

**Untersuchungen prädiktiver Eigenschaften des dopaminergen  
Systems von *Drosophila melanogaster* mittels genetisch  
kodierter Calcium Sensoren**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von  
Thomas Riemensperger  
aus Wenkheim

Würzburg, 2006

**Untersuchungen prädiktiver Eigenschaften des dopaminergen  
Systems von *Drosophila melanogaster* mittels genetisch  
kodierter Calcium Sensoren**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von  
Thomas Riemensperger  
aus Wenkheim

Würzburg, 2006

**Eingereicht am:**.....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

**Vorsitzender:**.....

**Gutachter:**           **Prof. Dr. Buchner**

**Gutachter:**           **Prof. Dr. Rössler**

**Tag des Promotionskolloquiums:**.....

**Doktorurkunde ausgehändigt am:**.....

## **Erklärung:**

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg vom 15. März 1999.

Hiermit erkläre ich, die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt zu haben und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Alle aus der Literatur genommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Zuvor habe ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

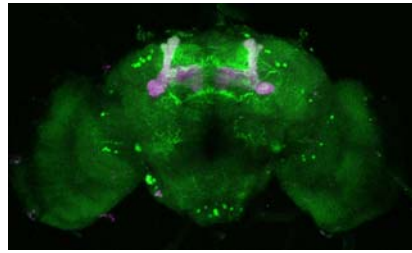
Würzburg, den 15.05.06

---

Thomas Riemensperger

*Parentibus Fratrique Gratiam ago*

*Würzburg, 23.01.06*



## 1. Einleitung

1.1	Detektion neuronaler Aktivität	11
1.2	Genetisch kodierte Calciumsensoren – FRET- oder zirkulär permutierte Sensoren	13
1.3	Klassische Konditionierung	17
1.4	Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	20
1.5	Die Prozessierung olfaktorischer Reize	22
1.6	Die Rolle Dopamins bei zellulären Prozessen	27
1.7	Das dopaminerge System	29
1.8	Zielsetzung	31

## 2. Material

2.1	Organismen	33
2.1.1	Bakterienstämme	
2.1.2	Drosophilastämme	
2.2	Vektoren	34
2.2.1	pDsRED2-N1	
2.2.2	CaSpeR	
2.3	Medien und Platten	35
2.4	Chemikalien	36
2.5	Puffer und Lösungen	37
2.6	Größenstandards für Proteine und DNA-Fragmente	41
2.6.1	Größenstandards für Proteine	
2.6.1	Größenstandards für DNA-Fragmente	

<b>2.7</b>	<b>Modifizierende Enzyme</b>	<b>42</b>
<b>2.8</b>	<b>Antikörper</b>	<b>42</b>
<b>2.9</b>	<b>Immunhistochemische Lösungen</b>	<b>43</b>
<b>2.10</b>	<b>Stammlösungen</b>	<b>44</b>
<b>2.11</b>	<b>Geräte</b>	<b>44</b>
<b>2.12</b>	<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>45</b>

### **3. Methoden**

<b>3.1</b>	<b>Drosophilazucht</b>	<b>46</b>
3.1.1	Nährmedien zum Züchten von Drosophila	
3.1.2	Drosophila – Kulturen	
<b>3.2</b>	<b>Bakterienkulturen</b>	<b>47</b>
3.2.1	Plattenkulturen	
3.2.2	Submerskulturen	
3.2.3	Lagerung von Bakterien	
<b>3.3</b>	<b>DNA-Klonierungstechniken</b>	<b>48</b>
3.3.1	DNA-Isolation aus Bakterien	
3.3.1.1.	Qiagen Plasmid Minipräparation	
3.3.1.2.	Qiagen Plasmid Maxipräparation	
3.3.2	Reinigung von DNA	
3.3.2.1	Phenolextraktion	
3.3.2.2	Ethanol-fällung	
3.3.3	Restriktionsanalyse von DNA	
3.3.4	Gelelektrophorese	
3.3.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	
3.3.6	Ligation von DNA Fragmenten	
3.3.6.1	Dephosphorylierung von DNA-Enden	
3.3.6.2	Ligation von DNA	

---

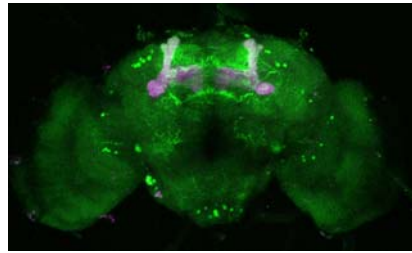
3.3.7	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	
3.3.7.1	Herstellung kompetenter Zellen	
3.3.7.2	Hitzeschock-Transformation	
3.3.8	Keimbahntransformation	
3.3.8.1	Durchführung der Injektion	
3.3.8.2	Kreuzung der injizierten Fliegen	
3.3.9	Proteinchemische Methoden	
3.3.9.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	
3.3.9.2	Transfer der Proteine auf Nitrozellulose	
<b>3.4</b>	<b>Kreuzung zur Lokalisation von Insertionen im Genom</b>	<b>57</b>
<b>3.5</b>	<b>Kreuzungen zum Erhalt stabil exprimierender Fliegen</b>	<b>57</b>
<b>3.6</b>	<b><i>In vivo</i> Calcium Imaging</b>	<b>59</b>
3.6.1	<i>in vivo</i> Präparation	
3.6.2	Komponenten der Imaging Messapparatur	
3.6.3	Imaging Apparatur	
	Messung der FRET-basierenden Sensoren	
	Messung der zirkulär permutierten Sensoren	
3.6.4	Experimente zur Depolarisierung mit Kaliumchlorid und Kaliumglukonat	
3.6.5	Experimente zur olfaktorischen Stimulation der Fliegen	
3.6.6	Messprotokoll	
3.6.7	Experimente zu prädiktiven Eigenschaften dopaminerger Neurone	
3.6.8	Verarbeitung der erhobenen Daten	
	Bildverarbeitung	
	Erstellung von Falschfarbenbildern	
	Datenanalyse	
<b>3.7</b>	<b>Immunhistochemie</b>	<b>65</b>
3.7.1	Immunhistochemische Färbung gegen Dopamin	
3.7.2	Immunhistochemische Färbung gegen Tyrosin Hydroxylase	



<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>4.1</b>	<b>Vergleich zwischen zirkulär permutierten Sensoren und FRET basierten Sensoren</b>	<b>67</b>
4.1.1	Anhebung der Expressionsstärke durch Vervielfältigung der Insertionen im Genom	67
4.1.2	Vergleich zwischen FRET basierten Sensoren anhand Kaliumchlorid und Kaliumgluconat evozierten Signalen	70
4.1.3	Vergleich zweier zirkulär permutierten Sensoren anhand Kaliumchlorid und Kaliumgluconat evozierten Signalen	77
4.1.4	Vergleich der Sensoren mittels Duftapplikation als physiologische Stimuli	80
<b>4.2</b>	<b>mb247-DsRED-Fliege</b>	<b>85</b>
4.2.1	mb247-DsRED als Landmarke im Gehirn	85
4.2.2	Klonierungsstrategie	85
4.2.3	Keimbahntransformation	86
4.2.4	Expressionseigenschaften	87
<b>4.3</b>	<b>Das dopaminerge System von <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>88</b>
4.3.1	Kolokalisationsstudie zur Untersuchung der Spezifität der TH-Gal488 Treiber Linie	
4.3.2	Anatomische Studie zum dopaminergen System	89
<b>4.4</b>	<b>Untersuchung des dopaminergen <i>Reinforcement Systems</i> von <i>Drosophila melanogaster</i> mittels Calcium Imaging</b>	<b>95</b>
4.4.1	Aktivierbarkeit dopaminergener Neurone durch Elektroschocks	95
4.4.2	Experimente zur Untersuchung prädiktiver Eigenschaften dopaminergener Neurone	99

---

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	
<b>5.1</b>	<b><i>In vivo</i> Imaging von neuronalen Aktivitäten im Zentralgehirn von <i>Drosophila melanogaster</i>: Ein Vergleich zwischen zirkulär permutierten Sensoren und FRET basierten Sensoren</b>	<b>107</b>
<b>5.2</b>	<b>Untersuchung der prädiktiven Eigenschaften des dopaminergen Systems mittels <i>in vivo</i> Calcium Imaging</b>	<b>112</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>118</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>120</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>122</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>136</b>
<b>10.</b>	<b>Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge</b>	<b>138</b>
<b>11.</b>	<b><i>Curriculum vitae</i></b>	<b>140</b>



## 1. Einleitung

### 1.1 Detektion neuronaler Aktivität

Der Begriff der neuronalen Aktivität fasst verschiedenste Prozesse zusammen, die mit der Erregung von Neuronen einhergehen, wie den Einstrom von Calcium, eine erhöhte Metabolismusrate, die Freisetzung von synaptischen Vesikeln, oder die Änderungen von Membranpotentialen. Seit der ersten intrazellulären Ableitung eines Neurons (Cole & Curtis, 1939) wurden die Aktivitätscharakteristika und die Signalübertragung zwischen einzelnen Neuronen intensiv studiert. Die Aufklärung der Funktion neuronaler Schaltkreise setzt aber in der Regel das Messen der Aktivität ganzer Neuronenpopulationen zur gleichen Zeit voraus. Elektrophysiologische Methoden sind entweder in ihrer räumlichen Auflösung sehr begrenzt, wie zum Beispiel Summenableitungen mit extrazellulären Elektroden, oder auf die Messung weniger Neurone beschränkt, wie zum Beispiel durch Ableitung mit Multielektrodenanordnung. Erst die Entwicklung optischer Messmethoden sollte für die gleichzeitige Registrierung der Aktivität zahlreicher Neurone den Weg ebnen.

Die ersten Visualisierungen von Aktivitäten innerhalb neuronaler Netze wurden mit Hilfe von spannungssensitiven Sensoren durchgeführt (Salzberg et al., 1973; Zecevic, 1989). Doch die Probleme, die solche Sensoren aufwiesen, wie das limitierte Verhältnis zwischen Signal und Rauschen bei einzelnen Zellen in Säugetierpräparationen, führten dazu, dass immer mehr Forscher das Calcium Imaging zur Untersuchung der Physiologie neuronaler Netzwerke bevorzugten. Der Anstieg der Calciumkonzentration innerhalb einer Zelle ist für die Ausschüttung von Neurotransmittern durch Neurone oder die Kontraktion von Muskeln verantwortlich. Außerdem beeinflusst die Konzentration dieser Ionen die Erregbarkeit der Zelle. Zusätzlich dringt Calcium während eines Impulses in das Axon ein (Berridge, 1998), was erstmals durch Messungen akkumulierten radioaktiven Calciums gezeigt werden

konnte (Stallcup, 1978). Es ist also möglich, über den Influx von Calcium in die Zelle ihre Aktivität zu messen (Muri & Knöpfel, 1994; Pologruto et al., 2004). Der Vorteil im Vergleich zu den spannungssensitiven Sensoren liegt besonders darin begründet, dass die dynamische Spannweite größer ist, als die der geringen Signale auf Membranpotentiale. Nachteile solcher Calciumsensoren sind, dass ihre zeitliche Auflösung sehr viel langsamer ist als die ihrer spannungssensitiven Vorgänger, so dass nicht alle Zellen, die ein Aktionspotential erzeugen, auch einen messbaren Calciumstrom aufweisen, sowie die Tatsache, dass diese Calciumsensoren nicht in der Lage sind, inhibitorische synaptische Aktivität zu detektieren (Knöpfel et al., 2006).

Durch die Entwicklung genetisch exprimierter Sensoren wurde es erstmals möglich, Sensoren unter der Kontrolle von Promotoren ganz gezielt in den gewünschten Zielzellen zu exprimieren. Mit Hilfe dieser DNA-kodierten Sensoren sollte es nun möglich sein, die unterschiedlichsten zellulären Vorgänge zu visualisieren. Diese genetisch kodierten Sensoren haben gegenüber den herkömmlichen chemischen Fluoreszenzsensoren den klaren Vorteil, dass es sich hier um Proteine handelt (Guerrero & Isacoff, 2001), die unter Zuhilfenahme genetischer Methoden, wie des UAS-Gal4-Systems bei Fliegen (Duffy, 2002), durch DNA-Mikroinjektion (Gordon & Ruddel, 1982) oder retroviral vermittelte Transfektion (Jaenisch, 1976), bei Vertebraten in den Zellen von Interesse gezielt exprimiert werden können. Somit machen sie die herkömmliche Markierung der Zelle über Mikroinjektion oder Bad-Applikation überflüssig. Diese herkömmliche Markierung der Nervenzellen war bei Modellorganismen wie *Drosophila* nur bedingt einsetzbar, da die kleinen Dimensionen des zentralen Nervensystems eine Markierung von einzelnen Neuronentypen fast unmöglich machte. Ein weiterer Vorteil liegt auch darin, dass die Expression solcher Reporterproteine auch das Risiko von Gewebeverletzungen bei der Injektion als zusätzlichen Störfaktor für die Messung reduziert.

Unter den vielen verschiedenen Sensorentypen (Zaccolo and Pozzan, 2000; Guerrero and Isacoff, 2001; Zemelman and Miesenbock, 2001; Miyawaki, 2003; Rudolf et al., 2003; Fetcho and Bhatt, 2004; Griesbeck, 2004; Miesenbock, 2004), die bis dato hergestellt wurden, stellen die Calciumsensoren die am weitesten entwickelten dar. Sie wurden schon in verschiedensten Organismen, wie zum

Beispiel *Drosophila* (Diegelmann et al., 2002; Fiala et al., 2002; Liu et al., 2003; Reiff et al., 2002; 2005; Wang et al., 2003; Yu et al., 2003; Wang et al., 2004), *C. elegans* (Kerr et al., 2000; Shyn et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Hilliard et al., 2005), Zebrafisch (Higashijima et al., 2003) und Mäusen (Hasan et al., 2004; Ji et al., 2004) erfolgreich eingesetzt.

## 1.2 Genetisch kodierte Calciumsensoren – FRET- oder zirkulär permutierte Sensoren

Das Konzept der genetisch kodierten Calciumsensoren wurde zum ersten Mal in Form des calciumsensitiven Aequorins realisiert. Hierzu wurde das Gen für das lumineszierende Protein aus der Qualle *Aequora victoria* isoliert und in Säugerzellen exprimiert. Jedoch waren die Lumineszenzeigenschaften dieses Reporters ungünstig. Auch die Tatsache, dass Aequorin mit Coelenterazin einen Cofaktor benötigt, der zusätzlich appliziert werden muss, machten ihn für physiologische Messungen eher ungeeignet (Stables et al., 2000). Die Grundlage dieser Fluoreszenz ist der calciumbindende Cofaktor Coelenterazin, der die Energie der chemischen Bindung in die Emission von blau-grünem Licht umwandelt (Shimomura & Johnson, 1978). Bei direkter Nähe des durch Calcium aktivierten Aequorins zu dem GFP kommt es zu einem Chemolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer, dem sogenannten CRET-Effekt. Dabei wirkt das Aequorin im angeregten Zustand als Donor und transferiert seine Energie auf den Akzeptor GFP, welches dann bei einer Wellenlänge von 488nm Licht emittiert (Morise et al., 1974). Das GFP besteht aus einem, sich autokatalytisch faltenden, 42Å x 42Å elfsträngigen  $\beta$ -Fass, wobei im natürlichen GFP die Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin an den Stellen 65-67 das Chromophor bilden. Eine Veränderung in diesen Aminosäuren ermöglicht es, die Emissionswellenlänge des Moleküls zu verändern. Erst die Kombination mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) (Tsien, 1998) aus *Aequorea* machte es möglich, Sensoren zu entwickeln, die aufgrund von verschiedenen Modifikationen calciumabhängige Prozesse in Zellen zuverlässig zu visualisieren vermochten (Tsien, 1998). Durch Kopplung von GFP oder GFP-derivaten an calciumbindende Untereinheiten aus anderen Proteinen, wie zum Beispiel dem Calmodulin, taten sich verschiedene Möglichkeiten auf, Reporter-moleküle zu generieren, die Aufschluss

über die freie Calciumkonzentration in der Zelle geben können. Somit gelang es, GFP-basierende Fluoreszenzsensoren zu entwickeln, die unabhängig von Aequorin arbeiten.

