedächtnisleistung und dem Verlust des stabilen Gedächtnisses führte (Abbildung 3.10). Zusätzlich zu den PK sind auch andere Strukturen an den Gedächtnisprozessen beteiligt. Der olfaktorische Signalweg spielt dabei eine entscheidende Rolle. Ob und wo der DA-Rezeptor D2R in diesem Signalweg beteiligt ist, soll in weiteren Lokalisationsexperimenten unter Zuhilfenahme der RNAi-Linie und des cDNA-Konstruktes sowie verschiedener GAL4-Treiber geklärt werden.

## 3.8 Identifizierte Strukturen für D2R im olfaktorischen Signalweg sind inkongruent

Die Bildung eines Gedächtnisses beruht auf der Verarbeitung des CS und des US im Pilzkörper (R. L. Davis, 2005; Kasuya et al., 2009; Busto et al., 2010; Tomchik et al., 2013). Um bis zu dieser Struktur zu gelangen, werden CS- und US-assoziierte Impulse in vielen neuronalen Stationen verarbeitet (Abbildung 1.6).

Beginnend mit der Lokalisation der notwendigen Strukturen für D2R entlang des olfaktorischen Signalweges wird die D2R-spezifische RNAi-Linie unter die Kontrolle mehrerer gewebespezifischer GAL4-Treiber gestellt. Untersucht wird der Einfluss des gezielten D2R-Knockdowns auf das MTM und seine stabile Gedächtnisphase (Abbildung 3.12). Strukturen, die zu einer Ausprägung des D2R-Phänotyps führen, sind im Schema rot dargestellt.

Für die Lokalisation der notwendigen Strukturen stehen diverse GAL4-Treiber zur Verfügung, diese sind in Abbildung 3.12 dargestellt. So wurden zu Adressierung der ORNs der Treiber OR83b, für die PNs in Kombination mit den APLs der Treiber GH146, für die PNs ohne die APLs der Treiber GH146, *Cha*G80, für die APLs allein der Treiber NP2631, für die LNs die Treiber NP1227, NP2426 und GH298, für die DANs der Treiber TH und für die PK in Kombination mit den LNs die Treiber mb247, GH298 und OK107 verwendet.



Ein Knockdown mit der Linie OR83b in den ORNs beeinträchtigte keine Gedächtnisphase.

Abbildung 3.12: Lokalisation notwendiger Strukturen für D2R in der olfaktorischen Signaltransduktion mittels RNAi-Knockdown. A) Ein D2R-Knockdown in den ORNs und den PNs allein führte weder zu einer Reduktion des MTMs (hellblaue Balken), noch der stabilen Gedächtnisphase (dunkelblaue Balken). Jedoch führte er in den APLs zu einer Verminderung der Performance des MTM, welche auf die stabile Gedächtnisphase beschränkt werden kann. Die labile Gedächtnisphase war nicht betroffen und fand sich in der verbliebenen MTM-Performance wieder. Der D2R-Knockdown in den LNs und den DANs führte ebenfalls zu einer Herabsetzung des MTM und betraf auch hier ausschließlich die stabile Gedächtnisphase. Auch ein Knockdown im gesamten PK inklusive der LNs führte zu einem Ausfall in der stabilen Gedächtnisperformance. Es konnten die APL-, die DAN- und die LN-Neurone, sowie die bereits identifizierten  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$ -Loben zu den notwendigen Strukturen für D2R gezählt werden. Alle Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM; N  $\geq$  8, p $\leq$ 0,01. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind Weibchen. B) Schema des neuronalen Netzwerks im adulten Kopf von Drosophila melanogaster. Neurone, in denen der RNAi-Knockdown mittels des entsprechenden GAL4-Treibers zu einer Repression der Performance des MTMs bzw. des stabilen Gedächtnisphase führt, sind rot markiert. protocerebrales anteriomediales Cluster (PAM), protocerebrales posteriolaterales Cluster 1 (PPL1), protocerebrales posteriolaterales Cluster 2ab (PPL2ab), Projektionsneuronen (PNs), lokalen Interneuronen (LNs), Olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs), anterior-paarig lateralen Neurone (APLs), dopaminerger Neuronen (DANs)

Sowohl MTM als auch die stabile Gedächtnisphase waren wildtypisch ausgeprägt. Der verwendete GAL4-Treiber GH146 exprimiert in den PNs und in den APLs (Tanaka et al., 2008; X. Liu et al., 2009; Pitman et al., 2011). Ein Knockdown des D2R-Rezeptors mithilfe der GAL4-Linie GH146 führte zu einer drastischen Reduktion des MTM um die Hälfte. Das Aufspalten des MTM zeigte, dass diese auf einer völligen Tilgung des stabilen Gedächtnisses beruht (Abbildung 3.12). Um eine Zuordnung machen zu können, welche der beiden Strukturen für diese Auslöschung der stabilen Phase verantwortlich ist, müssen weitere GAL4-Linien genutzt werden. Zum einen wurde die GAL4-Linie NP2631 verwendet, da sie nur in den APL-Neuronen exprimiert und zum andern die Linie GH146 in Kombination mit ChaGAL80. GAL80 ist ein effektiver GAL4-Inhibitor, welcher in diesem Falle die Expression von GAL4 in den APLs unterdrückt. Dadurch wird die RNAi in diesem Areal nicht aktiv und es erfolgt hier kein D2R-Knockdown (Pitman et al., 2011). Ein Knockdown in den PNs allein (mittels GH146, ChaGAL80) und APLs allein (NP2631) zeigte klar, dass nur die APLs an der Bildung des normalen Gedächtnisses beteiligt sind.

Speziell bei den LNs werden drei verschiedene GAL4-Treiber eingesetzt, welche verschiedene Expressionsmuster in den LNs aufweisen, also unterschiedliche Populationen der Lokalen Interneuronen (LNs) adressieren. So exprimieren die NP1227 und die GH298 in den Lokalen Neuronen 1 (LN1). Sie unterscheiden sich hier lediglich in der Anzahl der betroffenen Zellen (Hummel & Zipursky, 2004; Tanaka et al., 2012). Die GAL4-Linie NP2426 exprimiert dagegen sowohl in den Lokalen Neuronen 2L (LN2L) als auch in den Lokalen Neuronen 2V (LN2V) (Tanaka et al., 2012). Ein Knockdown in jeder dieser drei LN-Linien führte zu einer Reduktion des MTM und zu einer Löschung des stabilen Gedächtnisses (Abbildung 3.12). Eine Repression in den DANs durch die GAL4-Linie TH resultiert in einer Verminderung des MTM und einer Eliminierung der stabilen Gedächtnisphase. Anhand der Lokalisation mit Hilfe der D2R-spezifischen RNAi können zusammenfassend die APLs, die LNs im AL, die DANs und die  $\alpha/\beta$ -Loben und  $\gamma$ -Loben als notwendige Strukturen für D2R identifiziert werden.

Mit Hilfe des D2R-cDNA-Konstrukts sollen nun die Strukturen ermittelt werden, welche an der olfaktorischen Transduktion des CS und der Vermittlung des US



beteiligt sind und somit eine normale Gedächtnisbildung begünstigen. Sind hier die notwendigen und die hinreichenden Strukturen für D2R kongruent?

Abbildung 3.13: Lokalisation hinreichender Strukturen für D2R in der olfaktorischen Signaltransduktion mittels cDNA-Konstrukt. A) Weder die cDNA-Expression in den ORNs, den PNs inklusive der APLs noch in den LNs oder den DANs konnten den D2R-Phänotyp retten. Weiterhin war das MTM (hellblaue Balken) reduziert und das stabile Gedächtnis (dunkelblaue Balken) ausgelöscht. Allein eine Expression im gesamten PK zusammen mit den LNs führte zu einer vollen Wiederherstellung des MTM und der stabilen Gedächtnisphase auf das wildtypische Niveau. Bei den hinreichenden Strukturen für D2R handelt es sich um die zuvor identifizierten Pilzkörperloben  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$ , exklusive der  $\alpha'/\beta'$ -Loben.  $\pm$  SEM; N  $\geq$  10. Ausgewertet mit einem einfaktoriellen ANOVA, LSD. Dargestellt sind Männchen. B) Schema des neuronalen Netzwerks im adulten Kopf von Drosophila melanogaster. Neurone, in denen die cDNA-Expression mittels des entsprechenden GAL4-Treibers zu einer Wiederherstellung der Performance des MTM bzw. des stabilen Gedächtnisphase führt, sind grün dargestellt. protocerebrales anteriomediales Cluster (PAM), protocerebrales posteriolaterales Cluster 1 (PPL1), protocerebrales posteriolaterales Cluster 2ab (PPL2ab), Projektionsneuronen (PNs), lokalen Interneuronen (LNs), Olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs), anteriorpaarig lateralen Neurone (APLs)), dopaminerger Neuronen (DANs)

Um die hinreichenden Strukturen des D2R-Rezeptors zu ermitteln, wurde das cDNA-Konstrukt mit einer Auswahl derselben GAL4-Treibern verkreuzt, die auch für die Lokalisation der notwendigen Strukturen genutzt wurden. Diese sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Strukturen, die zu einer vollen Rettung des D2R-Phänotyps führen, sind im Schema grün eingefärbt. In Abbildung 3.13A ist die Expression der GAL4-Linien dargestellt, welche zum einen die Prozessierung der olfaktorischen Information des CS beschreiben und zum andern die des US. Die Expression der D2R-cDNA unter Kontrolle der GAL4-Linie OR83b bzw. GH146 führte nicht zu einer Wiederherstellung des MTMs oder der stabilen Gedächtnisphase (Abbildung 3.13A). OR83b exprimiert in den ORNs, während GH146 in den PNs und den APL-Neuronen exprimiert. Demnach gehören diese Strukturen nicht zu den für D2R hinreichenden. Eine cDNA-Expression in den LNs allein durch die Linie GH298 führte nicht zu einer Rettung des D2R-Phänotyps. Erneut blieben sowohl das MTM als auch stabile Gedächtnis vermindert. Generell wäre die Verwendung der Linie NP2426 zur Expression am sinnvollsten, da sie zusätzlich zu den LN2L auch in den LN2V exprimiert (Tanaka et al., 2012). Jedoch ist diese Linie auf dem X-Chromosom lokalisiert und kollidiert mit dem D2R-Lokus. Sie kann daher für die Analyse nicht genutzt werden. Unter Nutzung der GAL4-Linie TH erfolgte die cDNA-Expression in den DANs. Eine Expression in den dopaminergen Neuronen führte nicht zu einer Erhöhung der Gedächtnisleistung auf das Niveau der Wildtypkontrolle W1118 - MTM und stabile Gedächtnisphase blieben reduziert (Abbildung 3.13A). In diesem Experiment rettete lediglich die Expression in den PK inklusive der LNs mit der Linie mb247, GH298 den D2R-Phänotyp. Sowohl das MTM als auch die stabile Gedächtnisphase wurden vollständig auf das Wildtyplevel angehoben. Jedoch ist diese Rettung nicht auf die Kombination PK und LNs zurückzuführen, denn wie bereits gezeigt wurde, genügt die Expression der D2R-cDNA in den PK (Abbildung 3.11), während sie in den LNs nicht zu einer Rettung führte (Abbildung 3.13A).

Diese Befunde differieren von der RNAi-Lokalisation der notwendigen Strukturen. Während der D2R-Knockdown in den APLs, den LNs und den DANs zu einer Reduktion der stabilen Gedächtnisphase führte (Abbildung 3.12A), kann eine cDNA Expression in diesen Strukturen den Phänotyp nicht retten (Abbildung 3.13A). Im Gegensatz zum D2R-Knockdown zeigten sich bei einer cDNA-Expression in den PNs+APLs, den LNs und den DANs keine Effekte. Eine cDNA-Expression in diesen Strukturen führte nicht zu einer Rettung der Performance. Ausschließlich die Expression der cDNA im PK zusammen mit den LNs führte zu einer vollen Wiederherstellung der Gedächtnisleistung. Dabei sind die LNs allein nicht von entscheidender Bedeutung, wie der Vergleich mit der vorherigen Analyse mittels der cDNA zeigt (Abbildung 3.11A, 3.13A). Die Experimente zeigen deutlich eine Inkongruenz der Daten, welche unterschiedliche Ursachen haben kann.

# 4 Diskussion

Aus vielen Quellen ist bekannt, dass DA als Neurotransmitter in *Drosophila* ein Agonist verschiedener GPCRs ist und dass dopaminerge Neuronen in Vertebraten und Invertebraten an der aversiven und auch der appetitiven Gedächtnisbildung beteiligt sind (reviewed in Waddell, 2013).

Der DA-Rezeptor D2R in Drosophila gehört zu den D2-ähnlichen GPCRs und seine Aktivierung führt zum einen zur Hemmung der AC und zum andern zur Modulation der K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanäle (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994; Missale et al., 1998; Emilien et al., 1999; Vallone et al., 2000; Hearn et al., 2002). Sequenzanalysen mit D2-ähnlichen Rezeptoren von Säugern zeigten eine hohe Homologie und wiesen verschiedene Spleißvarianten der D2-Rezeptors nach (Hearn et al., 2002; St Pierre et al., 2014). D2R wird im adulten und larvalen Hirn von Drosophila exprimiert und ist teilweise mit den DANs kolokalisiert (Hearn et al., 2002; Chintapalli et al., 2007). Studien an anderen DA-Rezeptoren der Säuger zeigten, dass diese durch ihre gerichtete inhibitorische Wirkung bei der Gedächtnisbildung eine wichtige Rolle spielen und eine koordinierte Signalintegration gewährleisten (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994; Picetti et al., 1997; Missale et al., 1998; Seeman et al., 2000; Hearn et al., 2002). Um ein tieferes Verständnis und mögliche Interaktionen besser verstehen zu können, wurde in dieser Arbeit die Funktion und Regulierung des D2R-Rezeptors in Drosophila untersucht.