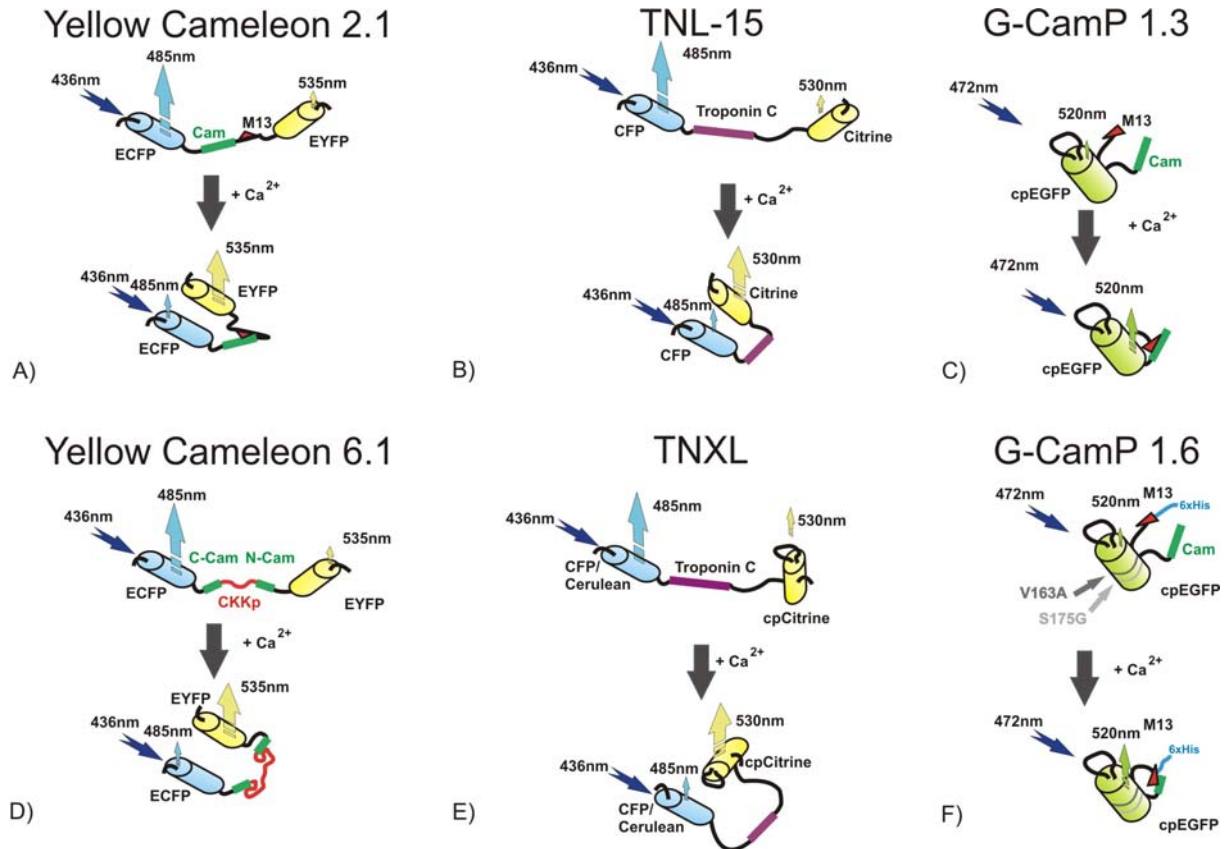
Für vier der in dieser Arbeit verwendeten Calciumsensoren der G-CamP-Reihe (Abb.1.1B) und der Cameleons (Abb.1.1A) dient das Calmodulin als eben diese calciumbindende Domäne. Calmodulin, welches eine zentrale Stellung in vielen natürlichen calciumabhängigen Prozessen der Zelle einnimmt, besteht aus einer C- und einer N-terminalen calciumbindenden Domäne mit unterschiedlicher Affinität zu diesem Ion. Daher handelt es sich bei der Bindung des Calciums nicht um einen Prozess erster Ordnung, sondern um eine Bindungskurve mit zwei Bindungskonstanten. Wird Calmodulin durch Calcium aktiviert, so kann das Protein an verschiedene Peptidmotive binden. Bei der Generierung der in dieser Arbeit verwendete Sensoren wurden das Motiv M13 (26AS-Bindungspeptid der Myosin Light Chain Kinase - MLCKp) für die Sensoren G-CamP 1.3 (Nakai et al., 2001), G-CamP 1.6 (Okhura et al., 2005) und Yellow Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) und das Motiv CKKp der Calmodulin dependent Kinase Kinase für den Sensor Yellow Cameleon 6.1 (Truong et al., 2001) verwendet. Zwei andere in dieser Arbeit verwendeten Sensoren beinhalten jedoch nicht Calmodulin als Calciumbindedomäne, sondern das aus dem Herzmuskel stammende Troponin C. Diese zwei Sensoren, TNL-15 (Heim & Griesbeck, 2003) und TNXL (Manck et al., 2006), sollten durch diese Veränderung eine verbesserte Calciumaffinität und somit höhere Signalamplituden liefern.

Bei den Sensoren Yellow Cameleon 2.1 (Cam2.1) (Miyawaki et al., 1999), Yellow Cameleon 6.1 (YC6.1) (Truong et al., 2001), sowie den Sensoren TNL-15 (Heim & Griesbeck, 2004) und TNXL (Manck et al., 2006) handelt es sich um sogenannte FRET basierte Sensoren. Die beiden Cameleonsensoren bestehen aus zwei miteinander über einen Linker verbundenen GFP Derivaten, dem ECFP (enhanced Cyan Fluorescing Protein) und dem EYFP (enhanced Yellow Fluorescing Protein). Der Linker zwischen den Fluorochromen besteht aus einer Calmodulinsequenz und einer Calmodulinbindungsdomäne, dem M13-Peptid oder dem CKKp. Im calciumfreien Zustand fluoresziert das Cameleon-Protein vor allem bei der Wellenlänge 485 nm des bei 436 nm angeregten cyanen Fluorochroms. Durch

Bindung von Calcium kommt es jedoch zu einer Konformationsänderung des Proteins, so dass das ECFP in direkter Nähe zu dem EYFP steht, was einen Energietransfer zwischen den Molekülen ermöglicht. Das angeregte ECFP überträgt also seine Energie strahlungslos auf das EYFP, so dass dessen Fluoreszenz zunimmt, während die des angeregten ECFP abnimmt. So kann die Ratio (das Verhältnis zwischen der gelben Fluoreszenz und der cyanen Fluoreszenz) Aufschluss über die Konzentration des Calciums in der Zelle geben.

TNL-15 und TNXL gehören wie auch Cameleonsensoren, zu den auf dem FRET-Effekt basierenden Sensoren, jedoch wurde hier als Calciumbindemotiv nicht das Calmodulin, sondern Varianten des Troponin C (TnC) verwendet. Die Nebeneffekte dieses Sensors sollen besonders gering sein, da davon ausgegangen wird, dass der Faktor TnC nicht mit der Biochemie der Zelle, in welcher er exprimiert wird, kreuzreagieren sollte. Troponin besteht aus einer N-terminalen Einheit mit einer Calciumbindestelle und zwei C-terminalen Calciumbindestellen, welche aber außer Calcium auf Grund ihrer Struktur auch Magnesium binden können. Dieses Problem, das bei dem Sensor TNL-15 bestand, wurde durch die Kombination von insgesamt vier Punktmutationen, N<sup>109D</sup>/D<sup>111N</sup> und N<sup>145D</sup>/D<sup>147N</sup> am C-terminalen Bereich des Troponins weitgehend behoben (Manck et al., 2006). Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden bei diesen Sensoren jeweils eine Variante des Citrin und des CFP/cerulean verwendet, wobei Anregung und Emission dieser TnC-basierten FRET-Sensoren, ähnlich wie bei den Cameleonsensoren sind. Das Protein Citrin wurde bevorzugt, weil es verglichen mit EYFP eine höhere Resistenz gegenüber Photobleichen zu haben scheint. Der Sensor TNXL wurde dahingehend weiterverändert, dass das für TNL-15 verwendete Citrin zusätzlich zyklisch permutiert wurde, was dessen Absorptionseigenschaften im angeregten Zustand verbessern und unter Calciumsättigung die Emission des CFP / Cerulean weitgehend reduzieren sollte. TNL-15 und seine verbesserte Version TNXL wurden bereits an der neuromuskulären Synapse der LIII-Larve (LNMS) von *Drosophila* erprobt und zeigten hierbei stärkere und schnellere Signale, als die ebenfalls an der NMS erprobten Sensoren der G-CaMP- und Cameleonreihen.

Den FRET-basierten Sensoren stehen die zirkulär permutierten Sensoren gegenüber, denen ebenfalls Calmodulin als Bindungspeptid für das Calcium zu Grunde liegt.



**Abb. 1.1) Grafische Darstellung der verschiedenen Calciumsensoren:** **A) Cameleon2.1:** Im nicht aktivierten Zustand fluoresziert das bei 436nm angeregte Cameleon Protein bei der für das ECFP typischen Wellenlänge von 485nm. Bei Bindung von Calcium an die Calmodulinsequenz kommt es zu einer Konformationsänderung, in der das Calmodulin an die M13-Sequenz bindet, so dass EYFP in direkte Nähe zu ECFP kommt und dieses seine Energie auf das EYFP übertragen kann. Die Ratio zwischen den Fluoreszenzen gibt somit Aufschluss über die Calciumkonzentration der Zelle. **B) TNL-15:** Der Sensor besteht aus zwei Fluorophoren, CFP und Citrin; im nicht aktivierten Zustand wird das CFP bei 436nm angeregt und fluoresziert bei 485nm. Bindet Calcium an die Bindestelle des Troponins, so kommt es zu einer Konformationsänderung und die Energie wird auf das Citrin übertragen, das bei 530nm fluoresziert. **C) G-CamP1.3:** Bei zirkulär permutierten GFP-Sensoren werden die nativen N- und C-Termini permutiert und neue Termini in der Nähe des reaktiven Zentrums gebildet. Diese werden ebenfalls mit einer Calmodulin- und einer M13-Sequenz versehen. Eine Erhöhung der Calciumkonzentration spiegelt sich hier in der Zunahme der Fluoreszenz wider. **D) Yellow Cameleon6.1:** Der strukturelle Aufbau gleicht dem des Cameleon2.1 (A); der Austausch der M13- gegen die CKKp-Sequenz erhöht die dynamische Reichweite des Proteins innerhalb physiologisch relevanter Calciumkonzentrationen, was zu einer Beschleunigung und besseren Sensitivität des Sensors führen sollte. **E) TNXL:** Struktureller Aufbau wie TNL-15 (B); das Citrin wurde für diesen Sensor jedoch zyklisch permutiert, um den FRET-Effekt zu begünstigen. **F) G-CamP1.6:** Struktureller Aufbau wie G-CamP1.3; Punktmutationen im Bereich der Aminosäuren 163 und 173 erhöhen die Änderung der Fluoreszenz.

Hier werden jedoch die nativen N- und C-Termini des GFP zirkulär permutiert und neue Termini geschaffen, wobei an den neuen C-Terminus die Calmodulin- und an



den neuen N-Terminus die M13-Sequenz angefügt wird. Diese neu gewählten Termini befinden sich im Idealfall nahe des reaktiven Zentrums und haben somit einen starken Einfluss auf das Leuchtverhalten des Chromophors. Eine Änderung der Calciumkonzentration wird hier also durch eine Veränderung der Fluoreszenzintensität visualisiert. Beide Sensoren bringen Vorteile wie auch Nachteile mit sich. So lassen sich Artefakte, die durch Bewegungen entstehen, bei FRET-basierten Sensoren aufgrund ihrer ratiometrischen Eigenschaft von Calciumsignalen unterscheiden, da bei solchen Artefakten die Fluoreszenzänderungen beider Chromophoren in gleicher Richtung, bei Calciumsignalen jedoch in entgegengesetzter Richtung verlaufen, haben allerdings den Nachteil einer eher geringen Empfindlichkeit. Genau umgekehrt verhält es sich mit den zirkulär permutierten Sensoren. Diese produzieren zwar auf eine Erhöhung der Calciumkonzentration sehr starke Signale, die aber von den in einem lebenden Tier immer auftretenden Bewegungsartefakten nicht oder nur schwer zu trennen sind.

### **1.3 Klassische Konditionierung**

Einfache Lernvorgänge können in nicht assoziatives Lernen und assoziatives Lernen unterteilt werden. Zu ersterem gehören die Sensitisierung und die Habituation (Dudel et al., 1996; Kandel et al., 2000). Hierbei stellt die Habituation die einfachste Form des Lernens dar, bei dem durch eine wiederholte Gabe eines Reizes das Tier lernt, diesem Reiz keine Wertung zukommen zu lassen. Der Reiz wird also für das Tier irrelevant. Dies konnte sehr eindrucksvoll an dem Modellorganismus *Aplysia* demonstriert werden (Pinsker et al., 1970; Kandel et al., 2000), bei welchem der Rückzugsreflex des Siphons des Seehasen untersucht wurde. Bei der Sensitisierung hingegen handelt es sich um eine allgemeine, durch einen starken Stimulus ausgelöste Reaktionsverstärkung auf viele Stimuli hin (Kandel et al., 2000).

Der Sensitisierung und Habituation stehen die klassische und die operante Konditionierung gegenüber. Bei der klassischen Konditionierung wird dem Tier ein unkonditionierter Reiz (US) mit zeitlicher Überlappung mit einem konditionierten Reiz (CS) gepaart. Hierbei evoziert der unkonditionierte Reiz immer, also auch ohne

vorheriges Lernen, eine Verhaltensantwort, während die Antwort auf den zu konditionierenden Reiz erst nach dem Lernvorgang erfolgt. Am Beispiel von Pavlows Hunden kann man zeigen, dass der vom Futter ausgelöste Speichelfluss eine Antwort ist, die nicht erlernt werden muss, Futter also einen US darstellt, während das Einsetzen des Speichelflusses bei Ertönen der Glocke (CS) erst erlernt werden musste. Dies geschieht durch mehrmalige Wiederholung der Kombination aus US und CS, wobei das Tier den unkonditionierten Reiz mit dem konditionierten Reiz zu assoziieren lernt, so dass der konditionierte Reiz zum Prädiktor für den unkonditionierten Reiz wird (Pavlow, 1927). Die operante Konditionierung hingegen setzt im Unterschied zur klassischen Konditionierung eine aktive Beteiligung des Tieres voraus. Das Tier lernt hierbei durch seine eigenen Handlungen die prädiktiven Stimuli und die ihnen zugeordnete Wertung in Beziehung zu setzen (Dudel et al., 1996).

Die klassische Konditionierung bestimmt einige der wichtigsten Aspekte im Leben der Tiere aber auch des Menschen, wie zum Beispiel welche Art von Essen er zu sich nimmt, es beeinflusst das Suchtpotential, Emotionen wie Angst oder sexuelle Aufmerksamkeit. Die Grundlage zur Konditionierung besteht in der Fähigkeit des Individuums Stimuli miteinander zu assoziieren. Diese Fähigkeit ist abhängig von mehreren Faktoren wie dem zeitlichen und räumlichen Zusammenhang zwischen den gegebenen Stimuli, der Frequenz und der Intensität.

So konnte Pavlow zeigen, dass generell die Stärke der Konditionierung mit Erhöhung der Wiederholungen des Trainings zunahm, wobei aber beobachtet werden konnte, dass die konditionierte Antwort in den ersten Wiederholungen des Trainings anzusteigen scheint, dann aber immer weiter abflacht, bis sie ein Plateau erreicht (Lieberman, 2004).

Weiterhin konnte Pavlow zeigen, dass die Stärke der Assoziation zwischen US und CS in Abhängigkeit zu ihrer zeitlichen Abfolge steht. Dies ergab, dass die Stärke der Assoziation zwischen US und CS deutlich verbessert wurde, wenn der Beginn des CS schon vor Beginn des US lag, sich die Stimuli aber überlappten (*Delay Conditioning*). Andere Versuche, wie zum Beispiel das *Trace Conditioning*, bei der zuerst der CS gegeben wurde und dann nach einiger Verzögerung der US, oder die

*Simultane Konditionierung*, bei der CS und US exakt zur gleichen Zeit gegeben wurden, zeigten eine deutliche Verschlechterung der Fähigkeit der Individuen die Stimuli zu assoziieren. Es scheint also, dass der CS so beschaffen sein muss, dass er dem Tier auch die Möglichkeit gibt, sich auf das bevorstehende Ereignis vorzubereiten. Testa konnte 1975 in seinen Versuchen weiterführend zeigen, dass nicht nur die zeitliche Abfolge der Stimuli, sondern auch deren räumliche Zusammenhänge von Bedeutung sind. Er konnte an Ratten demonstrieren, dass sich die aversive Konditionierung durch eine räumliche und zeitliche Assoziation zwischen US und CS verbessern ließ (Lieberman, 2004).

Annau und Kamin (1961) wiesen nach, dass die Stärke der Konditionierung direkt mit der Stärke des gegebenen Schocks korreliert, während Grice 1968 herausfand, dass nicht nur die Stärke des US von Bedeutung ist, sondern in geringem Maße auch die Stärke des CS (Lieberman, 2004).

Rescorla und Wagner (1972) erarbeiteten ein Modell, dessen Grundlage in der Annahme besteht, dass Tiere in der Lage sind, Wahrscheinlichkeiten des Auftretens eines Ereignisses zu berechnen, sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit eines CS. Vereinfacht dargestellt kann man also sagen, dass, wenn einer Ratte bei einem bestimmten Ton Elektroschocks verabreicht werden, die Ratte die Anzahl der gegebenen Schocks während des Tons zählt und dies mit der Anzahl der erhaltenen Schocks in dessen Abwesenheit vergleicht. Hieraus würde die Ratte Aufschluss über Wahrscheinlichkeit bekommen, unter welchen Bedingungen eine Bestrafung bevorsteht und unter welchen nicht. Hinzu kommt hier aber auch der Faktor der Überraschung. Während Kamin in seinen Versuchen zeigen konnte, dass es der Überraschungseffekt ist, der maßgeblich die Konditionierung bestimmt, modifizierten Rescorla und Wagner (1972) diese Annahme und postulierten, dass es das Maß der Überraschung ist, das bestimmt, wie gut das Tier sich konditionieren lässt. Kommt die Bestrafung also überraschend, so ist die allgemeine Aufmerksamkeit des Tieres viel höher, als wenn die Bestrafung erwartet wird. Dies ließe sich in einer Lernkurve grafisch darstellen, die der Gesetzmäßigkeit  $\Delta V_n = c(V_{max} - V_n)$  folgt. Hierbei steht  $V_n$  für die Stärke der Assoziationsfähigkeit zu Beginn des Durchlaufes  $n$  und  $\Delta V_n$  für den Unterschied in der Assoziationsstärke, der durch den Durchlauf  $n$  erzeugt wird,  $c$  stellt eine Konstante zwischen 0 und 1 dar, die es erlaubt, die Lerngeschwindigkeit

zu variieren. Eine Rechnerimplementation des Rescorla-Wagner Modells zeigt, dass  $\Delta V_n$  in Abhängigkeit der Anzahl der durchgeführten Trainingsdurchläufe immer geringer wird, Lernen also kein linearer Prozess ist, sondern einem asymptotischen Verlauf folgt (Lieberman, 2004).

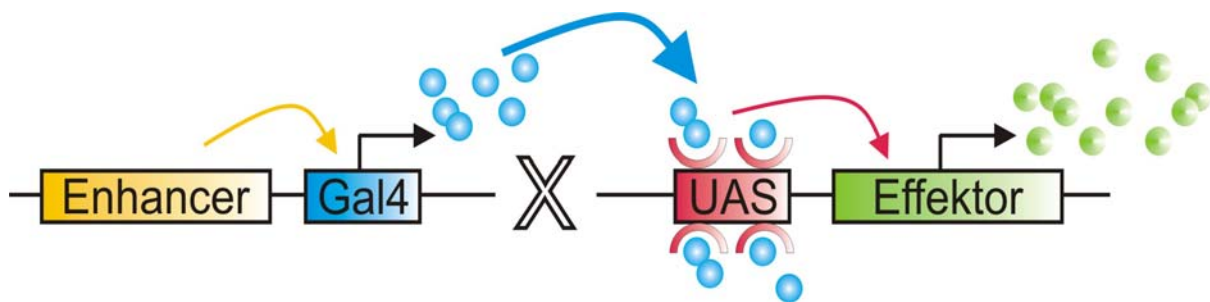
Thorndike (1911) fügte dem System der klassischen Konditionierung einen operanten Aspekt hinzu. Während Pavlow zwei Stimuli präsentierte, zum Beispiel Futter bei Erklängen einer Glocke und kein Futter ohne die Glocke, setzte Thorndike den Zusammenhang zwischen Antwort und Konsequenz voraus. So wurde in diesem Paradigma dem Tier nur bei richtigem Verhalten die Belohnung erteilt. Bei der klassischen Konditionierung hängt die Erteilung der Belohnung lediglich von der Präsentation des CS ab, in Thorndikes Paradigma hingegen von der Verhaltensantwort des Versuchstieres auf den CS – kein Verhalten, keine Belohnung. Bei operanter Konditionierung stellt ein Reinforcer also ein Ereignis dar, das, wenn es nach einem bestimmten Verhalten eintritt, die Wahrscheinlichkeit, dieses Verhalten in gegebener Situation zu wiederholen, erhöht, sei es durch den Erhalt einer Belohnung oder durch Ausbleiben einer Bestrafung. Die Versuchsdurchführungen der beiden Paradigmen unterscheiden sich also grundlegend, wobei nicht ausgeschlossen werden soll, dass die damit verbundenen Lernprozesse gemeinsame Elemente haben können (Lieberman, 2004).

#### **1.4 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster***

Trotz des großen phylogenetischen Abstandes zum Menschen stellt *Drosophila* einen durchaus geeigneten Modellorganismus dar, um neuronale Sachverhalte aufzuklären. Die Komplexität des Organismus liegt mit seinen ca. 200000 Neuronen zwischen der von *Aplysia*, einem anderen häufig in den Neurowissenschaften verwendeten Organismus, und der des Menschen, der mit einer Komplexität von  $10^8$  –  $10^{11}$  Nervenzellen eine genauere Entschlüsselung der neuronalen Netzwerke kaum zulassen würde – ethische Fragen ganz außer Acht gelassen. Trotz der relativ geringen Anzahl an Neuronen ist *Drosophila* dennoch in der Lage, ein komplexes Verhalten an den Tag zu legen und kann somit als Modellorganismus zur Untersuchung von Verhaltensplastizität (Dubnau & Tully, 1998; Waddel & Quinn,

2001; Heisenberg, 2003; Davis, 2005), wie zum Beispiel bei visuell orientiertem Laufen oder Fliegen (Heisenberg, 1998; Heisenberg et al., 2001) oder bei Duft-assoziiertem Lernen (Quinn et al., 1974; Waddel & Quinn., 2001), dienen.

Der wohl größte Vorteil von *Drosophila* basiert auf ihrer Genetik. Seit Begründung der *Drosophila* Forschung durch Morgan wurde eine Vielfalt von mutanten Allelen generiert und als etablierte Laborstämme gezüchtet. Seit dem Jahre 2000 liegt das *Drosophila* Genom komplett sequenziert vor (Adams et al., 2000). Mit Hilfe des UAS-Gal4 Systems ist es zudem möglich, gezielt in bestimmten Zellpopulationen Reporterproteine oder andere Effektoren zu exprimieren (Brand & Perrimon, 1993). Hierbei wird ein Enhancersystem aus der Hefe herangezogen, das aus dem Gen für den Transkriptionsfaktor Gal4 und dem zugehörigen response element UAS besteht. Die beiden Komponenten werden als Transgene separat in die Genome verschiedener Fliegen inseriert, so dass man zum einen eine sogenannte Gal4-Treiberlinie, zum anderen eine sogenannte UAS-Effektorlinie erhält (Brand & Perrimon, 1993). Hierbei wird einerseits ein Konstrukt, das das Gen für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4 mit einem schwachen Promotor beinhaltet, in das Genom der Fliege inseriert (Gal4-Linie). Je nach Insertionsort wird nun örtlich und / oder zeitlich begrenzt unter der Kontrolle eines endogenen Enhancers in der Nähe des Insertionslokus Gal4 exprimiert. Die UAS-Effektorlinie besitzt hingegen ein Konstrukt, welches den Hefe Enhancer UAS vor einem beliebigen Effektorgen enthält (UAS-Linie).



**Abb. 1.2) Das UAS/Gal4 System:** Das System besteht aus zwei transgenen Komponenten, wobei jede in das Genom unterschiedlicher Fliegen inseriert ist. Man erhält also zum einen eine Gal4-Linie, die unter der Kontrolle eines Enhancers lokal Gal4 exprimiert und zum anderen eine Linie, in der das Effektorgen unter der Kontrolle der „upstream activating sequence“ (UAS) steht. In den Parentallinien kommt es also zu keiner Expression des Effektors. Erst wenn die Gal4 Linie mit der Effektorlinie gekreuzt wird, kann in der F1-Generation das enhancerspezifisch exprimierte Gal4 an die UAS binden und so das Effektorgen aktivieren.

Da für die Expression dieses Effektorgens Gal4 benötigt wird, kann der Effektor lediglich in der F1-Generation einer Kreuzung zwischen UAS- und Gal4-Linie exprimiert werden und erfolgt in Abhängigkeit von der räumlichen bzw. zeitlichen Aktivität des endogenen Enhancers, unter dessen Kontrolle Gal4 steht.

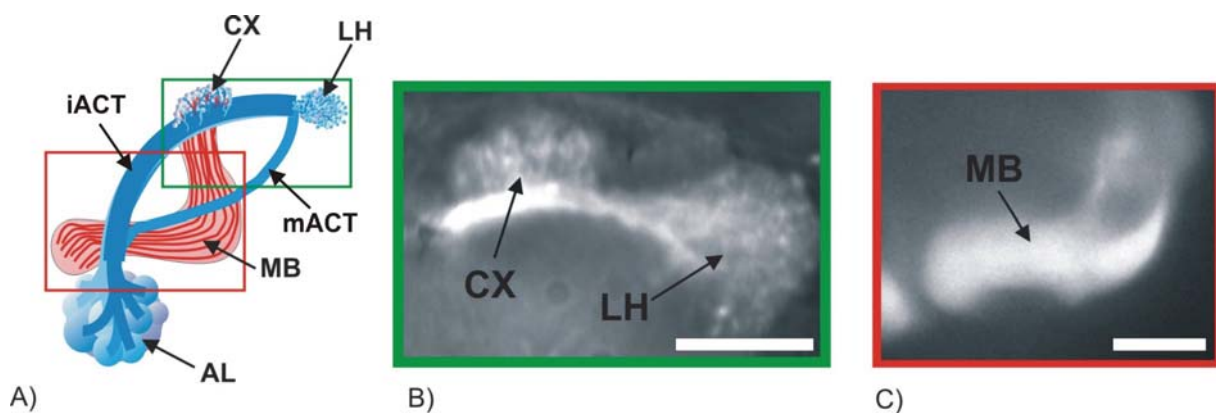
Der große Vorteil gegenüber den herkömmlichen Enhancertraplinien, bei denen der Effektor direkt unter der Kontrolle des jeweiligen endogenen Enhancers steht, liegt in der Möglichkeit, verschiedene, frei wählbare Effektoren unter der Kontrolle des gleichen Enhancers zu exprimieren.

Das bei *Drosophila* am besten etablierte Paradigma zur Untersuchung der klassischen Konditionierung nach Pavlov ist das duftassoziierte Lernen, welches sowohl für ein belohnungsorientiertes Lernen, bei dem Zucker als „Reinforcer“ (US) wirkt (Tempel et al., 1983), als auch für bestrafungsorientiertes Lernen unter Zuhilfenahme eines Elektroschocks als „Reinforcer“ (Tully & Quinn, 1985) beschrieben wurde. Unabhängig vom Typ des US besteht das Paradigma aus zwei Düften (CS+ und CS-), die der Fliege nacheinander präsentiert werden. Dabei wird der erste Duft jeweils mit dem US gepaart (CS+), während der zweite Duft ohne den US präsentiert wird (CS-). Nachdem das Tier trainiert wurde, werden ihm die zwei Düfte präsentiert und das Tier kann frei zwischen den Düften, CS+ oder CS-, wählen. Ein Vorteil dieses Paradigmas ist, dass die Prozessierung olfaktorischer Reize in *Drosophila* schon weitgehend untersucht ist.

## 1.5 Die Prozessierung olfaktorischer Reize

Die Fliege nimmt ihre Duftumwelt über ihre Antennen und die Maxillarpalpen wahr, welche die ca. 1500 Rezeptorneuronen enthalten (Stocker et al., 1993). Die einzelnen Rezeptorneurone exprimieren auf ihren Dendriten jeweils nur eines oder sehr wenige der 57 Rezeptorproteingene (Clyne et al., 2000; Vosshall et al., 2000; Guo et al., 2001) und sind somit meist funktionell unterschiedlich. Die Axone dieser Rezeptorneurone projizieren zu zwei lobulären Strukturen, den Antennalloben (Abb.1.2A-AL), wo sie präsynaptisch zu den 43 sogenannten Glomeruli stehen (Laissue., 1999). Wie bei Vertebraten ist auch hier eine starke neuronale Konvergenz

zu beobachten. Ähnlich dem Verschaltungsmuster des olfaktorischen Bulbus bei Mäusen terminieren auch bei Insekten die sensorischen Neurone, die ein bestimmtes Rezeptorprotein exprimieren, in der Regel in nur einem Glomerulus. Diese Glomeruli stehen über intrinsische Interneurone miteinander in lateralem Kontakt. Sie können sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Wirkung auf andere Glomeruli haben. Von der Struktur des Antennallobus wird die olfaktorische Information dann durch sogenannte Projektionsneurone zu höheren Hirnzentren wie den Calyces (Abb.1.2A, B-CX) der Pilzkörper (Abb.1.2A, C-MB) und den lateralen protocerebralen Loben des sogenannten lateralen Horns (Abb.1.2A, B-LH) weitergeleitet.

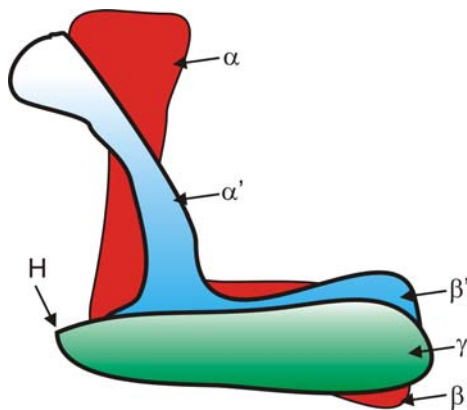


**Abb. 1.3) Darstellung der für die Duftinformation relevanten Neurone im Gehirn einer adulten Fliege:** **A)** Graphische Darstellung des olfaktorischen Pathways: Die Duftinformation wird über Rezeptorneurone an die Antennalloben (AL) weitergeleitet. Von dort ziehen die Projektionsneurone (dunkelblau) in die höheren Gehirnzentren, wie die Calyces (CX) und die lateralen protocerebralen Loben (LH). Die Duftinformation wird dann über die Calyces an die Pilzkörper (MB) weitergeleitet, wo das Duftgedächtnis der Fliege lokalisiert liegt. **B)** Auflichtmikroskopische Aufnahme der Projektionsneurone mit Focus auf den Calyx (CX) und den lateralen protocerebralen Lobus (LH). **C)** Auflichtmikroskopische Aufnahme des  $\beta$ -Lobus (MB) eines der Pilzkörper. Skalierungsbalken: 50 $\mu$ m.

Eine zweite Gruppe von Projektionsneuronen greift jedoch nicht wie der größte Satz dieses Neuronentyps von lediglich einem oder wenigen Glomeruli seine Informationen ab, sondern steht gleich mit mehreren in Kontakt. Die Axone dieser Neuronen projizieren über den sogenannten mittleren antennocerebralen Trakt (Stocker, 1990) am Calyx vorbei direkt in das laterale Protocerebrum (Jeffris et al., 2002) (siehe Abb.1.3A).