## 4.1 D2R beeinflusst das konsolidierte olfaktorische Gedächtnis

In dieser Arbeit wurde eine Beteiligung des DA-Rezeptors D2R am aversiven olfaktorischen Lernen nachgewiesen. Für die Analyse wurden die hier generierten chromosomalen Deletionsmutanten D2R  $\Delta$  1 und 2 genutzt (Abschnitt 3.1). Dabei wurde der größte Teil des D2R-Genlokus deletiert, was die Annahme zulässt,
dass D2R nicht mehr synthetisiert werden kann und es sich somit um funktionelle Nullmutanten handelt. Eine definitive Bestätigung dieser Annahme steht jedoch noch aus und wäre z.B. durch einen D2R-Nachweis auf Transkript-Basis mittels der RT-PCR möglich (Pfaffl, 2004; Holzapfel & Wickert, 2007; SABiosciences, 2008). Die Deletion des D2R-Rezeptors führte zu einer Reduktion des Gedächtnisses (Abbildung 3.3) wie durch einen Komplementationstest belegt werden konnte (Abbildung 3.4). Diese Reduktion des Gedächtnisses konnte auf ein Auslöschen der stabilen Gedächtnisphase beschränkt werden (Abbildung 3.3, 3.5), während die labile Gedächtnisphase unbeeinflusst blieb.

Die stabile Gedächtnisphase konnte durch die panneurale Expression der cDNA der D2R-Isoform 606 aa gerettet werden (Abbildung 3.8). Der beobachtete Phänotyp hat keinen entwicklungsbedingten Ursprung, da eine akute Expression der D2R-cDNA im adulten Tier zu einer Rettung des Phänotyps und somit zu einer vollen Wiederherstellung des Gedächtnisses führte (Abbildung 3.9). Ein D2R-spezifische RNAi-Knockdown wies den gleichen Phänotyp auf wie die chromosomale Deletionsmutante des D2R-Rezeptors (Abbildung 3.7). Der panneurale Knockdown des D2R-Rezeptors führte zu einer Reduktion des STM (Abbildung 3.7) und konkret auf die der stabilen Gedächtnisphase (Abbildung 3.10). Anhand der hier erhobenen Daten konnte bestätigt werden, dass der Rezeptor D2R an der Bildung des konsolidierten olfaktorischen Gedächtnisses beteiligt ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass die inhibitorischen Dopaminsignale vermittelt durch den Rezeptor D2R speziell für die Bildung der stabilen Gedächtnisphase nötig sind, jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung der labilen Gedächtnisphase haben. Die Proteinsynthese-unabhängige Konsolidierung des Gedächtnisses beginnt bereits kurze Zeit nach dem Training und ist durch die Messung der stabilen Gedächtnisphase darstellbar (Isabel et al., 2004; Margulies et al., 2005; Knapek et al., 2010). Spezifische dopaminerge Neuronencluster leiten dabei die US-vermittelte Information über den olfaktorischen Signalweg zu den PK und in die KZ (Mao & Davis, 2009; Aso et al., 2010; Yamazaki et al., 2010; Aso et al., 2012; Plaçais et al., 2012). Eine teilweise Kolokalisation dieser DANs mit dem D2R-Rezeptor wurde bereits gezeigt (Draper et al., 2007). Eine weiterführende Lokalisationstudie des D2R-Rezeptors kann hier Aufschluss über die genaue

Verbindung zu den einzelnen DANs geben und helfen den zugrunde liegenden Signalweg besser zu identifizieren und zu verstehen.

## 4.2 D2R-Inkongruenz zwischen notwendigen und hinreichenden Strukturen

Mit den Werkzeugen der spezifischen RNAi und des cDNA-Konstruktes ist eine Identifikation notwendiger und hinreichender Strukturen für D2R möglich.



Abbildung 4.1: Vergleich notwendiger und hinreichender Strukturen für D2R im adulten Gehirn. In den beiden schematischen Darstellungen sind die notwendigen (rot) und die hinreichenden (grün) Strukturen im adulten Gehirn von *Drosophila* dargestellt. Nur die  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma$ -Loben gehören zu den notwendigen und zugleich hinreichenden Strukturen. Notwendig sind Strukturen, die durch einen D2R-RNAi-Knockdown zur Reduktion des Gedächtnisses führen. Dagegen führt eine Expression der D2R-cDNA in den hinreichenden Strukturen, in einem ansonsten D2R-mutanten Hintergrund, zu einer vollen Wiederherstellung des Gedächtnisses. protocerebrales anteriomediales Cluster (PAM), protocerebrales posteriolaterales Cluster 1 (PPL1), protocerebrales posteriolaterales Cluster 2ab (PPL2ab), Projektionsneuronen (PNs), lokalen Interneuronen (LNs), Olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs), anterior-paarig lateralen Neurone (APLs)), dopaminerger Neuronen (DANs), dorsal-paarig mediale Neurone (DPM), Antennal Cerebral Tract (ACT)

Notwendige Strukturen sind all jene, in denen die Reduktion des Rezeptors zum Verlust der stabilen Gedächtnisphase führt. Unter hinreichenden Strukturen sind all jene zu verstehen, in denen eine Wiederherstellung des D2R-Rezeptors in der Mutante D2R  $\Delta$  1 bzw. 2 zur Rettung des Phänotyps führt.

Der Vergleich der notwendigen und der hinreichenden Strukturen wies Unterschiede in den betroffenen Hirnstrukturen auf. Es ließen sich die APLs, die LNs des AL, die DANs und die  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma$ -Loben der PK als notwendige Strukturen nachweisen (Abbildung 3.10, 3.12) und im Gegensatz dazu konnten ausschließlich die  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma$ -Loben als hinreichende Strukturen identifiziert werden (Abbildung 3.11, 3.13).

#### 4.2.1 Die APL-Neurone

Die APL-Neurone gehören zu einer der Strukturen, in denen der intakte D2R-Rezeptor notwendig, jedoch nicht hinreichend ist, um ein normales Gedächtnis mit all seinen Phasen auszubilden. Die Beteiligung der APL-Neurone im aversiven olfaktorischen Lernen wurde bereits belegt, ebenso ihre inhibitorische Wirkung (Weinberger, 2004; Busto et al., 2010; S. D. Chang & Liang, 2012). Die neuronale Plastizität der APLs ist trainingsinduziert (Busto et al., 2010) und eine Blockade des APL-Outputs nach dem Training führt zu einer Reduktion des labilen Gedächtnisses, jedoch nicht zu einer Beeinträchtigung der Konsolidierung des LTM (Tanaka et al., 2008; X. Liu et al., 2009; Pitman et al., 2011). Die APLs innervieren die Kalyx der PK und die Loben. Eine solche Innervation der Loben ist auch bei den DPM-Neuronen nachgewiesen, ebenso wie ihre Beteiligung an der Bildung des labilen und des konsolidierten Gedächtnisses. Durch ein funktionelles Imaging wurde nachgewiesen, dass olfaktorisches Lernen spezifisch die DPM-Neuronen-Aktivität erhöht, während es gleichzeitig die Aktivität der APLs durch die Prozessierung des konditionierten Duftes reduziert (Yu et al., 2005; X. Liu et al., 2009), woraus sich schließen lässt, dass APLs und DPM-Neurone funktionell verbunden sind. Ein Knockdown des D2R-Rezeptors in den APL-Neuronen führte zu einer Reduktion des MTM und zu einer völligen Auslöschung der stabilen Gedächtnisphase (Abbildung 3.12). Die labile Phase blieb von dieser

Reduktion unbeeinflusst. Es ist noch unklar, wie die inhibitorisch wirkenden APL-Neuronen mit dem ebenfalls inhibitorischen D2R-Rezeptor in Verbindung stehen. Um mehr Details über diese Verbindung zu erhalten, sind weitere Analysen notwendig, wie z.B. die Isolation einzelner APL-Neurone mittels anderer GAL4-Linien.

#### 4.2.2 Der Antennallobus (AL)

Bereits aus der Honigbiene ist bekannt, dass der AL mit seinen LNs eine Beteiligung an der Prozessierung des Lernens und Gedächtnisses hat. So führt die Blockade des synaptischen Outputs des ALs bei Bienen zu einer Störung in der Bildung des Gedächtnisses (Menzel & Muller, 1996; Faber et al., 1999). Auch in Drosophila spielt der AL bei der Duftprozessierung und dem Lernen eine entscheidende Rolle (Yu et al., 2004). Die Wahrnehmung eines Duftes führt zur Aktivierung eines bestimmten Musters der Glomeruli des ALs. Dieses Muster ist für jeden Duft unterschiedlich und verändert sich nach der Duftkonditionierung. Eine erneute Duftpräsentation des konditionierten Duftes führt zu einer erhöhten Rekrutierung der Glomeruli im AL, so dass mehr Glomeruli die Informationen über diesen Duft an die PK übertragen und somit eine stärkere Reaktion im PK hervorrufen als bei einem naiven Duft (Yu et al., 2004). Zusätzlich konnte eine Proteinsynthese in den Synapsen, die vorher durch eine Duftprozessierung angeregt wurden, nachgewiesen werden (Ashraf et al., 2006), ebenso wie eine Innervierung des AL durch dopaminerge Neuronen (Anton & Homberg, 1999; Nassel, 2002; Masse et al., 2009). Diese neuromodulatorischen Innervierung ist grundlegend an der Änderung des Reaktionsverhaltens des AL während des assoziativen Lernens beteiligt (Faber et al., 1999; Daly et al., 2004; Masse et al., 2009). Die hier erhobenen Daten weisen ebenfalls auf eine solche Innervierung hin, da sie den AL als eine, für die Gedächtnisbildung, notwendige Struktur für D2R identifizieren. Der RNAi-Knockdown des D2R-Rezeptors führte zu einer Reduktion um 50 % des MTM (Abbildung 3.12). Die Aufteilung in die labile und die stabile Gedächtnisphase zeigte, dass die Reduktion aus der Eliminierung der stabilen Gedächtnisphase resultierte (Abbildung 3.12), während

die labile Phase wildtypisch war und sich im verbliebenen MTM widerspiegelte. Zusammenfassend kann man demnach von einer konservierten Funktionsweise des AL in der Gedächtnisbildung und dem olfaktorischen Signalweg ausgehen, die mit der des D2R-Rezeptors korreliert.

#### 4.2.3 Die dopaminergen Neurone (DANs)

Im Gehirn von Drosophila sind acht dopaminergen Neuronencluster identifiziert (Mao & Davis, 2009). Experimente zeigten, dass die Blockade der DANs und somit die Blockade des DAN-Outputs nach dem Training zu einer verbesserten Gedächtnisperformance führt, wohingegen eine Stimulierung der DANs den Gedächtnisabbau beschleunigt (Berry et al., 2012). Die Blockierung der DANs während des Trainings verhindert die Akquise eines Gedächtnisses und es kommt zu keinerlei Gedächtnisbildung (Schwaerzel et al., 2003; Berry et al., 2012). Drei dieser beschriebenen Cluster zeigen eine Beteiligung am olfaktorischen Lernen (Aso et al., 2010, 2012): das PAM, das PPL1 und das PPL2ab. Diese sind an der Transduktion des US in die PK-Loben beteiligt (Aso et al., 2012). Eine Blockade jedes dieser drei Cluster während der Gedächtnisakquise zeigte eine Beteiligung der einzelnen Cluster am aversiven Gedächtnis. Interessanterweise unterscheiden sich die Gedächtnisausprägungen der drei Cluster in ihrer zeitlichen Stabilität (Aso et al., 2012). Demnach spielen die drei Cluster gegenläufige Rollen in der Formation und der Degradation der stabilen Gedächtnisphase (Plaçais et al., 2012; Aso et al., 2012). Besonders die Cluster PPL1 und PPL2ab sind hier involviert. Eine verstärkte Kolokalisation des D2R-Rezeptors in diesen beiden Clustern ist nicht unwahrscheinlich, jedoch noch nicht belegt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass D2R in den DANs essentiell ist (Abbildung 3.12). Der RNAi-bedingte Knockdown des Rezeptors D2R in den DANs resultierte in einer gravierenden Verminderung des Mittelzeitgedächtnisses, welche auf die Auslöschung der stabilen Gedächtnisphase zurückzuführen war (Abbildung 3.12), aber die labile nicht betraf. Weitere Knockdownexperimente mit spezifischen GAL4-Linien für die drei Cluster könnten helfen die Verbindung zwischen dem D2R-Rezeptor und diesen Clustern besser zu verstehen.

#### 4.2.4 Die $\alpha/\beta$ - und $\gamma$ -Loben

Bei allen Unterschieden in den notwendigen und hinreichenden Neuronenpopulationen sind auch gemeinsame Strukturen identifiziert worden: die  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma$ -Loben der PK. Ein Knockdown des Rezeptors in jeder einzelnen dieser Strukturen führte zu einer Halbierung des MTM und zu einer völligen Eliminierung der stabilen Gedächtnisphase (Abbildung 3.10). In der Mutante D2R  $\Delta$  1 ließ sich diese Phänotyp durch die Expression des cDNA-Konstrukts jeweils in den  $\alpha/\beta$ bzw. γ-Loben retten (Abbildung 3.11). Demnach lässt sich das konsolidierte Gedächtnis durch die Manipulation der einzelnen Loben auslöschen, während eine Wiederherstellung des Rezeptors in der Mutante in den einzelnen Loben zur Ausprägung eines wildtypischen Gedächtnis führt. Die Daten zeigen somit ebenso eine Inkongruenz der notwendigen und hinreichenden Strukturen für D2R innerhalb der Loben auf. Eine Beteiligung der PK und seiner Loben an der Bildung und dem Abruf eines Gedächtnisses wurde nicht nur bei Drosophila nachgewiesen (I. Davis et al., 1993; Roman & Davis, 2001; Waddell & Quinn, 2001; R. L. Davis, 2005; Heisenberg, 2003), sondern auch bei anderen Insekten wie z.B. der Honigbiene (Schafer et al., 1994). In ihnen findet die Integration des CS/US statt und es erfolgt die Verarbeitung der beiden Informationen (Heisenberg, 2003; Busto et al., 2010). Auch andere Arbeiten deuten auf eine Beteiligung dieser drei Loben hin, wenngleich sie auch eine unterschiedliche Beteiligung der einzelnen Loben mitdiskutieren (Zars, 2000; McGuire et al., 2005; Akalal et al., 2006; Qin et al., 2012; Scheunemann et al., 2012). Bis heute ist unklar, welche Lobensysteme im Detail beteiligt sind und ob eines oder mehrere von ihnen exklusiv für eine bestimmte Gedächtnisphase zuständig sind. In der dDA1-Mutante ist die Expression der cDNA in den PK ausreichend, um ein normales aversives bzw. appetitives Gedächtnis bilden zu können (Kim et al., 2007a). Weiterhin ist bekannt, dass die Neuronen der  $\gamma$ -Loben den dopaminergen Input bei der aversiven Gedächtnisformation vermitteln und die Expression des dDA1-Rezeptors allein in den  $\gamma$ -Loben zu einer vollen Wiederherstellung des aversiven STM und LTM führt (Qin et al., 2012). Aus diesen Befunden und der essentiellen Präsenz des D2R-Rezeptors in diesen Strukturen könnte man ableiten, dass eine Aktivierung

und Inhibierung in den gleichen Strukturen erforderlich ist, um cAMP-Signale zu integrieren und Gedächtnisse zu formen. Dies würde für eine regulatorische Funktion des D2R-Rezeptors sprechen und die  $\gamma$ -Loben als gemeinsame Struktur kennzeichnen.