Die Axone der ca. 2500 Kenyonzellsomata eines jeden Pilzkörpers projizieren von den Calyces hin zum anterioren Teil des Gehirns, wo sie sich in verschiedene Zielgebiete aufteilen. Unterschiedliche Unterklassen von Kenyonzellen bilden Axone,

die unverzweigt bleiben, wie die Kenyonzellen, die den  $\gamma$ - Lobus bilden, und solche, die sich aufgabeln, wie die Axone der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Loben. Diese drei Untergruppen der Kenyonzellen stammen von vier Neuroblasten ab und entstehen während des Larval- und Puppenstadiums (Crittenden et al., 1998; Lee & Luo, 1999).



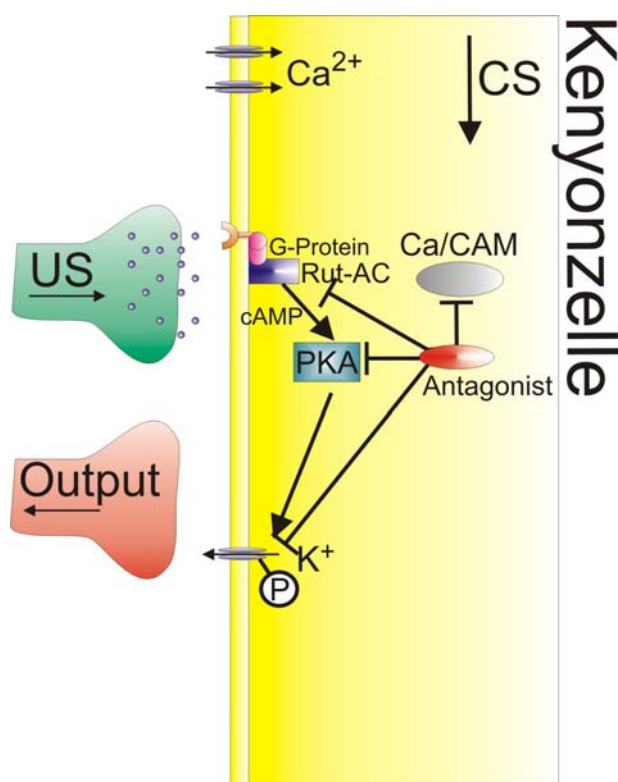
**Abb. 1.4) Graphische Darstellung der Pilzkörperstruktur:** Die Axone der Kenyonzellen bilden die medialen und die vertikalen Loben der Pilzkörper. Vom Peduncel her kommend teilen sich die Axone der Kenyonzellen dahingehend auf, zu welchem Lobensystem sie projizieren. Die  $\gamma$ -Axone bleiben ungespalten, während sich die Axone der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Loben in mediale und vertikale Projektionen aufteilen. (Nach Crittenden et al. 1998).

Es wurde die Hypothese formuliert, dass Kenyonzellen als Koinzidenzdetektoren wirken (Heisenberg, 2003). Dabei wird angenommen, dass eine Kenyonzelle Informationen von drei primären Duftqualitäten (PDQ) bekommt, die jeweils von einem Projektionsneuron repräsentiert werden, so dass eine Kenyonzelle nur aktiviert wird, wenn alle diese drei Projektionsneuronen gleichzeitig aktiviert sind. Weiterhin ist die Anzahl der Spikes, mit der die Kenyonzellen auf einen Duft antworten, um ein Vielfaches geringer als die Antwort der vom selben Duft angeregten Projektionsneuronen, wie bei Locusten gezeigt werden konnte (Perez-Orvie et al., 2002). Dies könnte in einem sogenannten „feedforward“ Mechanismus begründet liegen, der durch die GABA-ergen Interneurone vermittelt wird, die vom lateralen Protocerebrum hin zum Calyx projizieren.

Neuronale Korrelate für assoziative Plastizität wurden in bestimmten Regionen des Insektengehirns identifiziert, wobei vor allem die Pilzkörper für die Bildung eines aversiven olfaktorischen Gedächtnisses notwendig zu sein scheinen (Gerber et al., 2004). Daher benötigen die Pilzkörper weitere neuronale Eingänge, die ihnen eine Wertung des Duftes mitteilen, wie positiv oder negativ (US-Neurone), und weiterhin Pilzkörperausgangsneuronen, die mit allen Kenyonzellsynapsen in Verbindung stehen und in Abhängigkeit von der Wertung ein entsprechendes Verhalten evozieren. Ohne jegliche Konditionierung sind diese Neuronen still und würden auf



keinen gegebenen Stimulus reagieren. Bekommt die Fliege nun während eines Trainingsdurchlaufs einen Duft präsentiert, der mit einem Schock gepaart wird, werden die US-Neurone und die für den Duft spezifischen Kenyonzellen gleichzeitig antworten, was zu einer Hochregulierung der Transmitterfreisetzung in den Ausgangssynapsen dieser Kenyonzellen führt. Dies wiederum macht die Ausgangsneuronen des Pilzkörpers spezifisch empfindlich für den trainierten Duft (Heisenberg, 2003), ein Szenario, das in der Biene schon bewiesen werden konnte (Mauelshagen, 1993).



**Abb. 1.5) Grafische Darstellung der Modulation der präsynaptischen Transmission an der Synapse von der Kenyonzelle hin zum Ausgangsneuron.** Die zeitgleiche Ankunft des CS und des US erhöht die Konzentration von cAMP in der Zelle, was zu einer erhöhten Aktivität der PKA führt, die dann Proteine an der Synapse phosphoryliert (nach Heisenberg, 2003).

Für die Prozessierung von Stimuli nehmen sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten die biogenen Amine eine besonders wichtige Rolle ein (Blenau & Baumann, 2001; Müller, 2002), wobei diese zum einen als Neurotransmitter, zum anderen auch als Neuromodulatoren wirken können. So binden Moleküle wie zum Beispiel Dopamin, welches auch dieser Gruppe angehört, an einen membranständigen, G-Protein gekoppelten Rezeptor, was eine Erhöhung der Konzentration von sekundären Botenstoffen wie cAMP und / oder Calcium zur Folge hat. Der Anstieg der cAMP Konzentration in der Zelle sorgt für eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die darauf hin zum Beispiel membranständige Proteine

phosphoryliert. Ein Vorgang, der später vertieft erklärt wird. So konnte gezeigt werden, dass eine Komponente des aversiven Kurzzeitgedächtnisses direkt von der Expression von *rutabga* (Davis et al., 1995), einer Adenylatzyklase, abhängig zu sein scheint. Man nimmt an, dass es sich bei dieser Adenylatzyklase um eine Art molekularen Koinzidenzdetektor handelt, der die neuronalen Aktivitäten verarbeitet, die durch den CS oder den US hervorgerufen werden. Außerdem scheint die Expression dieser Adenylatzyklase in den Pilzkörpern notwendig ist, um ein Kurzzeitgedächtnis aufzubauen (Zars et al., 2000; McGuire et al., 2003). Durch Blocken des „outputs“ der Kenyonzellen dieses Pilzkörpers während des Trainings konnte die Ausbildung eines olfaktorischen Gedächtnisses gestört werden, was die Notwendigkeit dieser Struktur zum Wiederabrufen des Gedächtnisses bewies (Dubnau et al., 2001; McGuire et al., 2001; Schwaerzel et al., 2002). Wobei hier jedoch angemerkt sei, dass sich neuronale Zusammenhänge bezüglich des aversiven Lernens auch in den Antennalloben von *Drosophila* (Yu et al., 2004) oder Bienen (Faber et al., 1999; Müller, 2000; Hammer & Menzel, 1998) haben nachweisen lassen.

Wie an der Biene mittels der Konditionierung des Proboscisextensionsreflexes gezeigt werden konnte, spielt das Monoamin Octopamin hierbei als Vermittler für den positiven Reinforcer (Zucker) eine besonders wichtige Rolle (Hammer, 1993; Hammer & Menzel, 1998, Menzel et al., 1999), während Dopamin bei Insekten eher negative Stimuli als US repräsentiert. Bei Affen und anderen Vertebraten scheint sich dieses System umgekehrt zu haben, da hier die Belohnung durch die dopaminergen Neuronen des Mittelhirns vermittelt wird (Mirenowics & Schultz, 1996; Schultz, 2002).

## **1.6 Die Rolle Dopamins bei zellulären Prozessen**

Neuronen kommunizieren mit anderen Neuronen oder nicht neuronalen Zielzellen über elektrochemische Signalwege. So sorgen Aktionspotentiale für eine Ausschüttung von Botenstoffen an einer bestimmten Stelle des erregten Neurons. Diese Botenstoffe können kleine organische oder peptiderge Komponenten beinhalten, die entweder als Neurotransmitter, Neurohormone oder als Neuromodulatoren wirken können. Manche dieser Stoffe können auch mehrere

Funktionen gleichzeitig übernehmen, zum Beispiel als Neurotransmitter in einer örtlich begrenzten interneuronalen Kommunikation, oder als Neurohormon, wenn sie in die Hämolymphe abgegeben werden. An ihrer Zielzelle werden diese Botenstoffe über Rezeptoren an der Membran erkannt und wandeln dann das chemische Signal wieder in ein elektrisches Signal um oder lösen eine biochemische Antwort der Zielzelle aus (Mustard et al., 2005).

Eine Gruppe dieser Botenstoffe sind die biogenen Amine, die in einem oder mehreren Schritten aus Aminosäuren umgesetzt werden. Diese Botenstoffe übernehmen sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten eine Vielzahl von Aufgaben, wie zum Beispiel die Regulation des zirkadianen Rhythmus, des Sexualverhaltens und auch des Lernens und des Gedächtnisses. Solche Catecholamine wirken als Signalmoleküle, welche notwendig für synaptische Modulation und Verhaltensplastizität sind (Civelli et al., 1993; Sawaguchi & Goldman-Rakic, 1994). Beim Menschen können sich Störungen von Signalwegen solcher Catecholamine im zentralen Nervensystem in Erkrankungen wie Schizophrenie oder Depressionen auswirken (Goldstein & Deutsch, 1992; Hornykiewicz, 1966; Seeman et al., 1993). In Vertebraten wie Invertebraten teilen sich die biogenen Amine in fünf Gruppen auf. Neben solchen Molekülen, welche beide phylogenetischen Gruppen verwenden, wie Dopamin, Serotonin und Histamin, gibt es bestimmte biogenene Amine, wie Norepinephrin und Epinephrin, die nur von Vertebraten gebildet werden und Octopamin und Tyramin, die für Invertebraten charakteristisch sind. Allen biogenen Aminen liegt eine von drei Aminosäuren als Ausgangsmaterial zu Grunde: Histidin, Tryptophan oder Tyrosin (Blenau & Baumann, 2001).

Tyrosin dient bei Invertebraten als Ausgangsstoff zur Herstellung von Dopamin und bei Vertebraten auch von Norepinephrin und Epinephrin. Hierzu wird zunächst das Tyrosin an der *meta*-Position über das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH) hydroxyliert. In der Synthese von Dopamin stellt dieser Schritt den geschwindigkeitslimitierenden Teil der Synthese dar. Das so entstandene L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-Phenylalanin) wird dann durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zu Dopamin umgesetzt. Während bei Vertebraten Dopamin zu Norepinephrin und Epinephrin weiterverarbeitet werden kann, endet in *Drosophila* der Syntheseweg an dieser Stelle. Bei anderen

Insektenarten konnte jedoch, wenn auch nur in geringen Mengen, Norepinephrin und Epinephrin nachgewiesen werden, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich hierbei nicht um eine Eigenheit der Vertebraten handelt (Blenau & Baumann, 2001).

Die Rezeptoren der biogenen Amine gehören alle der Familie der rhodopsin-ähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an und stellen integrale Membranproteine mit sieben transmembranen Domänen dar, wobei der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär lokalisiert liegt (Bockaert & Pin, 1999). Die Aktivierung des Rezeptors wird durch die Bindung des Amins in einer Tasche eingeleitet, die von den Transmembrandomänen gebildet wird. Ist der Ligand gebunden, wird der Rezeptor seine Konformation ändern und diese strukturelle Änderung an das trimere G-Protein weiterleiten. Wie schon erwähnt, sorgt die Aktivierung des G-Proteins im weiteren Verlauf dafür, dass die intrazelluläre Konzentration von Calcium oder cAMP gesteigert oder reduziert wird, was sich auf den Zellstoffwechsel auswirkt oder die Zell-Zell-Interaktionen beeinflussen kann.

Insgesamt wurden in Vertebraten fünf verschiedene Dopaminrezeptoren beschrieben und diese in zwei Klassen eingeteilt, in D1- und D2- Rezeptoren. In *Drosophila* wurden zwei Angehörige der D1 Familie identifiziert, DAMB (Feng et al., 1996; Han et al., 1996) und dDA1/DmDOP1 (dDA1) (Kim et al., 2003; Gotzes & Baumann, 1994; Sugamori et al., 1995), und eine Entsprechung der D2-Rezeptoren der Vertebraten, der DD2R (Hearn et a., 2002). Hierbei fällt auf, dass die DAMB- und dDA1-Rezeptoren weitgehend auf die Region des adulten Zentralgehirns von *Drosophila* beschränkt zu sein scheinen. In den Regionen der Pilzkörper kommt es zu einer sehr starken Expression beider Rezeptoren, wobei die dDA1 Rezeptoren in der Region des Knies dominieren und die DAMB ein höheres Expressionsniveau in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Loben zeigen. In den Regionen der Calyces konnte hingegen keiner der Rezeptoren detektiert werden. Weiterhin zeigten die Regionen des Ellipsoidkörpers ein schwaches, die gepaarten Noduli und der fächerförmige Körper ein starkes Expressionsmuster der dDA1 Rezeptoren, wobei im fächerförmigen Körper auch eine schwache Expression des DAMB Rezeptors festgestellt werden konnte (Kim et al., 2003), während im Thorakalganglion, dem Abdominalganglion und in neurosekretorischen Zellen lediglich der dDA1 Rezeptor nachgewiesen

werden konnte. Über die Anatomie der DDR2 Rezeptoren liegen in *Drosophila* jedoch noch keinerlei Studien vor.

## 1.7 Das dopaminerge System

Das gesamte Gehirn von *Drosophila* ist dicht von dopaminergen Neuronen innerviert, mit besonders starken Projektionen hin zu den Loben der Pilzkörper, während die Calyces, die Eingänge der Pilzkörper für olfaktorische Informationen oder Strukturen wie die der Antennalloben nur sehr schwach oder gar nicht innerviert sind. Dies stimmt mit der Verteilung von Dopaminrezeptoren weitgehend überein, die auch in erster Linie in den Regionen der Pilzkörperloben zu detektieren sind (Han et al., 1996; Kim et al., 2003).

Schwärzel et al., (2003) konnten zeigen, dass Dopamin für die aversive Konditionierung von essentieller Bedeutung ist. So zeigten Fliegen, deren dopaminerge Neurone über das Shibire<sup>TS</sup>-System, getrieben durch die Linie TH-Gal4, welche die Expression der Effektoren unter der Kontrolle des Promotors der Tyrosin Hydroxylase treibt (Friggi-Grelin et al., 2003), während der Trainingsdurchläufe geblockt wurden, ein stark reduziertes Lernen, wenn der Duft mit einem Elektroschock als US gepaart wurde. Bei einer positiven Konditionierung blieben die Fliegen unbeeindruckt vom Ausschalten des dopaminergen Systems. Auch ohne Dopaminfreisetzung während der Trainingsphase war es ihnen möglich, den belohnten Duft vom unbelohnten Duft zu unterscheiden. Diese Daten gehen konform mit Ergebnissen von Hammer und Menzel, die in der Biene zeigen konnten, dass bei Belohnung das VUMmx1-Neuron besonders stark aktiviert wird. Bei genaueren Untersuchungen stellte sich heraus, dass dieses Neuron octopaminerg ist. Schaltet man bei *Drosophila* die octopaminergen Neurone während der Trainingsphase aus, können die Fliegen sehr wohl das bestrafungsorientierte Lernen durchführen, zeigen aber keinerlei Lernen auf den mit Zucker gepaarten Duft. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Dopamin negative Stimuli vermittelt, während Octopamin für die positive Assoziation zuständig zu sein scheint.

Interessanterweise scheint sich dieses System im Laufe der Evolution partiell umgekehrt zu haben. So konnten Mirenowics und Schultz (1996) durch Ableitungen von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns bei Primaten zeigen, dass bei einer Belohnung des Tieres diese Neuronen aktiviert werden. Bei Paarung der Belohnung mit einem zunächst neutralen Stimulus, wie einem optischen Signal oder einem Ton, stellte sich jedoch schon während des Trainings eine Änderung im Antwortverhalten dieser Neuronen ein. Wenn die Neuronen zunächst nur eine detektierbare Antwort auf die Belohnung selbst zeigten, so stellte sich das Verhalten der Neurone dahingehend um, dass sie nicht nur auf die Belohnung antworteten, sondern schon auf den jetzt die Belohnung vorhersagenden Stimulus (Schultz & Dickinson, 2000). Bei längerem Training ebte die Antwort auf die Belohnung selbst immer weiter ab, während die Antwort auf den vorhersagenden Stimulus stärker wurde. Dies ließ darauf schließen, dass das dopaminerge System nicht ausschließlich für die Vermittlung des Belohnungsreizes zuständig sein kann, sondern auch eine prädiktive Eigenschaft haben muss.

Die Untersuchungen bei *Drosophila* haben gezeigt, dass Dopamin eine Schlüsselrolle beim Prozess des aversiven Lernens hat. Jedoch ist unklar, ob bei Invertebraten dieses biogene Amin lediglich den aversiven Stimulus vermittelt und deshalb während des Lernens notwendig, für den Abruf des Gedächtnisses aber nicht unbedingt erforderlich ist, oder ob dopaminerge Neurone wie auch bei Vertebraten die Eigenschaft haben, ein bevorstehendes Ereignis vorherzusagen.

## 1.8 Zielsetzung

Belohnung kontrolliert zielorientiertes Verhalten und ist bei Lernvorgängen involviert, da es als positiver Verstärker dient. Man kann also sagen, dass eine Belohnung einem Zielobjekt einen positiven Wert zuordnet, und dass Dinge, die eine Belohnung ankündigen, eben diesen Wert zugerechnet bekommen. Für Bestrafung gilt diesbezüglich dasselbe im negativen Sinne.

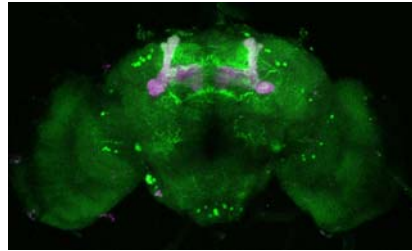
Wie oben schon erwähnt, hat Dopamin seine Rolle im Laufe der Evolution geändert und man kann beobachten, dass bei Invertebraten negative Assoziationen über das dopaminerge System prozessiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es nun, zunächst einen Sensor zu finden, der den Ansprüchen für die Messung in einem lebenden Tier gerecht wird. Viele Fragestellungen konnten lange nicht in *Drosophila* untersucht werden, da trotz der vielen Vorteile dieses Modellsystems die Forschung im Zentralgehirn von *Drosophila* aufgrund seiner Kleinheit beschränkt waren. Die Technik des *in vivo* Imaging eröffnet der Untersuchung von neuronalen Netzwerken ganz neue Wege und die Kombination aus Imaging und der *Drosophila*-Genetik machen es nun möglich, auch in einzelnen Neuronentypen zu messen. Hierfür musste aber zunächst auch der passende Sensor für die jeweilige Fragestellung gefunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sensoren auf ihre Tauglichkeit für Messungen in weitgehend intakten Organismen hin untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit war der Frage gewidmet, welche Rolle den dopaminergen Neuronen bei der Prozessierung von bestrafenden Stimuli zukommt und wie diese Zellen auf solche Stimuli reagieren. Weiterhin sollte ein Phänomen untersucht werden, das zuvor in Primaten beschrieben wurde. Hierbei geht es um die prädiktiven Eigenschaften dieser Neurone. Wie bereits beschrieben konnte durch Ableitung von dopaminergen Neuronen im Gehirn von Primaten gezeigt werden, dass diese Neurone zunächst auf eine Belohnung antworten. Nach einer wiederholten Paarung dieser Belohnung (in diesem Fall wurde Apfelsaft verwendet) mit einem vorhersagenden Stimulus, wobei hierfür ein optischer Reiz gegeben wurde, konnte festgestellt werden, dass die dopaminergen Neurone schon auf diesen vorhersagenden Stimulus reagierten, in diesen Neuronen also eine Assoziation zwischen dem optischen Prädiktor und der eigentlichen Belohnung repräsentiert ist. Im Laufe dieses Trainings wurde noch ein weiteres Phänomen beobachtet, nämlich das Zusammenziehen der Antworten auf die beiden einzelnen Stimuli zu einer gemeinsamen. Da in dieser Arbeit nicht mit Ableitungen gearbeitet wurde, sondern die neuronalen Aktivitäten optisch detektiert wurden, konnte kein optischer Reiz als Prädiktor verwendet werden. Stattdessen machte man sich hierfür einen olfaktorischer Reiz zunutze und als unkonditionierten Reiz keine Belohnung,

sondern eine Bestrafung über einen Elektroschock, da Schwärzel et al. (2003) zeigen konnten, dass dopaminergen Neuronen in *Drosophila* keine Rolle während des Belohnungslernens zuzukommen scheint, für Bestrafungslernen jedoch benötigt werden. Dieser Versuchsablauf ähnelte einem in *Drosophila* schon häufig erfolgreich angewandten Lernparadigma (Tully & Quinn, 1985) und sollte es ermöglichen, neuronale Aktivitäten im Gehirn eines lernenden Tieres zu visualisieren und somit Aufschluss darüber geben, in wie weit die Rolle dopaminergener Neurone während eines Lernvorgangs bei *Drosophila* mit der Rolle dieser Neurone von Säugetieren vergleichbar ist.





## 2. Material

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Für die Transformationen und Vermehrung der Plasmidvektoren wurde der von der Firma Stratagen bezogene Bakterienstamm *E.coli* XL1-blue eingesetzt.

#### 2.1.2 *Drosophilastämme*

Zur Transformation der Embryonen mit dem Transformationsvektor wurden Fliegen des Stammes *Drosophila melanogaster*  $w^{1118}$  verwendet.

Zur Kartierung und zur Herstellung kombinierter Fliegenstämme wurde der Doppelbalancerstamm [ $CyO/Sp; TM2/TM6$ ] verwendet.

Als Treiberlinien wurden die Fliegenstämme *Drosophila melanogaster* 201Y (Armstrong et al., 1998), *Drosophila melanogaster* GH146 (Stocker et al., 1997), *Drosophila melanogaster* *elaV-Gal4* (Luo et al., 1994), *Drosophila melanogaster* *TH-Gal4* (Friggi.Grelin et al., 2003) verwendet.

Als Reporterlinien wurden die UAS Linien *Drosophila melanogaster* *Cam2.1-82* (Diegelmann et al., 2002), *Drosophila melanogaster* *G-CamP1.3* (2003), *Drosophila melanogaster* *TNL-15* (Griesbeck & Griesbeck, 2004), *Drosophila melanogaster* *TNXL* (Manck et al., 2006), sowie verschiedene im Haus generierte Fliegen verwendet.

## 2.2 Vektoren

Die graphische Darstellung der verwendeten Plasmidvektoren zeigt die jeweiligen Charakteristika der Plasmide (Antibiotika-Resistenzen, Promotor und die Sequenz der *multiple cloning site*).

### 2.2.1 pDsRED2-N1 (Fa. Clontech)

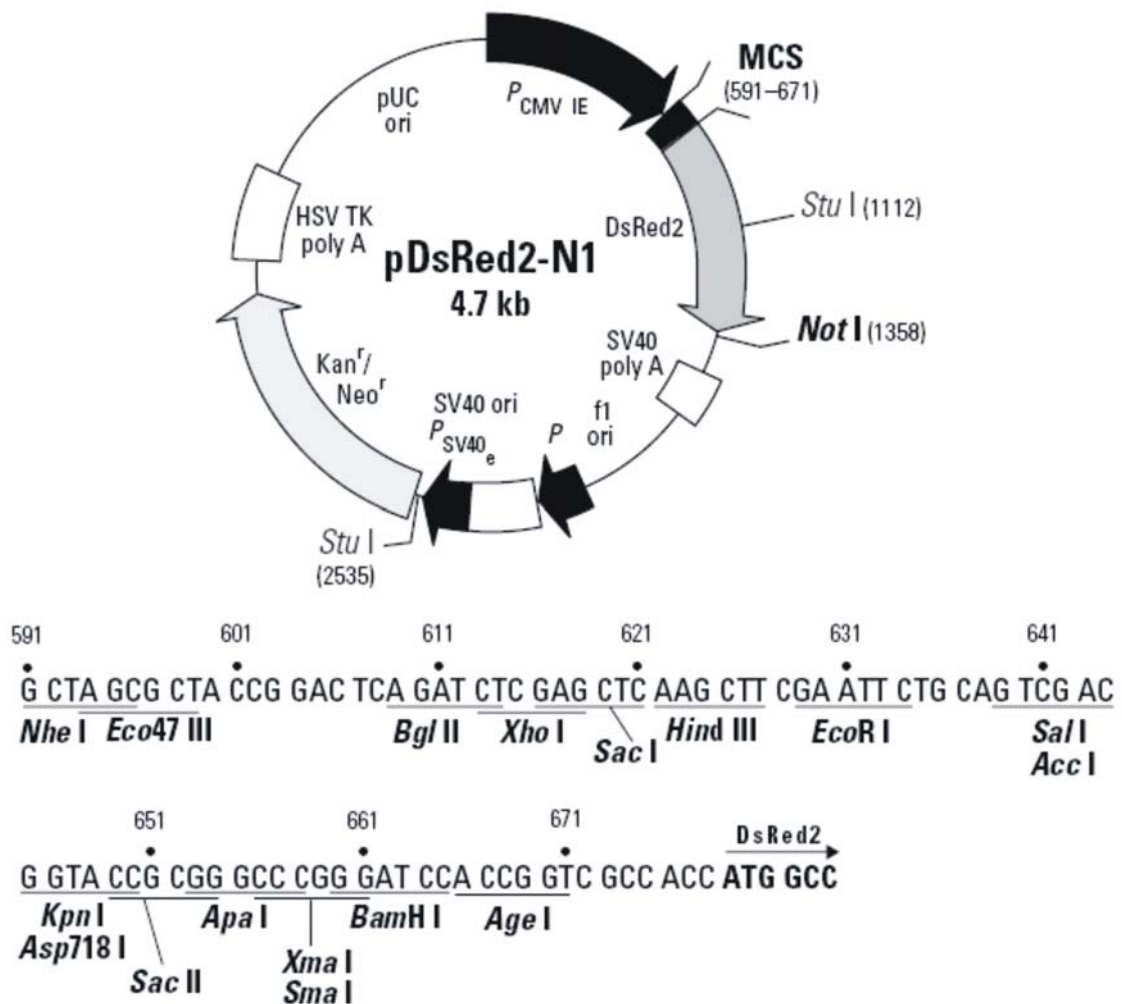
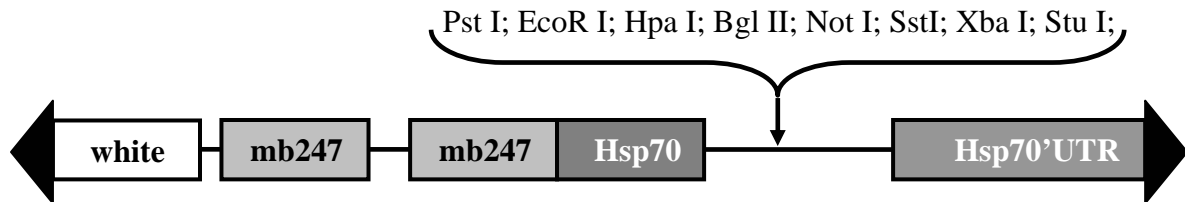


Abb.2.1: Sequenz der multiple cloning site des pDsRED2-N1

### 2.2.2 CaSpeR



**Abb.2.2:** Struktureller Aufbau des CaSpeR-mb247 Vektors (zur Verfügung gestellt von A.Thum)

### 2.3 Medien und Platten

LB - Medium	Bacto-Tryptone	10 g
	Bacto-Yeast Extract	5 g
	NaCl	10 g
	H <sub>2</sub> O	1 l

Das Medium wird mit 1M NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert

LB – Plattenagar	Bacto-Agar	15 g
	LB-Medium (autoklaviert)	1 l

LB/Amp – Platten  
Zum Herstellen von LB/Amp-Platten wird das LB-Medium nach dem Autoklavieren auf 50°C gekühlt und dann mit Ampicillin (Endkonzentration 25 µg/ml) versetzt.

Apfelsaft – Platten	Agar	30 g
	H <sub>2</sub> O	1 l
	Saccharose	33 g
	Apfelsaft	330 ml

Agar und Wasser werden zusammen aufgekocht und auf ca. 60°C abgekühlt, dann wird der Zucker im Apfelsaft aufgelöst und in den abgekühlten Agar gegeben.

## 2.4 Chemikalien

Acrylamid, reinst	Serva
Agarose	Appligene
Ammoniumacetat	Roth
Ampicillin	Sigma
Bacto-Agar	GIBCO-BRL
Bacto-Tryptone	GIBCO-BRL
Bacto-Yeast Extract	GIBCO-BRL
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Chlorophorm	Ferak
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Di-natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Ferak
DTT (Dithiohreitrol)	Sigma
EDTA	Serva
Eisessig	Ferak
Ethanol p.a.	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Formamid	Serva
Glucose	Merck
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin 99,5%	Roth

Glycerol	Serva
HEPES	Serva
Isoamylalkohol	Roth
IPTG, Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid	Sigma
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid >99,5%	Roth
Kaliumhydrogensulfat	Merck
Magnesiumchlorid	Ferak
Methanol p.a.	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumborhydrid	ega
Natriumchlorid	Ferak
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Ferak
Natriumhydroxyd, 1 N	Ferak
Natriumthiosulfat	Merck
Natronlauge, 1 N	Ferak
Paraformaldehyd	Polyscience, Inc.
Phenol	Merck
Salzsäure, 1 N	Ferak
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva
Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan	Ferak
Triton X-100	Merck
Tween <sup>R</sup>	Merck

## 2.5 Puffer und Lösungen

GTE-Puffer:	Tris/HCl	25 mM (pH 8,0)
	EDTA	10 mM (pH 8,0)
	Nach dem Autoklavieren wurden 50 mM Glucose hinzugefügt.	

PBS:	NaCl	130 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mM
6x Probenpuffer:	Bromphenolblau	0,25 %
	Xylencyanol	0,25 %
	Ficoll	15 % (w/v)
TBE 10X:	Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM
	Borsäure	50 mM
	EDTA (pH 8,0)	2,5 mM
TBST:	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween20	0,05 %
TE:	Tris/HCL (pH 8,0)	100 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
T4-Ligationspuffer:	Tris/HCl (pH 7,5)	250 mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
	DTT	5 mM
	ATP	5 mM
	PEG 6000	35 %
Stoppuffer :	Ficoll	15 %
	SDS	5 %
	Bromphenolblau	0,1 %
	Xylen-Cyanol	0,1 %

## Puffer für Plasmidpräparationen nach Quiagen:

Puffer P1:	RNase A	100 g/ml
	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	auf pH 8,0 einstellen	
Puffer P2:	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Puffer P3:	NaOH	2,55 M (pH 4,8)
Puffer QBT:	NaCl	750 mM
	MOPS	50 mM
	Ethanol	15 %
	Triton X-100	0,15 %
	auf pH 7,0 einstellen	
Puffer QC:	NaCl	1,0 M
	MOPS	50 mM
	Ethanol	15 %
	auf pH 7,0 einstellen	
Puffer QF:	NaCl	1,23 M
	MOPS	50 mM
	Ethanol	15 %
	auf pH 8,2 einstellen	
Acetatlösung:	KAc	5 M
	Eisessig	5 M
	auf pH 4,8 einstellen	

Alkali-SDS-Lösung:	NaOH	0,2 N	
	SDS	1 %	
Injektionscocktail:	24 µg Transformationsvektor und 8 µg des Helferplasmids pUChS $\pi$ $\Delta$ 2-3 werden zusammen gegeben, mit Ethanol gefällt und in 100 µl Injektionspuffer (5 mM KCl; 0,1 mM NaPO <sub>4</sub> ) aufgenommen.		
Trenngel (12 %-ig):	Trenngelpuffer	3,3 ml	
	Acrylamid	5,33 ml	
	H <sub>2</sub> O	4,6 ml	
	APS(10%)	150 µl	
	TEMED	15 µl	
Sammelgel (3,9%-ig):	Sammelgelpuffer	1,25 ml	
	H <sub>2</sub> O	3,1 ml	
	Acrylamid	650 µl	
	APS(10%)	150 µl	
	TEMED	15 µl	
Rinaldini's saline:	NaCl	137 mM	
	KCl	2,68 mM	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,36 mM	
	NaHCO <sub>3</sub>	11,9 mM	
	Glucose	5,55 mM	
RF1-Puffer	RbCl	100 mM	
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM	
	NaOAc	30 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM	
	Glycerin	15 %	pH 5,8



RF2-Puffer	MOPS	10 mM	
	RbCl	10 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM	
	Glycerin	15 %	pH 6,8

## 2.6 Größenstandards für Proteine und DNA-Fragmente

Die Marker wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon Rot) und NEB (Frankfurt am Main) bezogen.