### 4.3 D2R-Isoformen besitzen unterschiedliche Expression und Funktion

Eine Erklärungen für die Inkongruenz der notwendigen und hinreichenden Neuropile sind die D2R-Isoformen. Die Aussagen zur Anzahl und Größe der alternativen Isoformen variieren stark. Laut der Datenbank *Flybase* sind derzeit sechs D2R-Isoformen annotiert (St Pierre et al., 2014). Diese unterscheiden sich in ihrer Größe (466-905 Aminosäuren (aa)) (Abbildung 4.2) und sind erst seit 2013 in der Datenbank *Flybase* vermerkt (St Pierre et al., 2014). Ein Sequenzvergleich der sechs Isoformen zeigte, dass sie viele homologe Bereiche besitzen und ihre Unterschiede vorrangig in der Region zwischen der V. und VI. Transmembrandomäne (TM) zu finden sind. Dieser Bereich entspricht der 3. intrazelluläre Schleifen (IL), welche maßgeblich an der Bindung des G<sub>i</sub>-Proteins beteiligt ist (Blenau & Baumann, 2001, 2003).

Die *Flybase*-Annotierungen der D2R-Isoformen differieren von denen aus früheren Studien (Hearn et al., 2002; Draper et al., 2007). Dort wurden acht Proteinisoformen dokumentiert, wobei die längste 606 aa als Grundlage für die bisherige Charakterisierung des D2R-Rezeptors, der Generierung der spezifischen RNAi-Linie und des Antikörpers diente (Hearn et al., 2002; Draper et al., 2007).

Die sechs annotierten Isoformen aus der Datenbank *Flybase* weisen hohe Homologien zu der bereits charakterisierten Isoform 606 aa auf und weichen nur im Bereich zwischen der V. und VI. TM von ihr ab (Abbildung 4.2). Die Isoform D2R 606 aa ist bis auf ihre Anfangssequenz völlig identisch mit der Isoform D2R 905 aa und weist eine abweichende Aminosäure von der Isoform D2R 904 aa auf. Diese Erkenntnisse und die inkongruenten D2R-relevanten Strukturen (4.1) lassen die Vermutung zu, dass es sich bei der Isoform D2R 606 aa um eine trunkierte Variante der Isoform D2R 905 aa handelt, welche eventuell gewebespezifisch exprimiert wird und nicht die volle Funktionsfähigkeit des D2R-Rezeptors besitzt. Sowohl die generierte und in dieser Arbeit verwendete RNAi-Linie, als auch der Antikörper interagiert mit den derzeit berechneten Isoformen (Abbildung 4.2). Somit erfolgt die Degradation ihrer mRNAs durch die RNAi-Linie, ebenso wie die Markierung ihrer Proteine. Es werden also alle Isoformen adressiert.



**Abbildung 4.2:** Isoformen des D2R-Rezeptorsproteins. Derzeit sind sechs Isoformen des D2R-Rezpetors (schwarze Balken) in der *Flybase*-Datenbank verzeichnet (St Pierre et al., 2014). Sie unterscheiden sich in ihrer Anfangssequenz und ihrer Sequenz zwischen der V. und der VI.TM (rot unterlegt), was dem Bereich der 3.IL entspricht. Die grün unterlegten Abschnitte markieren die 7 TMs, welche in allen Isoformen homolog sind (Hearn et al., 2002; St Pierre et al., 2014). Die blau eingezeichnete Isoform 606 aa ist früher identifiziert und charakterisiert worden und wird nicht mehr in *Flybase* aufgeführt (Hearn et al., 2002). Sie ist die Grundlage für die D2R-spezifische RNAi-Linie (Draper et al., 2007) und das in dieser Arbeit verwendete cDNA-Konstrukt. Der RNAi-korrespondierende Bereich sowie die Antikörperbindestelle sind markiert (Draper et al., 2007) und zeigen, dass sowohl die RNAi als auch der Antikörper an allen Isoformen binden. Die Isoform 606 aa ist bis auf ihren Anfangsbereich hundertprozentig homolog mit der Isoform 905 aa, was den Schluss zulässt, dass es sich hierbei um eine trunkierte Variante davon handelt. Transmembrandomänen (TM)

Auch das in dieser Arbeit generierte und verwendete cDNA-Konstrukt beruht auf der Isoform 606 aa. Demnach exprimiert das cDNA-Konstrukt nur diese eine Isoform und diese Expression scheint nicht redundant zu der des wildtypischen D2R-Rezeptors zu sein. Bereits an anderen Proteinen wurde nachgewiesen, dass verschiedene Isoformen eines Proteins in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und dort abweichende Funktionen übernehmen (Beavo, 1995; Y. Yang et al., 2011). Vom D2R-Rezeptorhomolg in Säugern wurden zwei Isoformen nachgewiesen und charakterisiert, welche ebenfalls durch alternatives Spleißen des Bereichs der 3.IL entstehen (Dal Toso et al., 1989; Jackson & Westlind-Danielsson, 1994; Wess, 1997; Picetti et al., 1997; Missale et al., 1998; Seeman et al., 2000; Hearn et al., 2002). Dabei besitzt die längere Isoform 29 zusätzliche Aminosäuren in der 3.IL (Monsma Jr. et al., 1989; Guiramand et al., 1995). Beide Isoformen zeigten Unterschiede in der Kopplungsaffinität der drei Gi-Protein-Subklassen (Bray et al., 1987; Jones & Reed, 1987; Montmayeur et al., 1993; Guiramand et al., 1995; Ang et al., 2012). Demnach wird vermutet, dass es dem Rezeptor durch die Kopplung an sie möglich wird, verschiedene Signaltransduktionen zu vermitteln (Missale et al., 1991; Lledo et al., 1992; Montmayeur et al., 1993). Es wurde bereits nachgewiesen, dass die längere D2R-Isoform eine höhere Affinität für die Subklasse der Gi2-Proteine besitzt (Giros et al., 1989; Senogles et al., 1990; Montmayeur et al., 1991, 1993). Andere Studien belegten, dass beide D2R-Rezeptorisoformen an die Gi3-Proteine koppeln, was zu einer Inhibierung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, bei gleichzeitiger Aktivierung der K<sup>+</sup>-Kanäle führt (Missale et al., 1991; Lledo et al., 1992). Durch diese flexible Interaktion mit den G<sub>i</sub>-Proteinen kann eine physiologische Plastizität gegeben sein, die es den DA-Rezeptoren erlaubt, unterschiedliche Signalwege zu steuern. Eine derartige Funktionsweise wäre auch bei dem Drosophila D2R-Rezeptor vorstellbar und eine Erklärung für die beschriebene Inkongruenz der Neuropile. Die zwei D2R-Isoformen in Säugern unterscheiden sich auch in ihrer Sensibilität gegenüber ihrem Liganden und in ihrer räumlichen Expression. Die kürzere Isoform wird in den präsynaptischen, dopaminergen Neuronen exprimiert und fungiert dort als Autorezeptor, welcher die Ausschüttung von DA kontrolliert (Usiello et al., 2000). Sie inhibiert zudem D1-Rezeptor-vermittelte Funktionen, was auf eine Interferenz zwischen den DA-Rezeptoren schließen lässt (Usiello et al., 2000). Die längere Isoform wird dagegen postsynaptisch exprimiert und ist an der

Lokomotion und der Vermittlung weitere physiologischer Prozesse beteiligt (Khan et al., 1998; Usiello et al., 2000). Somit besitzen die beiden Isoformen des D2R-Säugerhomologs unterschiedliche Expressionsorte und unterschiedliche Funktionen.

Ein weiteres Beispiel für die Unterschiede zwischen Isoformen eines Proteins ist der vesikuläre Monoamintransporter in *Drosophila*, kurz dVMAT (Greer et al., 2005). Er ist der einzig beschriebene synaptische vesikuläre Amintransporter und es wurden bereits zwei seiner vier Transkriptisoformen genauer charakterisiert (Greer et al., 2005). Die Spleißvariante dVMAT-A wird in allen dopaminergen, octopaminergen und serotonergen Neuronen exprimiert und transportiert das entsprechende biogene Amin (Greer et al., 2005). Dagegen wurde Isoform dVMAT-B lediglich in einem kleinen Areal der Glia des visuellen Systems nachgewiesen und ist dort zuständig für die Speicherung von Histamin (Romero-Calderón et al., 2007, 2008). Beide Spleißvarianten werden in unterschiedlichen Arealen exprimiert und erfüllen dort unterschiedliche Aufgaben, ebenso wie der D2R-Rezeptor der Säuger.

Diese Erkenntnisse bekräftigen die Vermutung, dass die Inkongruenz zwischen den notwendigen bzw. hinreichenden Strukturen für D2R auf eine Spezifität der Isoformen zurückzuführen ist. Offenbar ist die im cDNA-Konstrukt verwendete verkürzte Isoform D2R 606 aa spezifisch für die  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma$ -Loben und kann nur in diesen Neuropilen die Funktionalität des D2R-Rezeptors wiederherstellen. Die Expression dieser Isoform in den  $\alpha/\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Loben führte zu einer vollen Wiederherstellung des MTM, welche auf die wildtypische Ausbildung der stabilen Gedächtnisphase zurückgeführt werden konnte (Abbildung 3.11, 3.13). Das lässt den Schluss zu, dass die D2R-Isoform 606 im natürlichen wildtypischen Zustand an der konsolidierten Gedächtnisbildung beteiligt ist bzw. alle erforderlichen Funktionsmerkmale besitzt. Eine Expression in anderen Neuronenpopulationen führte dagegen nicht zu einer Rettung des Phänotyps (Abbildung 3.11, 3.13). Demnach ist die D2R-Isoform 606 spezifisch für die  $\alpha/\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Loben und es werden weitere bzw. andere D2R-Isoformen in den verschiedenen Neuropopulationen benötigt um eine natürliche Funktionalität zu gewährleisten. Es wurde belegt, dass das alternative Spleißen von GPCRs zu

einer gewebe- oder zellspezifischen Expression des betroffenen Rezeptors führt, während die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion unverändert bleibt (Khan et al., 1998; Usiello et al., 2000; Hearn et al., 2002). Dies würde auf ein konserviertes Verhalten schließen lassen, bei dem Isoformen in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden, wobei es zu einer möglichen Funktionsänderung kommen kann, aber nicht muss.

### 4.4 Oligomerisierung von GPCR

Doch nicht nur durch die Ausbildung unterschiedlicher Isoformen kann es zu der hier dokumentierten Inkongruenz der Strukturen kommen. Von GPCRs ist bekannt, dass sie funktionell aktiv werden, wenn sie als Monomere oder Dimere, und sogar auch als höher geordnete Oligomere akkumulieren (George et al., 2002; Maggio et al., 2009). Dabei bilden sie nicht nur Homooligomere, wie z.B. D2-ähnliche Rezeptoren, sondern auch Heterooligomere, zwischen Rezeptoren unterschiedlicher Klassen (Hillion et al., 2002; George et al., 2002; Canals et al., 2003; Ferre et al., 2004; Prinster et al., 2005; George & O'Dowd, 2007; Szafran et al., 2012). Heterooligomerisierung ist sowohl für die D1-ähnlichen als auch für die D2-ähnlichen Rezeptoren gezeigt. Es befähigt die GPCR dazu an einer Vielzahl unterschiedlicher Signalwege teilzuhaben und das zu vermittelnde Signal zu modulieren (Scarselli et al., 2001; George & O'Dowd, 2007).

D1- und D2-Rezeptoren können Heterooligomere bilden und wenn dieses aktiviert wird, kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C und zu einer intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung. Diese Heterooligomere sind an G<sub>q</sub>-Protein gekoppelt und wurden in Zellen nachgewiesen, die auch Homooligomere von D1- bzw. D2-Rezeptoren exprimieren (S. P. Lee et al., 2004; So et al., 2005). Das impliziert, dass D1- und D2-Rezeptoren im gleichen Signalkomplex exprimiert werden (George & O'Dowd, 2007). Die Aktivierung der D1- bzw. D2-Rezeptoren führt zu einer Stimulation oder Inhibierung der AC-vermittelten Generierung von cAMP, jedoch nicht die Aktivierung der D1/D2-Heterooligomere. Die Aktivierung der D1/D2-Heterooligomere Stimulation der Stimulation (Same Schwert, Same Schwert, Sam

Calmodulin abhängigen Proteinkinase (CaMK) (S. P. Lee et al., 2004). Nur wenn beide Dimerpartner aktiviert werden, wird die Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung getriggert. D1/D2-Heteromer, Homooligomere oder einzelne Rezeptoren zeigten keine Unterschiede in Ligandbindetaschen (So et al., 2005). Dafür jedoch wurde eine signifikante Änderungen in intrazellulären Domänen nachgewiesen, welche die Kopplung an verschiedene G-Proteine ermöglicht (George & O'Dowd, 2007). So ist es unterschiedlichen DA-Agonisten möglich, verschiedene Signalwege zu aktivieren, womit sie selektiv D1/D2-Heterooligomere und D1/D1-Homooligomere aktivieren können und die verschiedenen Signalkaskade auslösen können (George & O'Dowd, 2007; Rashid et al., 2007). Das Ca<sup>2+</sup>-Signal desensibilisiert schnell und es kommt zu einer Kointernalisierung der Rezeptoren. Damit ist eine direkte Verbindung zwischen DA und der schnellen Calcium-Signalen nachgewiesen, welches wichtige Effekte auf DA-vermittelte synaptische Plastizität hat (George & O'Dowd, 2007; Rashid et al., 2007). Ein weiteres Beispiel ist die Heterdimerisierung zwischen dem humanen Rezeptor D2 und dem Adenosinrezeptor A2A (Hillion et al., 2002; Canals et al., 2003; Ferre et al., 2004). Auch hier kommt es zu einer Kointernalisierung der Rezeptoren und zu einer generell veränderten Signaltransduktion.