### 2.6.1 Größenstandards für Proteine (MBI)

Prestained Protein Molecular Weight Marker:	118,0 kDA
	79,0 kDA
	47,0 kDA
	33,0 kDA
	25,0 kDA
	19,5 kDA

### 2.6.2 Größenstandards für DNA-Fragmente

MBI-GeneRuler 1kb DNA Ladder:	10000 bp	2500 bp
	8000 bp	2000 bp
	6000 bp	1500 bp
	5000 bp	1000 bp
	4000 bp	750 bp
	3500 bp	500 bp
	<b>3000 bp</b>	250 bp

NEB2-Log DNA-Ladder:	10000 bp	900 bp
	8000 bp	800 bp
	6000 bp	700 bp
	5000 bp	<b>600 bp</b>
	4000 bp	500 bp
	<b>3000 bp</b>	400 bp
	2000 bp	300 bp
	1500 bp	200 bp
	1200 bp	100 bp
	<b>1000 bp</b>	

## 2.7 Modifizierende Enzyme

Calf Intestine Phosphatase, CIP	Böhringer
Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP	USB
RNaseA	Sigma
T4-Ligase	MBI

Die aufgeführten Enzyme wurden jeweils mit den mitgelieferten Puffern verwendet und die von den Herstellern empfohlene Konzentration eingehalten.

Die in dieser Arbeit benutzten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen GIBCO, Boehringer, MBI und NEB bezogen. Auch bei diesen wurden die mitgelieferten Puffer in den angegebenen Konzentrationen verwendet.

## 2.8 Antikörper

Primäre Antikörper:	nc82 (monoklonal)	Hofbauer, A. 1991
	AntiGFP (polyklonal)	Clontech
	Anti-TH (polyklonal)	Pelfreeze
	Anti-Dopamin (polyklonal)	MobiTec
Sekundäre Antikörper:	Alxa 448	MoBiTec
	Cy3	dianova
	HRP	gekoppelte goat anti-rabbit antibody

## 2.9 Immunhistochemische Lösungen

Formaldehydlösung (4 %):	Paraformaldehyd	2 g
	→ in 18 ml dH <sub>2</sub> O, auf 58°C erhitzen bis milchige Lösung entsteht, dann mit 1 M NaOH klären und mit	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,15 M)	25 ml
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,15 M)	6 ml
Glutaraldehydsg. (1,25 %):	Glutaraldehyd	
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1 %
<i>Drosophila</i> -Ringer:	NaCl	7,48 g
	KCl	0,35 g
	CaCl <sub>2</sub>	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,105 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,048 g
	→ mit 0,15 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> auf pH 7,4 einstellen und mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen	
PBS:	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,15 M)	1,48 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,15 M)	0,43 g
	NaCl	7,2 g
	→ in 1 l d H <sub>2</sub> O lösen und mit NaOH auf pH 7,6 einstellen	
PBST:	PBS	1 l
	Triton-X100	1/3 ml
TBS:	Tris/HCl	6,06 g
	→ in 50 ml dH <sub>2</sub> O lösen	
	HCl	40 ml
	→ auf pH 7,6 einstellen und auf mit dH <sub>2</sub> O auf 100 ml	
	PBS	900 ml

TBST:	TBS	1000 ml
	Triton-X100	1 ml
NaBH <sub>4</sub>	1 % in PBS	

## 2.10 Stammlösungen

Ampicillin:	15 mg/ml
Kanamycin:	15 mg/ml
Ethidiumbromid:	1 mg/ml
RNase A:	10 mg/ml

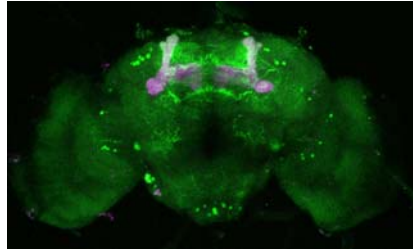
## 2.11 Geräte

Backofen	Memmert
Binokulare	Leica / Zeiss
CO <sub>2</sub> Anlage	Institutswerkstatt
Fastblot-Kammern	Biometra
Gelkammern	Institutswerkstatt
Homogenisator	Institutswerkstatt
Wasserbad	GFL
Magnetrührer	JKL
Mikropipette	Gilson / Eppendorf
Mikrowelle	Moulinex
Multigelkammer	Biometra
Netzgeräte	Institutswerkstatt
Optische Geräte	Zeiss / Leica
pH-Meter	Hanna-Instruments
Rotoren JA10 und JA20	Beckmann
Schüttler	JKL
Thermoblock	Liebisch

Waagen	Analysenwaage	Sartorius
	Normalwaage	Kern
Zentrifugen	Kühlzentrifuge	Beckmann
	Tischzentrifuge	Eppendorf
Rasierklingenbrecher		FST
Uhrmacherpinzetten		Dumont

## 2.12 Verbrauchsmaterial

Filterpapier 3MM	Whatman	( Schleicher-Schüll, Dassel)
Fotomaterial	Entwickler	Kodak
	Fixierer	Kodak
	Scientific Imaging Film	Kodak
Parafilm		American National Can
Petrischalen		Greiner
Polypropylenröhrchen (12; 50 ml)		Greiner
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml)		Eppendorf
Plastikdeckgläschen, 2 x 2 cm		Plano
Rasierklingen		EMS
Dentalkleber		Protemp
Minutiennadeln		FST



### 3. Methoden

#### 3.1. *Drosophilazucht*

##### 3.1.1. Nährmedien zum Züchten von *Drosophila*

Es wurden 212 g Maismehl in 750 ml Wasser aufgekocht und über Nacht zum Quellen stehen gelassen. Der gequollene Maisbrei wurde mit 40 ml Zuckersirup und 40 ml Malz versetzt und erneut aufgekocht. 18,5 g Trockenhefe, 7,0 g Agar und 10,0 g Sojamehl wurden in 150 ml Wasser gelöst und in den kochenden Brei gerührt. War der Brei auf ca. 80°C abgekühlt, wurde ein Teelöffel Methyl-4-hydroxybenzoat als Fungizid zugegeben. Der noch flüssige Brei wurde dann ca. 2 cm hoch in Plexiglasgefäße gegossen und die Gläser wurden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

##### 3.1.2. *Drosophila* – Kulturen

Die *Drosophila* Stämme wurden in kleinen Plexiglasgefäßen auf Standardmedium (siehe 3.1.1) und definierten Licht-Dunkel-Zyklus bei 18°C, beziehungsweise bei 25°C gehalten. Bei 25°C-Haltung wurden die Tiere circa alle zwei Wochen umgesetzt, während man bei 18°C-Haltung die Fliegen nach ungefähr einem Monat umsetzen musste.

## **3.2. Bakterienkultur**

### **3.2.1. Plattenkultur von Bakterien**

Zur Selektion von Plasmidklonen wurden Oberflächenkulturen auf Agar-platten verwendet. Man erhielt die Einzelkolonien indem man die Bakterien-suspension mittels einer sterilen Impföse auf der Agarplatte ausstrich. Die so ausgestrichenen Bakterien wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.2.2. Submerskultur von Bakterien**

Zum Animpfen von Flüssigmedien wurden bei Klein-, oder Starterkulturen Einzelkolonien mittels einer Impföse übertragen. Bei Großkulturen von 200ml-500ml Volumen wurde hierfür ungefähr 1 ml einer frischen Starterkultur dem Flüssigmedium hinzu pipettiert. Kleine Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzröhrchen in einem vertikal rotierenden Inkubationsgerät bei 37°C inkubiert. Großkulturen bis zu 500 ml Volumen wurden in sterilen 2000ml-Erlenmeyerkolben auf einem Horizontalschüttler mit 200 rpm über Nacht inkubiert.

### **3.2.3 Lagerung der Bakterienkulturen**

Mussten die Bakterien nur für kurze Zeit gelagert werden, so konnte man die meisten Bakterienstämme auf den Kulturplatten bei circa 4°C aufbewahren. Um die Risiken einer Kontaminierung möglichst gering zu halten, wurden die Kulturen mit einem Parafilm verschlossen.

Zur Lagerung für längere Zeit wurden Glycerinkulturen angelegt, die über mehrere Jahre haltbar sind. Hierfür wurden 0,8 ml einer flüssigen Kultur entnommen, die sich zu diesem Zeitpunkt noch in der Exponentialphase des Wachstums befand, auf 15% v/v Glycerinkonzentration eingestellt und die Lösung bei –80°C aufbewahrt.

### 3.3 DNA-Klonierungstechniken

#### 3.3.1 DNA-Isolation aus Bakterien

##### 3.3.1.1 Qiagen Plasmid-Minipräparation

Diese Methode besteht aus einer Kombination aus alkalischer Lyse und Adsorption von DNA an ein Silika-Gel. Dabei wird die DNA nicht gefällt, sondern an das Gel gebunden und anschließend mit einem Niedrigsalzpuffer (Z.B. ddH<sub>2</sub>O) bei pH 7,0-8,5 eluiert. Die so gewonnene Plasmid-DNA besitzt eine sehr hohe Reinheit und kann auch für empfindliche Reaktionen wie Sequenzierungen oder *in vivo* Expressionen eingesetzt werden. Die Qiagen Plasmid-Minipräparation wurde nach dem Protokoll des Hersteller durchgeführt. Eluiert wurde mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O, was normalerweise zu DNA-Konzentrationen zwischen 100 und 150 ng/µl führte.

##### 3.3.1.2 Qiagen-Plasmid-Maxipräparation

Das Verfahren für den Zellaufschluss sowie die Abtrennung der Zellbestandteile von der chromosomalen DNA erfolgt analog zur Plasmid-Minipräparation. Die Zellen einer 250 ml Übernachtskultur, die in LB-Medium + Ampicillin gewachsen ist, wird bei 5000 rpm für 30 min abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml P1-Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 10 ml P2-Puffer und vorsichtigem Mischen werden 10ml P3-Puffer hinzugegeben und das Gemisch für 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wird vorsichtig auf die zuvor mit QBT-Puffer äquilibrierte Quiagen-Säule gegeben. Danach wird die Säule mit 30 ml QC-Puffer gewaschen, wobei kontaminierende Proteine sowie RNA aus der Säule entfernt werden. Zum Abschluss wird nun die Plasmid-DNA mit 15 ml 65°C warmen QF-Puffer aus der Säule eluiert und nach Zugabe von 10,5 ml Isopropanol bei 14000 rpm und 4°C für 30 min pelletiert. Das Pellet wird mit 70% Ethanol vorsichtig gewaschen und luftgetrocknet. Im Anschluss daran wird das Pellet in 500 µl 50°C warmen Wasser aufgenommen. Die Ausbeute bei diesem Verfahren liegt zwischen 500 und 1500 µg.



### 3.3.2 Reinigung von DNA

#### 3.3.2.1 Phenolextraktion

Zur Reinigung der DNA von Proteinen wurde das Volumen der DNA-Lösung mit TE auf 200 µl erhöht und 400 µl Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol, in einem Mischungsverhältnis 25:24:1, hinzugegeben und gemischt. Durch fünfminütiges zentrifugieren bei 14000 rpm wurde eine klare Phasentrennung erreicht. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Chlorophorm:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach einer Wiederholung des vorangegangenen Schrittes folgte eine fünfminütige Zentrifugation nach welcher die obere wässrige Phase überführt und anschließend mit Ethanol gefällt wurde.

#### 3.3.2.2 Ethanolfällung:

Zur Entfernung von Salzen oder um DNA-Lösungen zu konzentrieren, kann DNA selektiv gefällt und dann in dem gewünschten Volumen TE oder ddH<sub>2</sub>O wieder aufgenommen werden.

Zu der DNA-Lösung gab man  $\frac{1}{10}$  Volumen Natriumacetat (pH=5,3) und ein 3-faches Volumen an 100%-igem Ethanol. Der Ansatz wurde gut gevortext und über Nacht bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die dabei ausgefallene DNA 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Pellet luftgetrocknet und in 20 µl 50°C warmen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.3.3 Restriktionsanalyse von DNA

Restriktionsenzyme schneiden DNA an bestimmten Basensequenzen und erzeugen somit ganz charakteristische DNA-Fragmente. Der Verdau wurde in einem Volumen von 50µl und einer DNA-Konzentration von ca. 200 ng/µl durchgeführt.

In Abhängigkeit von der Reinheit der DNA wurden entsprechende Enzymeinheiten zum Restriktionsansatz gegeben und dieser bei 37°C für 1-3 Stunden inkubiert. Die so verdaute DNA konnte anschließend durch Gelelektrophorese nach Fragmentgröße aufgetrennt werden.

Allgemeiner Ansatz für einen Restriktionsverdau:

DNA	
Restriktionspuffer 1x	
1U Enzym / $\mu\text{g}$ DNA	
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu\text{l}$

### 3.3.4 Gelelektrophorese

#### 3.3.4.1 Analyse von DNA auf Agarosegelen

Die Auftrennung von relativ großen DNA-Fragmenten erfolgt in Agarose-TBE-Gelen, wobei die Konzentration der Agarose entsprechend der erwarteten Größe der zu trennenden Moleküle von 0,4 bis 2% variieren kann.

*0,6% Agarosegele → Trennung von Fragmenten zwischen 20 und 2 kb*

*0,8% Agarosegele → Trennung von Fragmenten zwischen 10 und 1 kb*

*1,0 %Agarosegele → Trennung von Fragmenten zwischen 8 und 0,5 kb*

*1,5% Agarosegele → Trennung von Fragmenten zwischen 3 und 0,2 kb*

*2,0% Agarosegele → Trennung von Fragmenten zwischen 2 und 0,1 kb*

Da die erwarteten Fragmentgrößen immer zwischen 8 und 0,5 kb lagen wurden in der Regel 1%-ige Agarosegele verwendet.

Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C in einen horizontalen Gelschlitten mit einem Taschenkamm gegossen. Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur nach ungefähr 20 min. Nachdem das Gel fest war, wurde der Taschenkamm entnommen und das Gel in einer horizontalen Laufkammer montiert und mit TBE überschichtet.

Die Proben wurden zu  $\frac{1}{6}$  mit 6x Stopppuffer versetzt und in die Taschen des Gels gegeben. Der Stopppuffer enthielt Bromphenolblau und Xylencyanol, die als Laufmarker verwendet wurden. Die angelegte Spannung beträgt 100 V. Zum sichtbar

Machen der Banden unter UV-Licht wurde das noch flüssige Gel mit 2  $\mu\text{l}$  pro 50 ml Ethidiumbromid versetzt.

### 3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DANN

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen wird das Absorptionsspektrum bei 260 nm gemessen. Gemessen wurde eine 1:100 Verdünnung gegen einen entsprechenden Leerwert. Bei 260 nm entspricht ein OD-Wert von 1,0 in etwa folgenden Nukleinsäurekonzentrationen:

OD<sub>260</sub> entspricht 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dsDNA  
20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Oligonukleotide

Die Konzentration der Messlösung wurde so eingestellt, dass die OD<sub>260</sub>-Werte unter 1 lagen. Über den Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bei Aufnahme des Wellenspektrums von 220-320 nm ließ sich die Reinheit der DNA bestimmen. Der Quotient sollte dazu ungefähr 1,8 sein.

### 3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

#### 3.3.6.1 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Mit einer Restriktionsendonuklease linearisierte Plasmide, die für die Klonierung von DNA-Fragmenten eingesetzt werden sollen, wurden mit alkalischen Phosphatasen aus Kälberdarm (calf intestine phosphatase, CIP) oder Garnelen (shrimp alkaline phosphatase, SAP) dephosphoryliert, um eine intramolekulare Selbstligation zu verhindern. Zunächst wurde ein Dephosphorylierung mit CIP versucht, da diese aber erfolglos war wurde im nächsten Versuch die SAP verwendet.

Dephosphorylierung mit CIP:

DNA	0,5-5 pmol
CIP-Puffer	
CIP	1-2 u

60min Inkubation bei 37°C

Die Reaktion wird mit 20 mM EDTA (f.c.) gestoppt, 15 min zur Denaturierung der Phosphatase auf 68°C erhitzt und die DNA phenolgereinigt.

Dephosphorylierung mit SAP: Nach Beendigung des Restriktionsverdau des Plasmids wird dem Reaktionsansatz 0,1 u SAP zugesetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wird der Ansatz 15 min auf 68°C erhitzt.

### 3.3.6.2 Ligation von DNA

T4-Ligase verknüpft zwei DNA-Moleküle, wenn das eine am 3'-Ende eine OH-Gruppe, und das andere am 5'-Ende eine  $\text{PO}_4^{2-}$ -Gruppe trägt. Als Cofaktor wird ATP benötigt. Die T4-Ligase verknüpft sowohl überhängende als auch stumpfe Enden gleichermaßen.

In Abhängigkeit der verwendeten DNA wurden ca. 100 ng des dephosphorylierten Vektors und ein etwa 3-facher molarer Überschuss des zu ligierenden Fragments in einem 10-20 µl-Ansatz inkubiert:

linearisierte Vektor-DNA	0,2 µg
Insert-DNA	0,6 µg
Ligationspuffer	2 µl
1u T4-Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Ligation erfolgt bei 18°C über Nacht.

### 3.3.7 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

#### 3.3.7.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden zunächst 100 ml in einem 1 l Kolben mit XL-Blue1 Zellen angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD von 0,5 inkubiert. Danach wurde die Suspension in Zentrifugierröhrchen überführt, 15 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 33 ml RF1-Lösung resuspendiert, für 15 min auf Eis gekühlt und 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnten die Bakterien in 8 ml RF2-Puffer aufgenommen und aliquotiert werden.

#### 3.3.7.2 Hitzeschock-Transformation

Die Bakterien wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut und zu den aufgetauten Zellen 10 bis 20 ng DNA hinzugegeben und weiter 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und sofort danach wieder auf Eis abgekühlt. Die eben transformierten Zellen wurden schließlich in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 2 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurden 200 µl der Zellen dem Medium entnommen und auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen, die restlichen 800 µl wurden abzentrifugiert und zunächst dem Überstand wiederum 200 µl entnommen und ausplattiert. Der Rest des Überstandes wurde verworfen bis auf 200 µl oberhalb des Pellets. Dieses wurde ebenfalls ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 3.3.8 Keimbahntransformation

#### 3.3.8.1 Durchführung der Injektion

Die Fliegen ( $w^{1118}$ ; siehe 2.1.2) wurden zunächst für 1 h auf die Eiablageplatten (siehe 2.3) gesetzt und die gelegten Eier wurden dann verworfen. In die Mitte von jeder Platte wurde ein Tropfen in Wasser gelöste Hefe gegeben. Für die Injektion durften die Eier nicht älter als 1 h 30 min sein. Deshalb wurden die Eier nach 30 min abgesammelt und sofort bei 18°C weiterverarbeitet. Im nächsten Schritt wurden die Eier mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe (Abb.3.2) auf einen Filter übertragen, zum

Dechorionieren 70 s mit 7%-igem Natriumhypochlorid beschichtet und gut mit Wasser abgespült. Unter dem Binokular wurden nun die ca. 100 Eier in einheitlicher Anterior-Posterior-Ausrichtung aufgereiht und auf einen, mit Heptankleber behandelten, Objektträger übertragen. Unter dem Gitternetzfilter sollte während des Aufreihens ein feuchtes Whatmanpaper liegen, um die Eier vor dem Austrocknen zu schützen. Die auf den Objektträger übertragenen Eier wurden nun für 25 min zum Trocknen auf Silicagel überführt und anschließend mit Voltalef 10S-Öl überschichtet. Zum Injizieren wurden die Objektträger so unter dem Mikroskop positioniert, dass die Eier mit dem posterioren Pol in Richtung der Injektionsnadel (siehe 2.11) zeigten. Sowohl Embryonen als auch Injektionsnadel mussten nun in die gleiche Fokusebene gebracht werden. Die Nadel sollte vorsichtig in die Mitte des posterioren Pols die Vitellinmembran durchstechen und nur ganz wenig in den Embryo eindringen. Bei der Injektion sollte darauf geachtet werden, dass sich die innere Membran an die äußere schmiegt, aber keinerlei Zellinhalt des Embryos aus dem Ei läuft. Ziel war es das DNA-Konstrukt in die Keimbahn zu integrieren, daher mussten Embryonen mit schon ausgebildeten Polzellen abgetötet werden. Bis zum Schlüpfen der Larven wurden die Objektträger bei 18°C in eine Feuchtkammer gelegt und die geschlüpften Larven in kleine Breigläser transferiert.

### 3.3.8.2 Kreuzung der injizierten Fliegen

Jede geschlüpfte Fliege ( $G_0$ -Generation) wurde mit 3 Fliegen des Ausgangsstammes ( $w^{1118}$ ) gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzung ( $G_1$ -Generation) wurden auf rote Augen untersucht. Fliegen der  $G_1$ -Generation mit roten Augen wurden durch Kreuzung mit dem Ausgangsstamm vermehrt.

## 3.3.9 Proteinchemische Methoden

### 3.3.9.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamidketten, deren Länge und Vernetzungsgrad den Grad der Molekülauftrennung bestimmen. Zur Denaturierung der Proteine wird SDS in das Gel zugegeben. Die Proteine werden durch Anlegen einer elektrischen Spannung der Größe und Ladung nach aufgetrennt. Damit aber die

Auftrennung lediglich der Größe nach und nicht nach ihrer Ladung abläuft, werden die Proben vor dem Auftragen mit 2x Laemmli-Puffer (nach Laemmli, 1970; siehe 2.5) versetzt, der eine Absättigung der Proteine mit SDS bewirkt. Proteingele bestehen aus einem oberen großporigen Sammelgel und einem unteren feinmaschigen Trenngel. Außerdem unterscheiden sich die zwei Gele auch in pH-Wert und Pufferzusammensetzung. Zwei saubere, fettfreie Glasplatten, die zuvor mit Ethanol gereinigt worden waren, wurden durch Spacer getrennt, an den Kannten mit Klammern zusammengehalten und vertikal aufgestellt. Zuerst wurde das Trenngel (siehe 2.5) gegossen. Dabei wurde erst ganz am Schluss APS und TEMED dazu gegeben, da diese das Gel polymerisieren. Waren alle Substanzen vermischt, wurden diese noch einmal gut gemischt und dann in die Kammer gegossen. Um eine möglichst glatte Trennfläche zum Sammelgel zu erhalten, wurde das Gel mit Wasser gesättigtem n-Butanol überschichtet. Dieses wurde abgegossen, sobald das Gel nach ca. 30 min ausgehärtet war und Reste wurden vorsichtig mit einem Whatmanpaper abgenommen. Danach wurde das Sammelgel (siehe 2.5) zusammenpipettiert, auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zwischen die Glasplatten geschoben, der im Gel die späteren Beladungskammern ausspartete. Nach ungefähr 30 min war auch das Sammelgel ausgehärtet und Spacer und Kamm konnten entfernt werden. Das Gel konnte nun in eine vertikale Gelelektrophoresekammer eingespannt werden und die Pufferreservoirs der Kammer konnten mit SDS-Puffer gefüllt werden. Dabei war darauf zu achten, dass sich keinerlei Luftblasen zwischen den Glasplatten verfangen, da diese die Laufcharakteristika des Gels verändern. Die Proteinproben wurden mit 1x Laemmli-Puffer versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Pro Beladungstasche wurden 20 µl der Proben aufgetragen. Die Kammer wurde mit einem Umlaufsystem gekühlt, sodass man ein Gel bei ca. 25 mA in 1-2 h durchlaufen lassen konnte.

### 3.3.9.2 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose (Western-Blot)

Zum Transfer von Proteinen aus dem Gel auf eine Nitrocellulose bedient man sich des Semi-Dry-Electroblotting-Verfahrens von Kyhse-Anderson, 1984. Bei dieser Technik werden das Gel und die Membran zwischen jeweils dreilagige Schichten aus, mit Blotpuffer getränkten, Whatmanfilter gelegt und dieses „Sandwich“ wird einem homogenen elektrischen Feld ausgesetzt. Dabei wandern die Proteine aus dem Gel

in die Membran und binden dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit einer ungefähren Kapazität von 50-200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Whatmanpaper und Nitrocellulosemembran wurden auf Gelgröße zurecht geschnitten und in folgender Reihenfolge luftblasenfrei angeordnet. Zuerst wurden drei in Blottransferpuffer getränkte Whatmanpaper auf die Anodenseite der Blot Apparatur gelegt. Hierauf legte man die Nitrocellulosemembran, die ebenfalls in Blottransferpuffer getränkt worden waren. Auf die Membran wurde das Gel gelegt und mit drei Whatmanpapern bedeckt. Das ganze System wird dann von der Kathode der Apparatur verschlossen (siehe Abb.3.4). Die Stromstärke der Apparatur wurde auf 5  $\text{mA}/\text{cm}^2$  Gelfläche eingestellt, wobei die maximale Leistung des Gerätes bei 10 W liegt. Bei einer Gelgröße von 11x6 cm, also einer Stromstärke von 660 mA, musste also darauf geachtet werden, dass nie mehr als 15 V erreicht wurden. Die Größe der Cameleon Proteine beträgt ca. 80 kD, so dass eine Blot-Zeit von 1h bei 100 mA benötigt wurde. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrozellulose so markiert, dass das ursprüngliche Beladungsschema des Gels nachvollziehbar blieb. Anschließend wurde die Nitrozellulose für 2 h in 1%-igem BSA inkubiert um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Der Nitrozellulose wurde in PBS (3 x 10 min) gewaschen und über Nacht mit dem ersten Antikörper  $\alpha$ -GFP (Clontech; 1:100 in PBS/1% BSA-Lösung verdünnt) bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden anschließend durch Waschen in PBS (3 x 10min) entfernt. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe von enzymgekoppelten (Meerrettich-Peroxidase) Zweitantikörpern nachgewiesen, der 1:10000 in PBS/1% BSA-Lösung verdünnt war. Dazu wurde die Nitrozellulose für 2 h bei RT in der Antikörperlösung inkubiert. Es folgten drei Waschschritte von jeweils 10 min mit PBS. Die gebundenen Sekundärantikörper wurden mit dem „enhanced chemical luminescence-Detektionssystem“ (ECL, Amersham Buchler, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers detektiert.

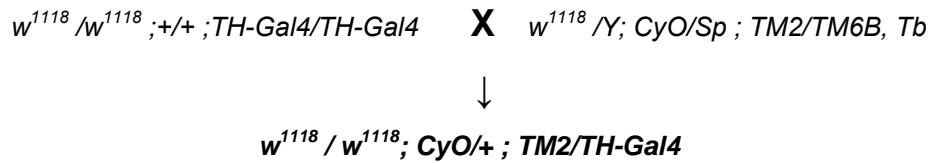
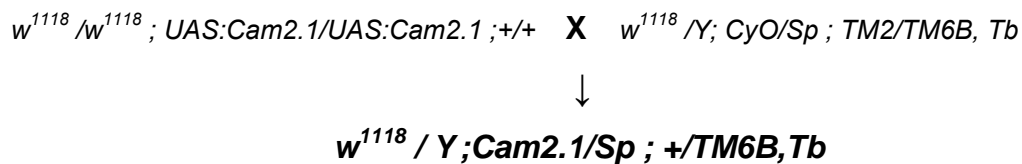
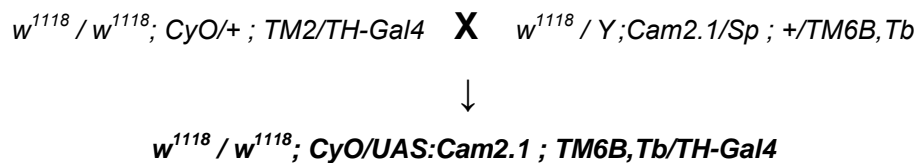
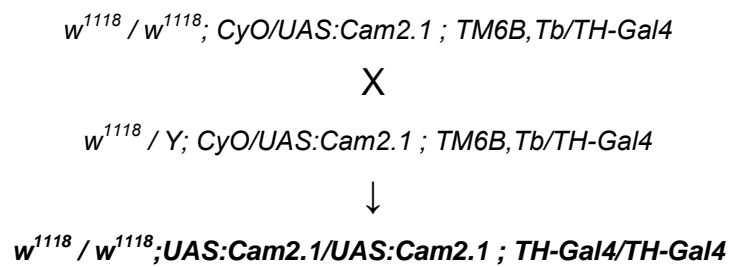


### **3.4 Kreuzungen zur Lokalisation von Insertionen im Genom**

Um eine Aussage über die Anzahl von Insertionen und deren Lokalisation machen zu können, wurden Fliegen über Balancerstämme Kreuzungen unterzogen. Hierbei wurde zunächst der zu untersuchende Fliegenstamm gegen einen Doppelbalancer für das 2. und 3. Chromosom gekreuzt. Und die Nachkommen dieser Kreuzung gegeneinander rückgekreuzt, wobei darauf zu achten war, dass jeweils für jedes Chromosom der komplementäre Marker zu seinem Partner verkreuzt wurde. Entsprangen dieser Kreuzung Fliegen, die wieder alle vier Marker aufzeigten, jedoch rote Augen hatten war davon auszugehen, dass es sich hierbei um zumindest eine Insertion auf dem x-Chromosom handelte. Wurden nur weißäugige Fliegen mit allen vier Markern erhalten, so war das x-Chromosom auszuschließen. Das zweite und dritte Chromosom wurde jeweils über die ihnen spezifischen Balancer untersucht. Auch hier wurden die Ausgangsfliegen zunächst gegen den jeweiligen Balancerstamm gekreuzt, und die Nachkommen dieser Kreuzung wieder gegen ihren komplementären Partner (den Marker betreffend). Über die prozentuelle Verteilung der Fliegen mit beiden Markern und roten bzw. weißen Augen konnte die Lokalisation auf die anderen beiden Chromosomen festgelegt werden.

### **3.5 Kreuzung zum Erhalt stabil exprimierender Fliegen**

Für die Versuche zur Charakterisierung des dopaminergen Systems war es wichtig eine möglichst hohe Fluoreszenz in den Zielneuronen zu erreichen. Hierfür wurden die Treiberlinien mit den UAS-Linien nach dem folgend dargestellten Schema kombiniert. Die homozygoten Fliegenstämme, mit jeweils einer Kopie der Insertion auf einem Chromosom wurden gegen einen Balancerstamm gekreuzt, der je zwei Selektionsmarker auf jedem Chromosom zeigen und jeweils im homozygoten Zustand letal wären. Aus dieser Kreuzung wurde Fliegen erhalten, die Heterozygot für je einen der Balancer pro Chromosom waren und ebenso heterozygot für eine der Insertionen und ein Wildtypallel. Auf Grund des Wildtyp Allels war im nächsten Schritt der Kreuzung darauf zu achten die einzelnen Kreuzungen auf unterschiedliche Marker zu selektieren und diese dann miteinander zu verkreuzen.