Möglicherweise könnte demnach der DA-Rezeptor D2R eine Untereinheit in einem heterodimeren Rezeptorkomplex sein. Durch ihn wird eventuell die Bindespezifität des Oligomeres modifiziert oder der Aufbau des funktionellen Rezeptorkomplexes reguliert. Beide Funktionen sind an GPCRs untersucht (Angers et al., 2002). Über seinen Dimerisierungspartner kann an diesem Punkt der Forschung nur spekuliert werden.

### 4.5 Funktionsmodell des D2R-Rezeptors in der Gedächtnisbildung

Viele Studien zeigten, dass sich die Prozesse des Lernens und Gedächtnisses in verschiedene Abschnitte unterteilen lassen (McGaugh, 2000; Isabel et al., 2004;

Keene et al., 2006; Waddell, 2010). Zum einen gibt es die Gedächtnisakquise. Hier wird ein Gedächtnis angelegt, welches jedoch zunächst labil und auslöschbar ist (Dubnau et al., 2001; Waddell, 2010; Berry et al., 2012). Zum andern zeigt sich die Gedächtniskonsolidierung, welche sich an die Akquise anschließt. Durch sie wird das angelegte Gedächtnis stabilisiert und verfestigt (Berry et al., 2012; Cervantes-Sandoval et al., 2013). Die DANs sind an diesen Prozessen maßgeblich beteiligt (Mao & Davis, 2009; Aso et al., 2010; Plaçais et al., 2012; Berry et al., 2012). Sie vermitteln den US zu den PK vorrangig durch den D1-ähnlichen Rezeptor dDA1 und gewährleisten damit die Gedächtnisakquise. Das ausgeschüttete DA in den PK aktiviert auch den D1-ähnlichen Rezeptor DAMB. Dieser vermittelt den DA-bedingten Abbau des kürzlich angelegten Gedächtnisses (Berry et al., 2012). Dieser durch Berry und Kollegen beschriebene Mechanismus betrifft lediglich die labile Gedächtnisphase, nicht aber die stabile. Es wird vermutet, dass die Konsolidierung eines Gedächtnisses dieses vor dem dopaminerg-aktivierten und PK-vermittelten Vergessen schützt und somit eine stabile Gedächtnisphase schafft (Berry et al., 2012).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten belegen, dass der D2-ähnliche Rezeptor D2R an der Konsolidierung des Gedächtnisses beteiligt ist (Abbildung 3.3, 3.5). Dabei kommen den D2R-Isoformen unterschiedliche Stellenwerte bezüglich ihrer Funktion und ihres Expressionsorts zu (Abbildung 3.10, 3.11, 3.12, 3.13). Dies zeigte auch der Vergleich zum homologen D2R-Rezeptor der Säuger (Dal Toso et al., 1989; Jackson & Westlind-Danielsson, 1994; Wess, 1997; Picetti et al., 1997; Missale et al., 1998; Seeman et al., 2000; Hearn et al., 2002). Für den D2R-Rezeptor der Säuger wurde die Interferenz mit den D1-ähnlichen-Rezeptoren nachgewiesen, dabei handelt es sich um eine Inhibierung der D1vermittelten Rezeptorfunktion durch die kurze D2R-Isoform (Stoof & Kebabian, 1981; Rubinstein et al., 1988; Waddington & Deveney, 1996; Usiello et al., 2000). Durch diese Interferenz erfolgt eine Modulation der dopaminergen postsynaptischen Antwort (Bray et al., 1987; Usiello et al., 2000). Das weitgehend übereinstimmende Expressionsmuster der D1- und D2-ähnlichen Rezeptoren in Säugern weist zum einen auf eine räumliche Kolokalisation der DA-Rezeptoren und zum andern auf einen direkten intrazellulären Regulationsmechanismus

zwischen diesen DA-Rezeptoren hin, mit welchem der cAMP-Spiegel moduliert werden kann (Surmeier et al., 1996; Aizman et al., 2000).

Ein solch übereinstimmendes Expressionmuster in den Neuropilen ist auch bei den DA-Rezeptoren von *Drosophila* zu finden (Han et al., 1996; Kim et al., 2007a; Chintapalli et al., 2007; Draper et al., 2007; Selcho et al., 2009). Zusammen mit den hier erörterten Daten und dem Funktionsmodell von Berry und Kollegen ist der Schluss auf eine ähnliche Interferenz möglich und trägt dazu bei, dieses Modell weiterzuentwickeln (Abbildung 3.3, 3.5, 4.3, Berry et al., 2012).

Der Sekundäre Botenstoff cAMP ist ein elementarer Bestandteil der Gedächtnisbildung (Livingstone et al., 1984; Dudai et al., 1988; Zhong et al., 1992; Beavo & Brunton, 2002; Tomchik & Davis, 2009; Scheunemann et al., 2012; Ishimoto et al., 2013; Tomchik et al., 2013). Dabei scheint nicht nur die richtige Höhe des cAMP-Spiegels entscheidend, sondern auch seine zeitliche Regulation. Ein Hinweis darauf liefern die AC rut und die PDE dnc. Rut synthetisiert cAMP und bei der Mutante rut1 wird das labile Gedächtnis nicht ausgeprägt. Rut1 weist einen erniedrigten cAMP-Spiegel auf (Dudai, 1983; Scheunemann et al., 2012). Dnc degradiert cAMP und die Mutante dnc1 würde demnach über einen erhöhten cAMP-Spiegel verfügen. Dnc1 zeigt einen Ausfall der stabilen Gedächtnisphase (Dudai et al., 1976; Scheunemann et al., 2012). Dieser Logik folgend, sollte die Doppelmutante dnc1/rut1, welche über einen relativ normalen cAMP-Spiegel verfügt, ein normales Gedächtnis ausbilden. Dies ist jedoch nicht der Fall - die Doppelmutante zeigt einen kompletten Ausfall des Gedächtnisses, weder das labile noch das stabile Gedächtnis werden ausgeprägt (Scheunemann et al., 2012). Entscheidend für die normale Gedächtnisbildung ist demzufolge, dass der cAMP-Spiegel zu den richtigen Zeitpunkten erhöht oder gesenkt wird. Eine derartige zeitliche Regulation könnte über die Interferenz der DA-Rezeptoren erfolgen (Abbildung 4.3).



Abbildung 4.3: Modell der Interferenz der DA-Rezeptoren bei der Gedächtnisbildung. Dargestellt sind die Interferenzen zwischen dDA1, DAMB und D2R sowie ihre möglichen Funktionsweisen. A) Der CS führt zu einer Öffnung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in den PK-Neuronen, was eine Aktivierung des Ca<sup>2+</sup>/CAM-Signalweges und eine Stimulation der AC zur Folge hat. Der US wird durch das Ausschütten des Neurotransmitters DA aus den DANs in die PK übermittelt. Das führt zur die Aktivierung des Rezeptoren dDA1 und zur Stimulation der AC, welche nun vermehrt cAMP produziert. Die erhöhte cAMP-Produktion löst durch Koinzidenz des US und des CS die Gedächtnisbildung aus (Tomchik & Davis, 2009; Tomchik et al., 2013). B) Die anhaltende DA-Ausschüttung aktiviert auch DAMB, welcher wiederum das Vergessen des kürzlich angelegten labilen Gedächtnisses durch dDA1 begünstigt (Berry et al., 2012). D2R verhält sich dDA1 und DAMB gegenüber möglicherweise kompetitiv für den Liganden. Die Inhibierung durch den D2R-Rezeptor führt zu einer Senkung des cAMP-Spiegels. Er fördert dadurch die Konsolidierung des Gedächtnisses bzw. der stabilen Gedächtnisphase. Dieses Schema wurde in Anlehnung an das Modell von Berry und Kollegen erstellt (Berry et al., 2012). protocerebrales anteriomediales Cluster (PAM), protocerebrales posteriolaterales Cluster 1 (PPL1), protocerebrales posteriolaterales Cluster 2ab (PPL2ab), dopaminerger Neuronen (DANs), dorsal-paarig mediale Neurone (DPM), Adenylatzyklase (AC), unkonditionierten Stimulus (US), konditionierten Stimulus (CS)

Sowohl der dDA1 als auch der DAMB wirken stimulatorisch auf die AC, was zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP führt. Koinzident mit dem Ca<sup>2+</sup>-Influx durch den CS erfolgt dadurch die Gedächtnisbildung und anschließend

der DA-vermittelte Abbau des kürzlich angelegten Gedächtnisses (Abbildung 4.3A, Tomchik & Davis, 2009; Berry et al., 2012). Der Neurotransmitter DA regt auch den D2-ähnlichen D2R-Rezeptor an, welcher inhibitorisch auf dDA1 und DAMB wirkt und damit den intrazellulären cAMP-Spiegel reguliert. Dies ermöglicht eine Konsolidierung des Gedächtnisses, also die Bildung einer stabilen Gedächtnisphase (Abbildung 4.3B). Das Funktionsmodell zeigt, dass eine Dynamik im cAMP-Niveau in den PK-Neuronen existieren muss, um eine normale Gedächtnisakquise und dessen Konsolidierung zu gewährleisten. Es ist vorstellbar, dass sich D2R gegenüber dDA1 und DAMB kompetitiv verhält und die Rezeptoren unterschiedliche Bindeaffinitäten und Ligandenschwellwerte haben, ähnlich wie es bei den DA-Rezeptoren in Säugern bereits nachgewiesen ist (Missale et al., 1991; Lledo et al., 1992; Montmayeur et al., 1993; Guiramand et al., 1995). Dies würde zu einer stärkeren Inhibierung der nachgeschalteten Signalkaskaden der Rezeptoren dDA1 und DAMB führen und den cAMP-Spiegel senken. Der GPCR D2R reguliert den cAMP-Spiegel somit nicht durch ein direktes Wirken auf die AC, sondern vielmehr durch seinen Einfluss auf die D1-ähnlichen Rezeptoren. Um definitive Aussagen über die Manipulation des cAMP-Levels durch den D2R-Rezeptor machen zu können, ist es nötig, die cAMP-Konzentration in den verschiedenen Zuständen der Mutante D2RA zu messen. Hierzu würde sich z.B. die Nutzung eines FRET-Sensors empfehlen (Marosvögyi & Eilert, 2013). Mit dessen Hilfe ist es möglich, die Veränderung der cAMP-Konzentration in lebenden Zellen zu untersuchen (Shafer et al., 2008; Borner et al., 2011; Klarenbeek & Jalink, 2014).

Über eine Beteiligung von DA-Rezeptor-Oligomeren in der Gedächtnisbildung und/oder -konsilidierung bei *Drosophila* kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Denkbar wäre z.B. das Mitwirken von D1/D2-Heteromeren, die die Ausschüttung intrazellulären Ca<sup>2+</sup> triggern und so ebenfalls zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels beitragen können.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass der DA-Rezeptor D2R für die Konsolidierung des aversiven olfaktorischen Gedächtnisses essentiell ist. Die Analyse zeigte, dass inhibitorische Dopaminsignale spezifisch für die Konsolidierung des Gedächtnisses zuständig sind und dass eine neuronale Integration dieser Signale sehr komplex ist. Demnach sind in den Neuronenpopulationen verschiedene Isoformen an der dopaminergen postsynaptischen Antwort beteiligt, was zu einer differenzierten Funktion des D2R-Rezeptors führen kann. Weiterhin lässt sich durch die gezeigten Daten auf eine Koregulation mit den funktionell D1ähnlichen Rezeptoren schließen. Diese Koregulation gehört damit zu integrativen Mechanismen und steuert direkt die dynamischen Prozesse der Gedächtnisbildung und seines Abrufs. Weiterführende Untersuchungen können mittels der hier etablierten Deletionsmutante und des cDNA-Konstrukts einen tieferen Einblick in diese Mechanismen und die durch sie gesteuerten Gedächtnisprozesse geben.

# Literaturverzeichnis

- Aizman, O., Brismar, H., Uhlen, P., Zettergren, E., Levey, A. I., Forssberg, H., ... Aperia, A. (2000). Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci*, 3 (3), 226–230. doi: 10.1038/72929
- Akalal, D. B., Wilson, C. F., Zong, L., Tanaka, N. K., Ito, K. & Davis, R. L. (2006). Roles for Drosophila mushroom body neurons in olfactory learning and memory. *Learn Mem*, 13 (5), 659–668. doi: 10.1101/lm.221206
- Ang, R., Opel, A. & Tinker, A. (2012). The Role of Inhibitory G Proteins and Regulators of G Protein Signaling in the in vivo Control of Heart Rate and Predisposition to Cardiac Arrhythmias. *Front Physiol*, *3*, 96. doi: 10.3389/fphys.2012.00096
- Angers, S., Salahpour, A. & Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 409–435. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091701.082314
- Anton, S. & Homberg, U. (1999). *Antennal lobe structure. In Insect Olfaction.* Springer-Verlag Berlin.
- Ashraf, S. I., McLoon, A. L., Sclarsic, S. M. & Kunes, S. (2006). Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in Drosophila. *Cell*, 124 (1), 191–205. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.017
- Aso, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I. & Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult Drosophila characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet*, 23 (1-2), 156–172. doi: 10.1080/01677060802471718
- Aso, Y., Herb, A., Ogueta, M., Siwanowicz, I., Templier, T., Friedrich, A. B., ... Tanimoto, H. (2012). Three dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability. *PLoS Genet*, 8 (7), e1002768. doi: 10.1371/journal.pgen.1002768
- Aso, Y., Siwanowicz, I., Bräcker, L., Ito, K., Kitamoto, T. & Tanimoto, H. (2010). Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Curr Biol*, 20 (16), 1445–1451. doi: 10.1016/j.cub.2010.06.048

- Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., ... Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*, 513 (5), 532–541. doi: 10.1002/cne.21974
- Baik, J. H., Picetti, R., Saiardi, A., Thiriet, G., Dierich, A., Depaulis, A., ... Borrelli, E. (1995). Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature*, 377 (6548), 424–428. doi: 10.1038/377424a0
- Bailey, C. H., Bartsch, D. & Kandel, E. R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (24), 13445–13452.
- Bainton, R. J., Tsai, L. T., Singh, C. M., Moore, M. S., Neckameyer, W. S. & Heberlein,
  U. (2000). Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in Drosophila. *Curr Biol*, 10 (4), 187–194.
- Baker, A. K. (1968). Position-effect variegation.
- Baldwin, J. M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 6 (2), 180–190.
- Baldwin, J. M., Schertler, G. F. & Unger, V. M. (1997). An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. J Mol Biol, 272 (1), 144–164. doi: 10.1006/jmbi.1997.1240
- Beavo, J. A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*, 75 (4), 725–748.
- Beavo, J. A. & Brunton, L. L. (2002). Cyclic nucleotide research still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3* (9), 710–718. doi: 10.1038/nrm911
- Bellen, H. J., Levis, R. W., He, Y., Carlson, J. W., Evans-Holm, M., Bae, E., ... Spradling, A. C. (2011). The Drosophila gene disruption project: progress using transposons with distinctive site specificities. *Genetics*, 188 (3), 731– 743. doi: 10.1534/genetics.111.126995
- Berry, J. A., Cervantes-Sandoval, I., Nicholas, E. P. & Davis, R. L. (2012). Dopamine is required for learning and forgetting in Drosophila. *Neuron*, 74 (3), 530–542. doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.007
- Blenau, W. & Baumann, A. (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from Drosophila melanogaster and Apis mellifera. *Arch Insect Biochem Physiol*, 48 (1), 13–38. doi:

10.1002/arch.1055

- Blenau, W. & Baumann, A. (2003). Aminergic signal transduction in invertebrates: focus on tyramine and octopamine receptors. *Recent Research Developments in Neurochemistry*, 6. doi: 225-240.
- Borner, S., Schwede, F., Schlipp, A., Berisha, F., Calebiro, D., Lohse, M. J. & Nikolaev, V. O. (2011). FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nat Protoc*, 6 (4), 427–438. doi: 10.1038/nprot.2010.198
- Brand, A. H. & Dormand, E. L. (1995). The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the Drosophila nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 5 (5), 572–578.
- Brand, A. H. & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118 (2), 401–415.
- Bray, P., Carter, A., Guo, V., Puckett, C., Kamholz, J., Spiegel, A. & Nirenberg, M. (1987). Human cDNA clones for an alpha subunit of Gi signal-transduction protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (15), 5115–5119.
- Brody, T. & Cravchik, A. (2000). Drosophila melanogaster G protein-coupled receptors. *J Cell Biol*, 150 (2), F83–8.
- Burke, C. J., Huetteroth, W., Owald, D., Perisse, E., Krashes, M. J., Das, G., ...
  Waddell, S. (2012). Layered reward signalling through octopamine and dopamine in Drosophila. *Nature*, 492 (7429), 433–437. doi: 10.1038/nature11614
- Busto, G. U., Cervantes-Sandoval, I. & Davis, R. L. (2010). Olfactory learning in Drosophila. *Physiology (Bethesda)*, 25 (6), 338–346. doi: 10.1152/physiol.00026.2010
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S. R., ... Franco, R. (2003). Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem*, 278 (47), 46741–46749. doi: 10.1074/jbc.M306451200
- Cervantes-Sandoval, I., Martin-Pena, A., Berry, J. A. & Davis, R. L. (2013). Systemlike consolidation of olfactory memories in Drosophila. *J Neurosci*, 33 (23),

9846-9854. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0451-13.2013

- Chang, D. J., Lim, C. S., Lee, J. A. & Kaang, B. K. (2003). Synaptic facilitation by ectopic octopamine and 5-HT receptors in Aplysia. *Brain Res Bull*, 60 (1-2), 73–79.
- Chang, S. D. & Liang, K. C. (2012). Roles of hippocampal GABA(A) and muscarinic receptors in consolidation of context memory and context-shock association in contextual fear conditioning: a double dissociation study. *Neurobiol Learn Mem*, 98 (1), 17–24. doi: 10.1016/j.nlm.2012.04.004
- Chen, X., Ohta, H., Ozoe, F., Miyazawa, K., Huang, J. & Ozoe, Y. (2010). Functional and pharmacological characterization of a beta-adrenergic-like octopamine receptor from the silkworm Bombyx mori. *Insect Biochem Mol Biol*, 40 (6), 476–486. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.04.007
- Chintapalli, V. R., Wang, J. & Dow, J. A. (2007). Using FlyAtlas to identify better Drosophila melanogaster models of human disease. *Nat Genet*, 39 (6), 715– 720. doi: 10.1038/ng2049
- Connolly, J. B., Roberts, I. J., Armstrong, J. D., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T. & O'Kane, C. J. (1996). Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in Drosophila mushroom bodies. *Science*, 274 (5295), 2104–2107.
- Cook, R. K., Christensen, S. J., Deal, J. A., Coburn, R. A., Deal, M. E., Gresens, J. M., ... Cook, K. R. (2012). The generation of chromosomal deletions to provide extensive coverage and subdivision of the Drosophila melanogaster genome. *Genome Biol*, 13 (3), R21. doi: 10.1186/gb-2012-13-3-r21
- Cook Christensen, S., Cook, K., K. (2008). *Isolation and characterization of Df*(1)*BSC587*. Flybase.
- Costa, R. M., Federov, N. B., Kogan, J. H., Murphy, G. G., Stern, J., Ohno, M., ... Silva, A. J. (2002). Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature*, 415 (6871), 526–530. doi: 10.1038/nature711
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., ... al.,
  E. (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*, 367 (6462), 455–459. doi: 10.1038/367455a0

- Dal Toso, R., Sommer, B., Ewert, M., Herb, A., Pritchett, D. B., Bach, A., ... Seeburg,
  P. H. (1989). The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J*, *8* (13), 4025–4034.
- Daly, K. C., Christensen, T. A., Lei, H., Smith, B. H. & Hildebrand, J. G. (2004). Learning modulates the ensemble representations for odors in primary olfactory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (28), 10476–10481. doi: 10.1073/pnas.0401902101
- Das, A., Sen, S., Lichtneckert, R., Okada, R., Ito, K., Rodrigues, V. & Reichert, H. (2008). Drosophila olfactory local interneurons and projection neurons derive from a common neuroblast lineage specified by the empty spiracles gene. *Neural Dev*, *3*, 33. doi: 10.1186/1749-8104-3-33
- Davis, I., Francis-Lang, H. & Ish-Horowicz, D. (1993). Mechanisms of intracellular transcript localization and export in early Drosophila embryos. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 58, 793–798.
- Davis, R. L. (2004). Olfactory learning. *Neuron*, 44 (1), 31–48. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.008
- Davis, R. L. (2005). Olfactory memory formation in Drosophila: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci, 28, 275–302.* doi: 10.1146/annurev.neuro.28.061604.135651
- Day, J. P., Dow, J. A., Houslay, M. D. & Davies, S. A. (2005). Cyclic nucleotide phosphodiesterases in Drosophila melanogaster. *Biochem J*, 388 (Pt 1), 333– 342. doi: 10.1042/BJ20050057
- Delgado, R., Hidalgo, P., Diaz, F., Latorre, R. & Labarca, P. (1991). A cyclic AMPactivated K+ channel in Drosophila larval muscle is persistently activated in dunce. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88* (2), 557–560.
- Dewhurst, S. A., Croker, S. G., Ikeda, K. & McCaman, R. E. (1972). Metabolism of biogenic amines in Drosophila nervous tissue. *Comp Biochem Physiol B*, 43 (4), 975–981.
- Di Chiara, G. & Bassareo, V. (2007). Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol*, 7 (1), 69–76. doi: 10.1016/j.coph.2006.11.003
- Didelot, G., Molinari, F., Tchenio, P., Comas, D., Milhiet, E., Munnich, A., ...

Preat, T. (2006). Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in Drosophila. *Science*, *313* (5788), 851–853. doi: 10.1126/science.1127215

- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., ... Dickson, B. J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila. *Nature*, 448 (7150), 151–156. doi: 10.1038/nature05954
- Draper, I., Kurshan, P. T., McBride, E., Jackson, F. R. & Kopin, A. S. (2007). Locomotor activity is regulated by D2-like receptors in Drosophila: an anatomic and functional analysis. *Dev Neurobiol*, 67 (3), 378–393. doi: 10.1002/dneu.20355
- Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T. & Tully, T. (2001). Disruption of neurotransmission in Drosophila mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature*, 411 (6836), 476–480. doi: 10.1038/35078077
- Dudai, Y. (1983). Mutations affect storage and use of memory differentially in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *80* (17), 5445–5448.
- Dudai, Y., Corfas, G. & Hazvi, S. (1988). What is the possible contribution of Ca2+stimulated adenylate cyclase to acquisition, consolidation and retention of an associative olfactory memory in Drosophila. *J Comp Physiol A*, 162 (1), 101–109.
- Dudai, Y., Jan, Y. N., Byers, D., Quinn, W. G. & Benzer, S. (1976). dunce, a mutant of Drosophila deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73 (5), 1684–1688.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*, 34 (1-2), 1–15. doi: 10.1002/gene.10150
- Dutta, D., Bloor, J. W., Ruiz-Gomez, M., VijayRaghavan, K. & Kiehart, D. P. (2002). Real-time imaging of morphogenetic movements in Drosophila using Gal4-UAS-driven expression of GFP fused to the actin-binding domain of moesin. *Genesis*, 34 (1-2), 146–151. doi: 10.1002/gene.10113
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15 (2), 188–200.
- Emilien, G., Maloteaux, J. M., Geurts, M., Hoogenberg, K. & Cragg, S. (1999). Dopamine receptors–physiological understanding to therapeutic intervention

potential. Pharmacol Ther, 84 (2), 133-156.

- Evans, P. D., Bayliss, A. & Reale, V. (2014). GPCR-mediated rapid, non-genomic actions of steroids: Comparisons between DmDopEcR and GPER1 (GPR30). *Gen Comp Endocrinol*, 195, 157–163. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.10.015
- Faber, T., Joerges, J. & Menzel, R. (1999). Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat Neurosci*, 2 (1), 74–78. doi: 10.1038/4576
- Ferre, S., Ciruela, F., Canals, M., Marcellino, D., Burgueno, J., Casado, V., ... Woods, A. (2004). Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat Disord*, 10 (5), 265–271. doi: 10.1016/j.parkreldis.2004.02.014
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, 391 (6669), 806–811. doi: 10.1038/35888
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T. & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in Drosophila. *Nature*, 332 (6167), 853–856. doi: 10.1038/332853a0
- Flatt, T., Heyland, A., Rus, F., Porpiglia, E., Sherlock, C., Yamamoto, R., ... Silverman, N. (2008). Hormonal regulation of the humoral innate immune response in Drosophila melanogaster. *J Exp Biol*, 211 (Pt 16), 2712–2724. doi: 10.1242/jeb.014878
- Fowler, S. C., Zarcone, T. J., Vorontsova, E. & Chen, R. (2002). Motor and associative deficits in D2 dopamine receptor knockout mice. *Int J Dev Neurosci*, 20 (3-5), 309–321.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. & Schioth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63 (6), 1256–1272. doi: 10.1124/mol.63.6.1256
- Friggi-Grelin, F., Coulom, H., Meller, M., Gomez, D., Hirsh, J. & Birman, S. (2003).
  Targeted gene expression in Drosophila dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol*, 54 (4), 618–627. doi: 10.1002/neu.10185
- Fujishiro, H., Umegaki, H., Suzuki, Y., Oohara-Kurotani, S., Yamaguchi, Y. &

Iguchi, A. (2005). Dopamine D2 receptor plays a role in memory function: implications of dopamine-acetylcholine interaction in the ventral hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)*, *182* (2), 253–261. doi: 10.1007/s00213-005-0072-x

- Ge, X., Hannan, F., Xie, Z., Feng, C., Tully, T., Zhou, H., ... Zhong, Y. (2004). Notch signaling in Drosophila long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101* (27), 10172–10176. doi: 10.1073/pnas.0403497101
- George, S. R. & O'Dowd, B. F. (2007). A novel dopamine receptor signaling unit in brain: heterooligomers of D1 and D2 dopamine receptors. *ScientificWorld-Journal*, 7, 58–63. doi: 10.1100/tsw.2007.223
- George, S. R., O'Dowd, B. F. & Lee, S. P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 1 (10), 808–820. doi: 10.1038/nrd913
- Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M. P., Riou, J. F., Emorine, L. J. & Schwartz, J. C. (1989). Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature*, 342 (6252), 923–926. doi: 10.1038/342923a0
- Greer, C. L., Grygoruk, A., Patton, D. E., Ley, B., Romero-Calderon, R., Chang, H. Y., ... Krantz, D. E. (2005). A splice variant of the Drosophila vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. *J Neurobiol*, 64 (3), 239–258. doi: 10.1002/neu.20146
- Guiramand, J., Montmayeur, J. P., Ceraline, J., Bhatia, M. & Borrelli, E. (1995). Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J Biol Chem*, 270 (13), 7354–7358.
- Guo, A., Li, L., Xia, S. Z., Feng, C. H., Wolf, R. & Heisenberg, M. (1996). Conditioned visual flight orientation in Drosophila: dependence on age, practice, and diet. *Learn Mem*, 3 (1), 49–59.
- Han, K. A., Millar, N. S. & Davis, R. L. (1998). A novel octopamine receptor with preferential expression in Drosophila mushroom bodies. *J Neurosci*, *18* (10), 3650–3658.
- Han, K. A., Millar, N. S., Grotewiel, M. S. & Davis, R. L. (1996). DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in Drosophila mushroom bodies.

Neuron, 16 (6), 1127–1135.

- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418 (6894), 244–251. doi: 10.1038/418244a
- Hearn, M. G., Ren, Y., McBride, E. W., Reveillaud, I., Beinborn, M. & Kopin, A. S. (2002). A Drosophila dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (22), 14554–14559. doi: 10.1073/pnas.202498299
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci*, 4 (4), 266–275. doi: 10.1038/nrn1074
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A.,... Fuxe, K. (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem*, 277 (20), 18091–18097. doi: 10.1074/jbc.M107731200
- Holzapfel, B. & Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).
  Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37: 120–126.
  doi: doi: 10.1002/biuz.200610332
- Hu, A., Zhang, W. & Wang, Z. (2010). Functional feedback from mushroom bodies to antennal lobes in the Drosophila olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (22), 10262–10267. doi: 10.1073/pnas.0914912107
- Hummel, T. & Zipursky, S. L. (2004). Afferent induction of olfactory glomeruli requires N-cadherin. *Neuron*, 42 (1), 77–88.
- Isabel, G., Pascual, A. & Preat, T. (2004). Exclusive consolidated memory phases in Drosophila. *Science*, *304* (5673), 1024–1027. doi: 10.1126/science.1094932
- Ishimoto, H. & Kitamoto, T. (2010). The steroid molting hormone Ecdysone regulates sleep in adult Drosophila melanogaster. *Genetics*, 185 (1), 269–281. doi: 10.1534/genetics.110.114587
- Ishimoto, H., Sakai, T. & Kitamoto, T. (2009). Ecdysone signaling regulates the formation of long-term courtship memory in adult Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (15), 6381–6386. doi: 10.1073/pnas.0810213106
- Ishimoto, H., Wang, Z., Rao, Y., Wu, C. F. & Kitamoto, T. (2013). A novel role for ecdysone in Drosophila conditioned behavior: linking GPCR-mediated non-canonical steroid action to cAMP signaling in the adult brain. *PLoS*

Genet, 9 (10), e1003843. doi: 10.1371/journal.pgen.1003843

- Jackson, D. M. & Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther*, 64 (2), 291– 370.
- Jones, D. T. & Reed, R. R. (1987). Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium. *J Biol Chem*, 262 (29), 14241–14249.
- Kadzielawa, K. (1974). Dopamine receptor in the reward system of the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 209 (2), 214–226.
- Kasuya, J., Ishimoto, H. & Kitamoto, T. (2009). Neuronal mechanisms of learning and memory revealed by spatial and temporal suppression of neurotransmission using shibire, a temperature-sensitive dynamin mutant gene in Drosophila melanogaster. *Front Mol Neurosci*, 2, 11. doi: 10.3389/neuro.02.011.2009
- Keene, A. C., Krashes, M. J., Leung, B., Bernard, J. A. & Waddell, S. (2006). Drosophila dorsal paired medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Curr Biol*, *16* (15), 1524–1530. doi: 10.1016/j.cub.2006.06.022
- Keene, A. C. & Waddell, S. (2007). Drosophila olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat Rev Neurosci*, 8 (5), 341–354. doi: 10.1038/nrn2098
- Kenakin, T. (2004). Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 25 (4), 186–192. doi: 10.1016/j.tips.2004.02.012
- Khan, Z. U., Mrzljak, L., Gutierrez, A., de la Calle, A. & Goldman-Rakic, P. S. (1998). Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (13), 7731–7736.
- Kim, Y. C., Lee, H. G. & Han, K. A. (2007a). Classical reward conditioning in Drosophila melanogaster. *Genes Brain Behav*, 6 (2), 201–207. doi: 10.1111/j.1601-183X.2006.00241.x
- Kim, Y. C., Lee, H. G. & Han, K. A. (2007b). D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in Drosophila. *J Neurosci*, 27 (29), 7640–7647. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1167-07.2007

- Kim, Y. C., Lee, H. G., Seong, C. S. & Han, K. A. (2003). Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of Drosophila melanogaster. *Gene Expr Patterns*, 3 (2), 237–245.
- Klarenbeek, J. & Jalink, K. (2014). Detecting cAMP with an EPAC-based FRET sensor in single living cells. *Methods Mol Biol*, 1071, 49–58. doi: 10.1007/978-1-62703-622-1\_4
- Knapek, S., Gerber, B. & Tanimoto, H. (2010). Synapsin is selectively required for anesthesia-sensitive memory. *Learn Mem*, 17 (2), 76–79. doi: 10.1101/lm.1661810
- Knapek, S., Sigrist, S. & Tanimoto, H. (2011). Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. *J Neurosci*, 31 (9), 3453–3458. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2585-10.2011
- Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segraves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P. & Hogness, D. S. (1991). The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, 67 (1), 59–77.
- Krasel, C., Zabel, U., Lorenz, K., Reiner, S., Al-Sabah, S. & Lohse, M. J. (2008). Dual role of the beta2-adrenergic receptor C terminus for the binding of betaarrestin and receptor internalization. *J Biol Chem*, 283 (46), 31840–31848. doi: 10.1074/jbc.M806086200
- Krashes, M. J., Keene, A. C., Leung, B., Armstrong, J. D. & Waddell, S. (2007). Sequential use of mushroom body neuron subsets during drosophila odor memory processing. *Neuron*, 53 (1), 103–115. doi: 10.1016/j.neuron.2006.11.021
- Kuttenkeuler, D. & Boutros, M. (2004). Genome-wide RNAi as a route to gene function in Drosophila. *Brief Funct Genomic Proteomic*, *3* (2), 168–176.
- Lee, G., Kikuno, K., Bahn, J. H., Kim, K. M. & Park, J. H. (2013). Dopamine D2 receptor as a cellular component controlling nocturnal hyperactivities in Drosophila melanogaster. *Chronobiol Int*, 30 (4), 443–459. doi: 10.3109/07420528.2012.741169
- Lee, S. P., So, C. H., Rashid, A. J., Varghese, G., Cheng, R., Lanca, A. J., ... George, S. R. (2004). Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem*, 279 (34), 35671–35678. doi: 10.1074/jbc.M401923200

- Levin, L. R., Han, P. L., Hwang, P. M., Feinstein, P. G., Davis, R. L. & Reed, R. R. (1992). The Drosophila learning and memory gene rutabaga encodes a Ca2+/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell*, 68 (3), 479–489.
- Li, H., Chaney, S., Roberts, I. J., Forte, M. & Hirsh, J. (2000). Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in Drosophila melanogaster. *Curr Biol*, *10* (4), 211–214.
- Li, L., Qu, Y., Mao, M., Xiong, Y. & Mu, D. (2008). The involvement of phosphoinositid 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxiainducible factor-1alpha in the developing rat brain after hypoxia-ischemia. *Brain Res*, 1197, 152–158. doi: 10.1016/j.brainres.2007.12.059
- Linnet, J., Mouridsen, K., Peterson, E., Moller, A., Doudet, D. J. & Gjedde, A. (2012). Striatal dopamine release codes uncertainty in pathological gambling. *Psychiatry Res*, 204 (1), 55–60. doi: 10.1016/j.pscychresns.2012.04.012
- Liu, L., Wolf, R., Ernst, R. & Heisenberg, M. (1999). Context generalization in Drosophila visual learning requires the mushroom bodies. *Nature*, 400 (6746), 753–756. doi: 10.1038/23456
- Liu, X., Buchanan, M. E., Han, K. A. & Davis, R. L. (2009). The GABAA receptor RDL suppresses the conditioned stimulus pathway for olfactory learning. J Neurosci, 29 (5), 1573–1579. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4763-08.2009
- Liu, X., Krause, W. C. & Davis, R. L. (2007). GABAA receptor RDL inhibits Drosophila olfactory associative learning. *Neuron*, 56 (6), 1090–1102. doi: 10.1016/j.neuron.2007.10.036
- Livingstone, M. S., Sziber, P. P. & Quinn, W. G. (1984). Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a Drosophila learning mutant. *Cell*, *37* (1), 205–215.
- Lledo, P. M., Homburger, V., Bockaert, J. & Vincent, J. D. (1992). Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K+ and Ca2+ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron*, *8* (3), 455–463.
- Luttrell, L. M. (2008). Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol*, 39 (3), 239–264. doi: 10.1007/s12033-008-9031-1
- Maggio, R., Aloisi, G., Silvano, E., Rossi, M. & Millan, M. J. (2009). Heterodimeri-

zation of dopamine receptors: new insights into functional and therapeutic significance. *Parkinsonism Relat Disord*, *15 Suppl 4*, S2–7. doi: 10.1016/S1353-8020(09)70826-0

- Manseau, L., Baradaran, A., Brower, D., Budhu, A., Elefant, F., Phan, H.,... Selleck,
  S. (1997). GAL4 enhancer traps expressed in the embryo, larval brain, imaginal discs, and ovary of Drosophila. *Dev Dyn*, 209 (3), 310–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199707)209:3<310::AID-AJA6>3.0.CO;2-L
- Mao, Z. & Davis, R. L. (2009). Eight different types of dopaminergic neurons innervate the Drosophila mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front Neural Circuits*, *3*, 5. doi: 10.3389/neuro.04.005.2009
- Margulies, C., Tully, T. & Dubnau, J. (2005). Deconstructing memory in Drosophila. *Curr Biol*, 15 (17), R700–13. doi: 10.1016/j.cub.2005.08.024
- Marosvögyi, M. & Eilert, J. C. (2013). Messsung der intrazellulären cAMP-Konzentration mithilfe eines FRET-Sensors. *Biosprektrum*, 03.13.
- Masse, N. Y., Turner, G. C. & Jefferis, G. S. (2009). Olfactory information processing in Drosophila. *Curr Biol*, *19* (16), R700–13. doi: 10.1016/j.cub.2009.06.026
- McGaugh, J. L. (2000). Memory–a century of consolidation. *Science*, 287 (5451), 248–251.
- McGuire, S. E., Deshazer, M. & Davis, R. L. (2005). Thirty years of olfactory learning and memory research in Drosophila melanogaster. *Prog Neurobiol*, 76 (5), 328–347. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.09.003
- Menzel, R. & Muller, U. (1996). Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. Annu Rev Neurosci, 19, 379–404. doi: 10.1146/annurev.ne.19.030196.002115
- Milner, B., Squire, L. R. & Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20 (3), 445–468.
- Missale, C., Boroni, F., Castelletti, L., Dal Toso, R., Gabellini, N., Sigala, S. & Spano,
  P. (1991). Lack of coupling of D-2 receptors to adenylate cyclase in GH-3 cells exposed to epidermal growth factor. Possible role of a differential expression of Gi protein subtypes. J Biol Chem, 266 (34), 23392–23398.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78 (1), 189–225.

- Monastirioti, M. (1999). Biogenic amine systems in the fruit fly Drosophila melanogaster. *Microsc Res Tech*, 45 (2), 106–121. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19990415)45:2<106::AID-JEMT5>3.0.CO;2-3
- Monsma Jr., F. J., McVittie, L. D., Gerfen, C. R., Mahan, L. C. & Sibley, D. R. (1989). Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature*, 342 (6252), 926–929. doi: 10.1038/342926a0
- Montmayeur, J. P., Bausero, P., Amlaiky, N., Maroteaux, L., Hen, R. & Borrelli, E. (1991). Differential expression of the mouse D2 dopamine receptor isoforms. *FEBS Lett*, 278 (2), 239–243.
- Montmayeur, J. P., Guiramand, J. & Borrelli, E. (1993). Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins. *Mol Endocrinol*, 7 (2), 161– 170. doi: 10.1210/mend.7.2.7682286
- Montminy, M. R., Gonzalez, G. A. & Yamamoto, K. K. (1990). Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci*, *13* (5), 184–188.
- Mustard, J. A., Beggs, K. T. & Mercer, A. R. (2005). Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Arch Insect Biochem Physiol*, 59 (3), 103– 117. doi: 10.1002/arch.20065
- Nassel, D. R. (2002). Neuropeptides in the nervous system of Drosophila and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog Neurobiol*, *68* (1), 1–84.
- Neckameyer, W. S. & Bhatt, P. (2012). Neurotrophic actions of dopamine on the development of a serotonergic feeding circuit in Drosophila melanogaster. *BMC Neurosci*, 13, 26. doi: 10.1186/1471-2202-13-26
- Ni, J. Q., Liu, L. P., Binari, R., Hardy, R., Shim, H. S., Cavallaro, A., ... Perrimon, N. (2009). A Drosophila resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics. *Genetics*, 182 (4), 1089–1100. doi: 10.1534/genetics.109.103630
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., ... Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289 (5480), 739–745.
- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K.,... Francis-Lang, H. L. (2004). Systematic generation of high-resolutiondeletion coverage of the Drosophila melanogaster genome. *Nat Genet*, 36

(3), 288–292. doi: 10.1038/ng1312

Pavlov, I. P. (1951). [Conditioned reflex]. Feldsher Akush, 10, 3–10; contd.

- Pawson, T. & Nash, P. (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev*, 14 (9), 1027–1047.
- Pfaffl, M. W. (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*.
- Picetti, R., Saiardi, A., Abdel Samad, T., Bozzi, Y., Baik, J. H. & Borrelli, E. (1997). Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. *Crit Rev Neurobiol*, 11 (2-3), 121–142.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3* (9), 639–650. doi: 10.1038/nrm908
- Pitman, J. L., Huetteroth, W., Burke, C. J., Krashes, M. J., Lai, S. L., Lee, T. & Waddell, S. (2011). A pair of inhibitory neurons are required to sustain labile memory in the Drosophila mushroom body. *Curr Biol*, 21 (10), 855– 861. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.069
- Plaçais, P. Y., Trannoy, S., Isabel, G., Aso, Y., Siwanowicz, I., Belliart-Guérin, G., ...
  Preat, T. (2012). Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate
  long-term memory formation in Drosophila. *Nat Neurosci*, 15 (4), 592–599.
  doi: 10.1038/nn.3055
- Prinster, S. C., Hague, C. & Hall, R. A. (2005). Heterodimerization of g proteincoupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev*, 57 (3), 289–298. doi: 10.1124/pr.57.3.1
- Qin, H., Cressy, M., Li, W., Coravos, J. S., Izzi, S. A. & Dubnau, J. (2012). Gamma neurons mediate dopaminergic input during aversive olfactory memory formation in Drosophila. *Curr Biol*, 22 (7), 608–614. doi: 10.1016/j.cub.2012.02.014
- Quinn, W. G. & Dudai, Y. (1976). Memory phases in Drosophila. *Nature*, 262 (5569), 576–577.
- Quinn, W. G., Harris, W. A. & Benzer, S. (1974). Conditioned behavior in Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71 (3), 708–712.
- Rashid, A. J., So, C. H., Kong, M. M., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., ... George, S. R. (2007). D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique

pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104* (2), 654–659. doi: 10.1073/pnas.0604049104

- Reale, V., Hannan, F., Hall, L. M. & Evans, P. D. (1997). Agonist-specific coupling of a cloned Drosophila melanogaster D1-like dopamine receptor to multiple second messenger pathways by synthetic agonists. *J Neurosci*, 17 (17), 6545– 6553.
- Reiner, S., Ziegler, N., Leon, C., Lorenz, K., von Hayn, K., Gachet, C., ... Hoffmann,
  C. (2009). beta-Arrestin-2 interaction and internalization of the human P2Y1
  receptor are dependent on C-terminal phosphorylation sites. *Mol Pharmacol*,
  76 (6), 1162–1171. doi: 10.1124/mol.109.060467
- Riddiford, L. M. (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor*, *3* (3), 203–209.
- Riddiford, L. M., Cherbas, P. & Truman, J. W. (2000). Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam Horm*, *60*, 1–73.
- Riemensperger, T., Issa, A. R., Pech, U., Coulom, H., Nguyen, M. V., Cassar, M.,
  ... Birman, S. (2013). A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a Drosophila model of Parkinson disease. *Cell Rep*, 5 (4), 952–960. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.032
- Roman, G. & Davis, R. L. (2001). Molecular biology and anatomy of Drosophila olfactory associative learning. *Bioessays*, 23 (7), 571–581. doi: 10.1002/bies.1083
- Romero-Calderón, R., Shome, R. M., Simon, A. F., Daniels, R. W., DiAntonio, A. & Krantz, D. E. (2007). A screen for neurotransmitter transporters expressed in the visual system of Drosophila melanogaster identifies three novel genes. *Dev Neurobiol*, 67 (5), 550–569. doi: 10.1002/dneu.20342
- Romero-Calderón, R., Uhlenbrock, G., Borycz, J., Simon, A. F., Grygoruk, A., Yee,
  S. K., ... Krantz, D. E. (2008). A glial variant of the vesicular monoamine transporter is required to store histamine in the Drosophila visual system. *PLoS Genet*, 4 (11), e1000245. doi: 10.1371/journal.pgen.1000245
- Routtenberg, A. (1978). The reward system of the brain. Sci Am, 239 (5), 154–164.
- Rubinstein, M., Gershanik, O. & Stefano, F. J. (1988). Postsynaptic bimodal effect of sulpiride on locomotor activity induced by pergolide in catecholamine-

depleted mice. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 337 (1), 115–117.

SABiosciences. (2008). Real-Time PCR for Systems Biology: A Review on Real-Time PCR-Related Technologies & Their Applications in the Post-Genomic Era. *SABiosciences*.

- Scarselli, M., Novi, F., Schallmach, E., Lin, R., Baragli, A., Colzi, A., ... Maggio, R. (2001). D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem*, 276 (32), 30308–30314. doi: 10.1074/jbc.M102297200
- Schafer, S., Rosenboom, H. & Menzel, R. (1994). Ionic currents of Kenyon cells from the mushroom body of the honeybee. *J Neurosci*, *14* (8), 4600–4612.
- Scheunemann, L., Jost, E., Richlitzki, A., Day, J. P., Sebastian, S., Thum, A. S., ... Schwärzel, M. (2012). Consolidated and labile odor memory are separately encoded within the Drosophila brain. *J Neurosci*, 32 (48), 17163–17171. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3286-12.2012
- Schwaerzel, M., Heisenberg, M. & Zars, T. (2002). Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron*, *35* (5), 951–960.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S. & Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in Drosophila. *J Neurosci*, 23 (33), 10495–10502.
- Seeman, P., Nam, D., Ulpian, C., Liu, I. S. & Tallerico, T. (2000). New dopamine receptor, D2(Longer), with unique TG splice site, in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 76 (1), 132–141.
- Selcho, M., Pauls, D., Han, K. A., Stocker, R. F. & Thum, A. S. (2009). The role of dopamine in Drosophila larval classical olfactory conditioning. *PLoS One*, 4 (6), e5897. doi: 10.1371/journal.pone.0005897
- Senogles, S. E., Spiegel, A. M., Padrell, E., Iyengar, R. & Caron, M. G. (1990). Specificity of receptor-G protein interactions. Discrimination of Gi subtypes by the D2 dopamine receptor in a reconstituted system. *J Biol Chem*, 265 (8), 4507–4514.
- Shafer, O. T., Kim, D. J., Dunbar-Yaffe, R., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J. & Taghert,P. H. (2008). Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of Drosophila revealed by real-time cyclic

AMP imaging. Neuron, 58 (2), 223–237. doi: 10.1016/j.neuron.2008.02.018

- Simon, A. F., Shih, C., Mack, A. & Benzer, S. (2003). Steroid control of longevity in Drosophila melanogaster. *Science*, 299 (5611), 1407–1410. doi: 10.1126/science.1080539
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. & Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, 252 (5007), 802–808.
- Skinner, B. F. (1955). The control of human behavior. *Trans N Y Acad Sci*, 17 (7), 547–551.
- Skinner, B. F. (1988). Preface to the behavior of organisms. *J Exp Anal Behav*, 50 (2), 355–358.
- So, C. H., Varghese, G., Curley, K. J., Kong, M. M., Alijaniaram, M., Ji, X., ... George, S. R. (2005). D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. *Mol Pharmacol*, 68 (3), 568–578. doi: 10.1124/mol.105.012229
- Sozen, M. A., Armstrong, J. D., Yang, M., Kaiser, K. & Dow, J. A. (1997). Functional domains are specified to single-cell resolution in a Drosophila epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (10), 5207–5212.
- Spiegel, A. M., Shenker, A. & Weinstein, L. S. (1992). Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocr Rev*, 13 (3), 536–565. doi: 10.1210/edrv-13-3-536
- Srivastava, D. P., Yu, E. J., Kennedy, K., Chatwin, H., Reale, V., Hamon, M., ... Evans, P. D. (2005). Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel Drosophila G-protein-coupled receptor. *J Neurosci*, 25 (26), 6145–6155. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1005-05.2005
- St Pierre, S. E., Ponting, L., Stefancsik, R., McQuilton, P. & FlyBase, C. (2014). FlyBase 102–advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res*, 42 (1), D780–D788.
- Stocker, R. F., Heimbeck, G., Gendre, N. & de Belle, J. S. (1997). Neuroblast ablation in Drosophila P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons. J Neurobiol, 32 (5), 443–456.
- Stoof, J. C. & Kebabian, J. W. (1981). Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature*, 294 (5839),

366–368.

- Sugamori, K. S., Demchyshyn, L. L., McConkey, F., Forte, M. A. & Niznik, H. B. (1995). A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase-linked receptor from Drosophila melanogaster displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS Lett*, 362 (2), 131–138.
- Surmeier, D. J., Song, W. J. & Yan, Z. (1996). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. J Neurosci, 16 (20), 6579– 6591.
- Szafran, K., Lukasiewicz, S., Faron-Gorecka, A., Kolasa, M., Kusmider, M., Solich, J. & Dziedzicka-Wasylewska, M. (2012). Antidepressant drugs promote the heterodimerization of the dopamine D2 and somatostatin Sst5 receptors– fluorescence in vitro studies. *Pharmacol Rep*, 64 (5), 1253–1258.
- Tabara, H., Grishok, A. & Mello, C. C. (1998). RNAi in C. elegans: soaking in the genome sequence. *Science*, 282 (5388), 430–431.
- Tanaka, N. K., Awasaki, T., Shimada, T. & Ito, K. (2004). Integration of chemosensory pathways in the Drosophila second-order olfactory centers. *Curr Biol*, 14 (6), 449–457. doi: 10.1016/j.cub.2004.03.006
- Tanaka, N. K., Endo, K. & Ito, K. (2012). Organization of antennal lobe-associated neurons in adult Drosophila melanogaster brain. *J Comp Neurol*, 520 (18), 4067–4130. doi: 10.1002/cne.23142
- Tanaka, N. K., Tanimoto, H. & Ito, K. (2008). Neuronal assemblies of the Drosophila mushroom body. *J Comp Neurol*, 508 (5), 711–755. doi: 10.1002/cne.21692
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., ... Margolis, J. (2004). A complementary transposon tool kit for Drosophila melanogaster using P and piggyBac. *Nat Genet*, *36* (3), 283–287. doi: 10.1038/ng1314
- Thummel, C. S. (1996). Flies on steroids–Drosophila metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet*, *12* (8), 306–310.
- Tomchik, S. M. & Davis, R. L. (2009). Dynamics of learning-related cAMP signaling and stimulus integration in the Drosophila olfactory pathway. *Neuron*, 64 (4), 510–521. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.029
- Tomchik, S. M., Davis, R. L., Menzel, R. & Benjamin, P. R. (2013). "Drosophila
Memory Research Through Four Eras: Genetic, Molecular Biology, Neuroanatomy, and Systems Neuroscience. In Invertebrate Learning and Memory (Bd. 22.; J. P. Huston, Hrsg.). Academic Press (San Diego): Elsevier Science.

- Truman, J. W. & Riddiford, L. M. (2002). Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annu Rev Entomol*, 47, 467–500. doi: 10.1146/annurev.ento.47.091201.145230
- Tully, T., Bolwig, G., Christensen, J., Connolly, J., DeZazzo, J., Dubnau, J., ... Velinzon, K. (1996). Genetic dissection of memory in Drosophila. *J Physiol Paris*, 90 (5-6), 383.
- Tully, T., Bourtchouladze, R., Scott, R. & Tallman, J. (2003). Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nat Rev Drug Discov*, 2 (4), 267–277. doi: 10.1038/nrd1061
- Tully, T. & Quinn, W. G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant Drosophila melanogaster. *J Comp Physiol A*, 157 (2), 263–277.
- Usiello, A., Baik, J. H., Rouge-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., ... Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 408 (6809), 199–203. doi: 10.1038/35041572
- Valdenaire, O. & Vernier, P. (1997). G protein coupled receptors as modules of interacting proteins: a family meeting. *Prog Drug Res*, 49, 173–218.
- Vallone, D., Picetti, R. & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, 24 (1), 125–132.
- Vernier, P., Cardinaud, B., Valdenaire, O., Philippe, H. & Vincent, J. D. (1995). An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *Trends Pharmacol Sci*, 16 (11), 375–381.
- Vosshall, L. B. & Stocker, R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in Drosophila. *Annu Rev Neurosci, 30*, 505–533. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094306
- Waddell, S. (2010). Dopamine reveals neural circuit mechanisms of fly memory. *Trends Neurosci*, 33 (10), 457–464. doi: 10.1016/j.tins.2010.07.001
- Waddell, S. (2013). Reinforcement signalling in Drosophila; dopamine does it all after all. *Curr Opin Neurobiol*, 23 (3), 324–329. doi: 10.1016/j.conb.2013.01.005
- Waddell, S. & Quinn, W. G. (2001). What can we teach Drosophila? What can

they teach us? Trends Genet, 17 (12), 719–726.

- Waddington, J. L. & Deveney, A. M. (1996). Dopamine receptor multiplicity: "D1like'-"D2-like' interactions and "D1-like"receptors not linked to adenylate cyclase. *Biochem Soc Trans*, 24 (1), 177–182.
- Weinberger, N. M. (2004). Specific long-term memory traces in primary auditory cortex. *Nat Rev Neurosci*, 5 (4), 279–290. doi: 10.1038/nrn1366
- Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J*, 11 (5), 346–354.
- Xing, B., Guo, J., Meng, X., Wei, S. G. & Li, S. B. (2012). The dopamine D1 but not D3 receptor plays a fundamental role in spatial working memory and BDNF expression in prefrontal cortex of mice. *Behav Brain Res*, 235 (1), 36–41. doi: 10.1016/j.bbr.2012.06.035
- Yamazaki, D., Horiuchi, J., Miyashita, T. & Saitoe, M. (2010). Acute inhibition of PKA activity at old ages ameliorates age-related memory impairment in Drosophila. *J Neurosci*, 30 (46), 15573–15577. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3229-10.2010
- Yang, M. Y., Armstrong, J. D., Vilinsky, I., Strausfeld, N. J. & Kaiser, K. (1995). Subdivision of the Drosophila mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. *Neuron*, 15 (1), 45–54.
- Yang, Y., Graze, R. M., Walts, B. M., Lopez, C. M., Baker, H. V., Wayne, M. L., ... McIntyre, L. M. (2011). Partitioning transcript variation in Drosophila: abundance, isoforms, and alleles. *G3* (*Bethesda*), 1 (6), 427–436. doi: 10.1534/g3.111.000596
- Yin, J. C., Wallach, J. S., Del Vecchio, M., Wilder, E. L., Zhou, H., Quinn, W. G. & Tully, T. (1994). Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila. *Cell*, 79 (1), 49–58.
- Young, J. M. & Armstrong, J. D. (2010). Structure of the adult central complex in Drosophila: organization of distinct neuronal subsets. *J Comp Neurol*, 518 (9), 1500–1524. doi: 10.1002/cne.22284
- Yu, D., Keene, A. C., Srivatsan, A., Waddell, S. & Davis, R. L. (2005). Drosophila DPM neurons form a delayed and branch-specific memory

trace after olfactory classical conditioning. *Cell*, 123 (5), 945–957. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.037

- Yu, D., Ponomarev, A. & Davis, R. L. (2004). Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning; memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron*, 42 (3), 437–449.
- Zars, T. (2000). Behavioral functions of the insect mushroom bodies. *Curr Opin Neurobiol*, *10* (6), 790–795.
- Zars, T. (2010). Short-term memories in Drosophila are governed by general and specific genetic systems. *Learn Mem*, *17* (5), 246–251. doi: 10.1101/lm.1706110
- Zhong, Y., Budnik, V. & Wu, C. F. (1992). Synaptic plasticity in Drosophila memory and hyperexcitable mutants: role of cAMP cascade. *J Neurosci*, 12 (2), 644–651.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	GAL4/UAS-System	3
1.2	Schematische Darstellung eines RNAi-Knockdown bei Drosophila .	5
1.3	FRT-FLP-Rekombination	7
1.4	Schema des aversiven olfaktorischen Lernparadigma	10
1.5	Gedächtnisphasen von Drosophila melanogaster	11
1.6	Übersicht über die dopaminerge Innervierung und die olfaktori-	
	sche Transduktion im adulten Gehirn bei Drosophila	14
1.7	Schematische Darstellung der cAMP-Signaltransduktion und ihrer	
	Bedeutung bei der Gedächtnisbildung	16
1.8	Schematische Darstellung eines GPCR	21
1.9	Klassifizierung der Dopaminrezeptoren bei Drosophila melanogaster	24
2.1	Exemplarisches genetisches Kreuzungsschema für eine FLP-FRT-	
	basierte Deletion des D2R Rezeptors	29
2.2	Schematische Darstellung der Two-sided-PCR	31
3.1	Genlokus des DA-Rezeptors D2R	37
3.2	Two-sided-PCR zur Verifizierung einer Deletion	38
3.3	Olfaktorische Phänotypisierung der Rezeptormutanten D2R $\Delta 1$	
	und D2R $\Delta 2$	39
3.4	Komplementationstest zum Nachweis der Spezifität der Mutante	
	$D2R \Delta 1 und \Delta 2 \dots \dots$	41
3.5	Reduktion der stabilen Gedächtnisphase im 5 min Gedächtnis	43
3.6	Einordnung des D2R-Rezeptors in den cAMP-Signalweg	45
3.7	RNAi-Knockdown des D2R führt zur gleichen Gedächtnisredukti-	
	on wie die D2R-Mutante	47
3.8	cDNA Rettung von D2R $\Delta 1$	49
3.9	Akute Expression von D2R in adulten Fliegen	51
3.10	Lokalisation notwendiger Strukturen für D2R im Pilzkörper mittels	

3.11	Lokalisation hinreichender Strukturen für D2R im Pilzkörper	
	mittels cDNA-Konstrukt	55
3.12	Lokalisation notwendiger Strukturen für D2R in der olfaktorischen	
	Signaltransduktion mittels RNAi-Knockdown	57
3.13	Lokalisation hinreichender Strukturen für D2R in der olfaktori-	
	schen Signaltransduktion mittels cDNA-Konstrukt	59
4.1	Vergleich notwendiger und hinreichender Strukturen für D2R im	
	adulten Gehirn	64
4.2	Isoformen des D2R-Rezeptorsproteins	70
4.3	Modell der Interferenz der DA-Rezeptoren bei der Gedächtnisbildung	77

## Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Transposons	29
2.2	Verwendete Primer	32
Ι	Verwendete Fliegenstämme	108

# Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3'untranslatierte Region
5'UTR	5'untranslatierte Region
aa	Aminosäuren
AC	Adenylatzyklase
ACh	Acetylcholin
ACT	Antennal Cerebral Tract
AL	Antennallobus
APLs	anterior-paarig lateralen Neurone
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
CAM	Calmodulin
CaMK	Calmodulin abhängigen Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophospat
CS	konditionierten Stimulus
d.h.	das heißt
DA	Dopamin
DANs	dopaminerger Neuronen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dnc	dunce
DPM	dorsal-paarig mediale Neurone
dsRNA	doppelsträngige RNA
EL	extrazelluläre Schleifen
F	Forward-Primer
GDP	Guanindiphosphat
GFP	fluoreszierendes Protein
GP	genomischen Primer
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GP-F	genomischen Primer-Forward
GP-R	genomischen Primer-Reverse
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein

Guaninnucleotid-bindenden Proteins		
Guanintriphosphat		
innerer antenno-cerebraler Trakt		
intrazelluläre Schleifen		
Invertebraten Dopamin-Rezeptoren		
Kilobasenpaaren		
Kenyonzellen		
Laterales Horn		
Lokalen Neuronen 1		
Lokalen Neuronen 2L		
Lokalen Neuronen 2V		
lokalen Interneuronen		
Langzeitgedächtnis /Long-Term-Memory		
medialer antenno-cerebraler Trakt		
4-Methylcyclohexanol		
messenger RNA		
Mittelzeitgedächtnis /Mid-Term-Memory		
Nebula		
3-Octanol		
Olfaktorischen Rezeptorneurone		
protocerebrales anteriomediales Cluster		
Polymerasekettenreaktion		
Phosphodiesterase		
Performanz Index		
Phosphoinositid-3-Kinase		
Pilzkörper		
Protein Kinase A		
Projektionsneuronen		
protocerebrales posteriolaterales Cluster 1		
protocerebrales posteriolaterales Cluster 2ab		
Protein-Phosphotase		
Pertussis Toxin		

R	Reverse-Primer		
RNAi	RNA Interferenz		
rut	rutabaga		
Sb	Stubble/Stoppelborsten		
SEM	Standardfehler des Mittelwerts		
siRNA	small interfering RNA		
STM	Kurzzeitgedächtnis /Short-Term-Memory		
ТМ	Transmembrandomänen		
UAS	Upstream Activating Sequenz		
US	unkonditionierten Stimulus		
VDRC	Vienna Drosophila Research Center		
Vol	Volado		
z.B.	zum Beispiel		
ZK	Zentralkomplex		

## Anhang

# **Tabelle I: Verwendete Fliegenstämme von** *Drosophila melanogaster*. Angegeben wurden die Genotypen, die Referenzen, die Definition bzw. die Expressionen.

Name	Genotyp	Definition	Referenz
W1118	w;+;+	white-Mutante im wildtypischen Hintergrund	AG Sigrist, Baker, 1968
mb247	w;+;mb247	GAL4-Treiber, Expression in den PK	AG Schwärzel, Connolly et al., 1996; Zars, 2000; Aso et al., 2009
17d	w;17d;+	GAL4-Treiber, Expression in den $\alpha/\beta$ -Loben	AG Schwärzel, M. Y. Yang et al., 1995; L. Liu et al., 1999; Aso et al., 2009
189y	w;+;189y	GAL4-Treiber, Expression in den $\alpha/\beta$ -Loben	AG Schwärzel, Aso et al., 2009
GH146	w;GH146;+	GAL4-Treiber, Expression in den PNs und den APLs	AG Schwärzel, Stocker et al., 1997; Tanaka et al., 2004; Pitman et al., 2011

Name	Genotyp	Definition	Referenz
GH146;	w;GH146;	GAL4-Treiber in	AG Schwärzel,
ChaGAL80	ChaGAL80	Kombination mit	Tanaka et al., 2004;
		dem GAL4-	Pitman et al., 2011
		Inhibitor GAL80,	
		Expression in den	
		PNs	
NP225	w;NP225;+	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression in den	Stocker et al., 1997;
		APLs	Tanaka et al., 2004;
			Pitman et al., 2011
NP2631	w;NP2631;+	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression in den	Pitman et al., 2011
		APLs	
H24	w;+;H24	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel, Aso
		Expression im AL	et al., 2009
		und den $\gamma$ -Loben	
NP1131	w;NP1131;+	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression in den	M. Y. Yang et al.,
		γ-Loben	1995; Tanaka et al.,
			2008; Aso et al.,
			2009
c320	w;c320;+	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression in den	Krashes et al., 2007;
		$\alpha'/\beta'$ -Loben	Aso et al., 2009
c305a	w;c305a;+	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression in den	Krashes et al., 2007;
		$\alpha'/\beta'$ -Loben	Aso et al., 2009

Tabelle I – *weitergeführt* 

Name	Genotyp	Definition	Referenz
mb247,	w;+;mb247,GH298	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel, Aso
GH298		Expression in den	et al., 2009
		PK und im AL	
GH298	w;+;GH298	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression im AL	Stocker et al., 1997;
			Das et al., 2008
NP1227	w,y;NP1227/CyO;+	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression im AL	Stocker et al., 1997;
			Das et al., 2008
NP2426	NP2426;+;+	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression im AL	Tanaka et al., 2012
OK107	w;+;+;OK107	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression in den	Connolly et al.,
		PK und im AL	1996; Aso et al.,
			2009
OR83b	w;OR83b;+	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression in den	Vosshall & Stocker,
		ORNs	2007
c232	w;c232;+	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel,
		Expression im ZK	Sozen et al., 1997;
			Young &
			Armstrong, 2010
TH	w;+;TH	GAL4-Treiber,	AG Brembs,
		Expression im	Friggi-Grelin et al.,
		DANs	2003; Draper et al.,
			2007

Tabelle I – *weitergeführt* 

Name	Genotyp	Definition	Referenz
mb247,	w;+;mb247,	GAL4-Treiber,	AG Schwärzel
GAL80 <sup>ts</sup>	GAL80 <sup>ts</sup>	Expression in den	
		PK unter Kontrolle	
		des Repressors	
		GAL80 <sup>ts</sup>	
f02905	PBacWHf02905;+;+	FRT-Motiv-	Exelixes at Harvard
		tragendes	Medical School,
		P-Element im	Thibault et al., 2004;
		Bereich des	Bellen et al., 2011
		D2R-Genlokus	
f06521	PBacWHf06521;+;+	FRT-Motiv-	Exelixes at Harvard
		tragendes	Medical School,
		P-Element im	Thibault et al., 2004;
		Bereich des	Bellen et al., 2011
		D2R-Genlokus	
f02891	PBacWHf02891;+;+	FRT-Motiv-	Exelixes at Harvard
		tragendes	Medical School,
		P-Element im	Thibault et al., 2004;
		Bereich des	Bellen et al., 2011
		D2R-Genlokus	
D2R Δ1	D2R Δ1;+;+	Deletionsmutante	AG Schwärzel,
		des	unpubliziert
		Dopaminrezeptors	
		D2R	
D2R $\Delta 2$	D2R Δ2;+;+	Deletionsmutante	AG Schwärzel,
		des	unpubliziert
		Dopaminrezeptors	
		D2R	

Tabelle I – *weitergeführt* 

Name	Genotyp	Definition	Referenz
Df(1)	Df(1)BSC587/	partielle Defizienz	Bloomingtion
BCS847	Binsinscy;+;+	im D2R-Genlokus	Drosophila Stock
			Center, Cook
			Christensen, S.,
			Cook, K., 2008;
			Cook et al., 2012
hsFLP III	w;+;hsFLP, Sb/	Hitzeschock-	Bloomingtion
	TM <sub>6</sub> , Tb	regulierte	Drosophila Stock
		Rekombinase für	Center, Parks et al.,
		D2R-Deletion	2004
FM7a	FM7a;+,+	Balancer auf dem	Bloomingtion
		X-Chromosom	Drosophila Stock
			Center
MKRS/TM <sub>2</sub> ,	w;+;MKRS/TM <sub>2</sub> ,	Balancer auf dem 3.	Bloomingtion
Ubx, e	Ubx, e	Chromosom	Drosophila Stock
			Center

Tabelle I – *weitergeführt* 

#### Publikationsverzeichnis

Scholz-Kornehl, S., Scholz, H., Schwärzel,M.: The Dopamine 2 Receptor supports consolidated ARM at the Kenyon Cell layer. In Arbeit.

Damrau, C., Toshima, N., <u>Scholz-Kornehl, S.</u>, Schwärzel, M., Tanimura, T., **Brembs, B.**, **Colomb**, J.: Specific dominance of the Drosophila tßh gene in different behavioral tasks. In Arbeit.

Andlauer, T.F.M., <u>Scholz-Kornehl, S.</u>, Tian R., Kirchner M.L., Babikir H.A., Depner H., Loll B., Quentin C., Holt, M.G., Gupta, V.K., Dipt S., Cressy M., Wahl, M., Fiala A., Selbach M., Schwärzel M., Sigrist S.J.: Drep-2 is a novel synaptic protein important for learning and memory. eLife 2014; Im Print.

Volders, K., <u>Scholz, S.</u>, Slabbaert, J. R., Nagel, A. C., Verstreken, P., Creemers, J. W., . . . Schwärzel, M. (2012).: Drosophila rugose is a functional homolog of mammalian Neurobeachin and affects synaptic architecture, brain morphology, and associative learning. J Neurosci, 32 (43), 15193–15204.

**Joppich, C.,** <u>Scholz, S.,</u> Korge, G., Schwendemann, A. (2009).: Umbrea, a chromo shadow domain protein in Drosophila melanogaster heterochromatin, interacts with Hip, HP1 and HOAP. Chromosome Res, 17 (1), 19–36.

#### Danksagung

Ich danke Dr. Martin Schwärzel und Dr. Stephan Sigrist für ihre Unterstützung und die Möglichkeit meine Dissertation bei ihnen anfertigen zu können.

Ich danke auch Lisa Scheunemann, Antje Richlitzki, Tanja Matkovic und Christine Damrau für die vielen Gespräche, die nicht immer fachlicher Natur waren, die wertvollen Tipps und die immer offenen Ohren.

Ich danke weiterhin Heidi Leßmann für die unzähligen Liter Futter und die abertausenden Gläser.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die oft zurückstecken musste und mich trotzdem immer bestärkte. Vor allem ohne die Unterstützung meines Mannes Sebastian Kornehl wäre diese Dissertation nie zu Stande gekommen. Er gab mir immer wieder Mut, stärkte mir immer wieder den Rücken und fand immer wieder eine Möglichkeit mir Kraft zu geben und mir zu helfen.

Generell möchte ich mich bei allen Mitarbeitern dieses Instituts und nicht zu Letzt bei meinen Freunden bedanken. Nur durch ihre Unterstützung und herzliche Art gelang es mir, diese Herausforderung zu meistern.

## **Eidesstattliche Versicherung**

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

Berlin, den 04. November 2014