**Kreuzungsschritt A1:****Kreuzungsschritt A2:****Kreuzungsschritt B:****Kreuzungsschritt C:**

## 3.6 *In vivo* Calcium Imaging

### 3.6.1 *in-vivo* Präparation der Fliegen

6-10 Tage alte Fliegen wurden über den Kopf und Thorax an einem mit einer Plastikfolie versehenen Plastikdeckgläschen mittels eines 3-Komponentendentalklebers fixiert, wobei darauf zu achten war, dass die Antennen und Beine des Tieres frei blieben. In die Kopfkapsel der so fixierten Fliege wurde unter Ringer ein quadratisches Loch präpariert, das so den optischen Zugang zum zentralen Nervensystem ermöglichte (Fiala & Spall, 2003). Um die verwendeten Calcium Sensoren nicht auszubleichen wurde die Präparation unter Verwendung eines Rotlichtfilters durchgeführt. Bei der Präparation war besonders darauf zu achten, dass nach Entfernung der Kopfkapsel eigenfluoreszierendes Gewebe, das die spätere Messung beeinträchtigen könnte, wie Tracheen, Luftsäcke oder Fettgewebe aus dem Zielbereich der Messung entfernt wurden.

### 3.6.2 Komponenten der Imaging Messapparatur

- Mikroskop: Axioskope 2FS plus, Zeiss, Deutschland
- Lichtquelle: Visichrom high-speed polychromator system: Xenon Bogenlampe 75 W, Visitron Systems, Pulchheim, Deutschland
- Objektiv: Wasserimmersionsobjektiv, 40x, Achromplan, Zeiss, Deutschland
- CCD-Kamera: Cool-Snap HQ, Auflösung: 1280 x 960 Pixel, Roper Scientific, Tuscon, USA
- Messrechner: Lynx, 3GHz, Reulingen, Deutschland
- Filtersatz: Dichroitischer Langpassfilter 455 – 470 nm, Chroma, Brattleboro, VT
- Strahlenleiter: dichroitischer Langpassfilter 505 – 515 nm; 485/40 nm Emissionsfilter; 535/30 nm Emissionsfilter, Optical Insights, Santa Fe, USA
- Z-Stepper: NV 40/1CL, Piezosystem Jena, Jena, Deutschland

### 3.6.3 Imaging Apparatur

Die für diese Arbeit verwendete Messapparatur wurde von der Firma Visitron Systems (Puchheim, Deutschland) bezogen und besteht aus sechs Komponenten: einem Messrechner zur Aufnahme der Daten, einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop, eine Monochromatorlichtquelle, einer gekühlten CCD (charged coupled device) Kamera, deren Chip zur simultanen Registrierung der Bilder und einem Z-stepper, der es ermöglicht, im  $\mu$ -Abstand verschiedene Ebenen des Gehirnes zu messen. Die Aufnahmen wurden ausschließlich mit Hilfe des Programms Metafluor durch geführt. Dieses Programm kontrolliert auch die weiteren zur Messung benötigten Geräte, wie zum Beispiel das Olfaktometer für die Duftstimulation der Fliege.

#### **Messungen der FRET basierenden Sensoren:**

Eine präparierte Fliege wurde mit frischer Ringerlösung überschichtet und unter einem 40x Wasserimmersionsobjektiv fixiert. Mit Hilfe eines Monochromators wurde das Cameleon 2.1 bei der Wellenlänge 436 nm angeregt (dichroitischer Langpassfilter: 455 nm), welches bei einer Wellenlänge von 485 nm für ECFP und 535 nm für EYFP emittierte. Die emittierten Wellenlängen des ECFP und des EYFP können diesen Langpassfilter passieren und werden schließlich von einem zweiten dichroitischen Langpassfilter (505 nm – 515 nm) in ihre beiden Komponenten aufgeteilt. Bevor das Licht auf den CCD-Chip projiziert wird passieren nun die Strahlen einen 485/40 nm für ECFP und einen 535/30 nm Bandpassfilter für EYFP. Die getrennten emittierten Strahlen werden auf einem virtuell geteilten CCD-Chip (max. Auflösung: 1392 – 1040 Pixel) projiziert, sodass eine Hälfte die Fluoreszenz des EYFP und die andere die des ECFP registriert.

#### **Messung der zirkulär permutierten Sensoren:**

Für die Messung der zirkulär permutierten Sensoren wurde die selbe Apparatur verwendet wie zur Messung der oben angeführten FRET basierenden Sensoren. Die Sensoren G-CamP1.3 / 1.6 mussten jedoch bei einer Wellenlänge von 472 nm mit dem Monochromator angeregt werden. Die hier verwendeten zyklisch permutierten Sensoren emittieren bei einer Wellenlänge von 495 nm. Ein Strahlenteiler ist bei diesen Sensoren nicht von Nöten, weswegen dieser für die Messungen mit diesen

Sensoren entfernt wurde. Das emittierte Licht wurde durch einen dichroitischen Spiegel geleitet und ein 525 nm  $\pm$  25 nm Emissionsfilter verwendet wurde.

#### **3.6.4 Experimente zur Depolarisierung mit Kaliumchlorid und Kaliumglukonat**

Um die allgemeinen kinetischen Eigenschaften der Sensoren zu untersuchen wurden zunächst die Salze KCl und KGluk (je 1 M in Ringer gelöst) verwendet, um das Gehirn der Fliege zu depolarisieren. Hierzu wurden 10  $\mu$ l der Salzlösung in den zwischen Objektiv und Präparat befindlichen Ringertropfen gegeben. Das Kalium hat die Eigenschaft, die Neuronenmembranen zu depolarisieren und führt so zu einem massiven Calciumeinstrom, der durch die verwendeten Sensoren sichtbar wurde. Da die Salzlösung manuell erfolgt, ist der Zeitpunkt der Injektion variabel und die Messung unterliegt keinem automatisierten Protokoll, sondern wird manuell gesteuert.

#### **3.6.5 Experimente zur olfaktorischen Stimulation der Fliegen**

Die verwendeten Düfte (Isoamylacetat, Benzaldehyd, Ethylacetat, Methycyclhexanol) wurden für alle Experimente in der Verdünnung  $10^{-3}$  in Mineralöl verwendet. Je nach Experiment wurden immer zwei dieser Düfte abwechselnd der Fliege präsentiert und zwischen zwei Messungen eine Pause von ca. einer Minute gegeben. Die Düfte wurden mit Hilfe eines Olfaktometers (Spall, 2004) appliziert. Dieses Olfaktometer bietet die Möglichkeit 10 verschiedene Düfte zu applizieren. Die Luftversorgung der Apparatur wird über eine handelsübliche Aquariumspumpe gewährleistet, wobei die Durchflussrate direkt an dieser Pumpe geregelt werden kann. Die Applikation der Düfte wird über elektronische Ventile gesteuert, die unter der Kontrolle des Messrechners stehen (Software MetaFluor). Um eine Kontamination des Messlabors durch die Düfte zu verhindern, wurde das Olfaktometer unter einer Luftabzugshaube montiert.

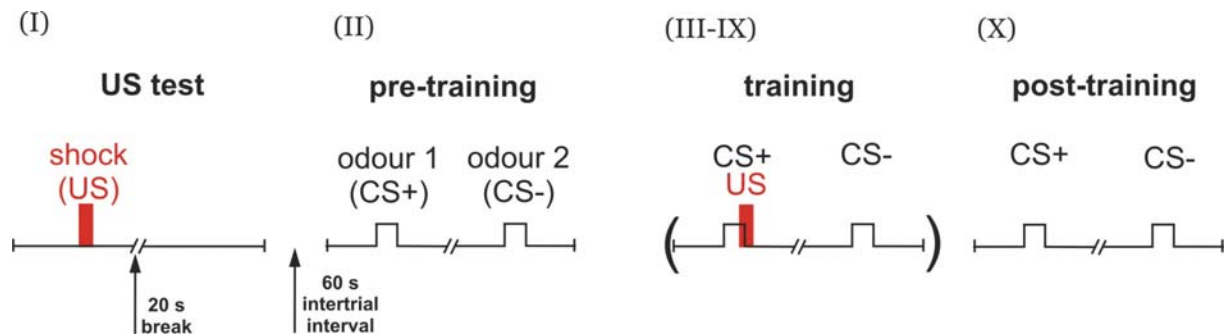
### **3.6.6 Messprotokoll**

Das Messprotokoll besteht aus sich wiederholenden Einheiten, den sogenannten „cycles“, deren Länge durch Einstellung in den „timelaps“ eingestellt wurde und 333 ms betrug. Per „cycle“ wurde simultan je ein Bild für EYFP und ECFP mit einem Binning von 4 und einer Belichtungszeit von 180 ms aufgenommen, so dass eine Bildaufnahmefrequenz von 3 Hz resultierte. Je nach Experiment wurde festgelegt, nach welcher Anzahl von Bildern der Duft präsentiert wurde. Die Dauer der gegebenen Düfte betrug in allen Experimenten 2 s.

### **3.6.7 Experimente zu prädiktiven Eigenschaften dopaminergener Neurone**

Zur Untersuchung der prädiktiven Eigenschaften dopaminergener Neurone wurde folgendes Protokoll verwendet. (Abb.3.1). Ein Experiment war in zwei Durchläufe aufgeteilt, welche insgesamt eine Länge von 99 Cycles hatten. Der erste Durchlauf, bei dem die Fliege mit einem Duft und einem Schock stimuliert wurde, dauerte 49 Cycles, also 16,33 s. Nach einer Vorlaufzeit von 7 s wurde der Fliege für 3 s ein Duft präsentiert und gegen Ende der Duftpräsentation mit einer Sekunde Überlappung die Applikation eines Elektroschocks. Die Applikation des Elektroschocks erfolgte über ein elektrisches Gitter für 2 s mit einer Stärke von 120 V (Gleichstrom) auf das Abdomen und die Tarsen der Tiere, während die Düfte mit der gleichen Apparatur gegeben wurde wie auch bei den Duftexperimenten. Die Applikation des Elektroschocks erfolgte manuell und wurde über ein akustisches Signal angekündigt. Nach diesem Durchlauf folgte eine 20 s Pause und der zweite Durchlauf mit 50 Cycles (16,66 s) wurde durchgeführt. In diesem Durchlauf wurde der Fliege nun nach 7 s ein Kontrollduft präsentiert, der nicht bestraft wurde. Das gesamte Trainingsprotokoll wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. In einem ersten Durchlauf wurden die Tiere zunächst mit einem Elektroschock allein stimuliert, nach 20 s Pause wurde dann ein Kontrolldurchlauf durchgeführt, der eventuelle Spontanaktivitäten ausschließen sollte. Im Anschluss daran wurde den Tieren vor dem Training die nicht bestraften Düfte präsentiert, jeweils in einem Durchlauf mit einer Pause von 20 s dazwischen. Im eigentlichen Training, das sieben mal durchgeführt wurde, wurde nun ein Duft (CS+) mit einem Elektroschock mit 1s Überlappung mit dem Duft gegeben, und nach Ende des Durchlaufs und einer 20s

Pause der Kontrollduft ohne eine zusätzliche Stimulation. Nach Ablauf des Trainings präsentierte man den Fliegen noch einmal die zwei Düfte (CS+ und CS-) ohne den Elektroschock.



**Abb.3.1: Schematische Darstellung der Trainingsdurchläufe:** In einem ersten Durchlauf (I) wird der Fliege zunächst der bestrafende Stimulus in Form eines Elektroschocks (2s) verabreicht, und nach einer 20s Pause, ein weiterer Durchlauf ohne jegliche Stimulation. Im zweiten Teil des Trainings (II) werden der Fliege nun die zwei Düfte alleine präsentiert. Im eigentlichen Training werden nun der Fliege immer abwechselnd die zwei Düfte präsentiert, wobei der eine der beiden immer mit einem Elektroschock mit einer Überlappung von 1s gepaart wird (III-IX). Nach dem Training werden in einem letzten Durchlauf der Fliege beide Düfte ohne Elektroschockpaarung präsentiert (X) (Riemensperger et al., 2005).

Nach Ende des gesamten Experimentes wurde das Gehirn der gemessenen Fliege mit Hilfe eines Kaliumsalzes, KCl oder KGluk, depolarisiert. Hierfür wurden 10 µl des in Ringer gelösten ein molaren Salzes in den Ringertropfen, der das Präparat bedeckt, gegeben. Diese Prozedur wurde nach den Elektroschockexperimenten durchgeführt um sicherzustellen, dass die Neurone bis Ende des Versuches auch noch funktionsfähig waren (Riemensperger et al., 2005; siehe auch: Völler, 2005).

### 3.6.8 Verarbeitung der erhobenen Daten

#### Bildverarbeitung

Zur Auswertung der erhobenen Bilddateien wurde das Programm Metamorph verwendet. Hierzu mussten die einzelnen aufgenommenen Bilder zunächst in die zwei detektierten Fluoreszenzen EYFP und ECFP getrennt gespeichert. Die einzelnen Bilder wurden in einem nächsten Schritt gegeneinander Deckungsgleich angepasst und die so abgeglichenen Bilder zur Weiterverarbeitung verwendet. Zur Verminderung des Hintergrundrauschens wurde eine Region, die nicht Teil der zu

messenden Neuropile war, als Hintergrund abgezogen. Waren die Bilder nun soweit korrigiert, wurden bestimmte Regionen in den zu messenden Neuropilen festgelegt und die Durchschnittsintensitäten dieser Regionen eingelesen, um mit Hilfe des Programmes Microcal Origin weiterverarbeitet zu werden (Riemensperger et al., 2005; siehe auch: Völler, 2005).

### **Erstellung von Falschfarbenbildern**

Zur Visualisierung der räumlichen Verteilung der Signale und deren Intensitäten in den verschiedenen Regionen wurden Falschfarbenbilder erstellt. Wie oben erwähnt, mussten die aufgenommenen Bilder hierfür zunächst korrigiert werden. Dann wurden das arithmetische Mittel über drei Bilder während des Stimulus und über drei Bilder vor dem Stimulus gebildet. Das resultierende Bild während des Stimulus wurde nun vom resultierenden Bild vor dem Stimulus abgezogen und ein Wert von 1000 auf das daraus entstandene Bild addiert. Dies wurde für EYFP und ECFP getrennt durchgeführt und zum Schluss die Ratio gebildet, indem EYFP durch ECFP geteilt und das Ergebnis erneut mit tausend multipliziert wurde. Um die Signalverteilung in den Neuropilen zu verdeutlichen wurden die bearbeiteten Bilder noch über einen Low Pass Filter weiterverarbeitet. Die so behandelten Bilder wurden falschfarbenkodiert, sodass Regionen niedriger Aktivität in dunklen Tönen, wie schwarz oder blau wiedergegeben wurden, und solche hoher Aktivität in Farben von Gelb über rot bis weiß.

### **Datenanalyse**

Da die Fluoreszenzen EYFP und ECFP einem starken Bleichen unterliegen werden die Emissionsintensitäten der einzelnen Regionen von Interesse für EYFP und ECFP werden getrennt von einander zunächst bleichkorrigiert. Das heißt einer Abfallskurve erster Ordnung ( $y = y_0 + A_1 e^{-x/t_1}$ ) angepasst, die in etwa dem Abfall der Fluoreszenzintensität über die einzelnen Durchläufe entspricht. Die Rohdaten der einzelnen Fluoreszenzen wurden also durch diese Funktion geteilt und somit die Daten zum einen normalisiert und zum anderen bleichkorrigiert. Die Werte für EYFP und ECFP, sowie für die Ratio (EYFP/ ECFP) wurden anschließend auf einen Zeitpunkt normiert, welcher der Stimulation direkt voraus ging ( $t=0$ ). Für eine Quantifizierung der Änderung in der Signalstärke bzw. Signaldauer vor, während und



nach der Stimularion wurden die Integrale zwischen null und der korrigierten Ratio für den definierten Zeitabschnitt berechnet. Da die Daten paarweise verglichen wurden und es sich um abhängige Daten handelte, die Werte durch die selben Stimuli vor und nach dem Training evoziert wurden, konnten die Daten statistisch nach einem Wilcoxon Test für gepaarte nicht parametrische Daten unterzogen werden (Riemensperger et al., 2005; siehe auch: Völler, 2005).

## **3.7 Immunhistochemie**

### **3.7.1 Immunhistochemische Färbungen gegen Dopamin**

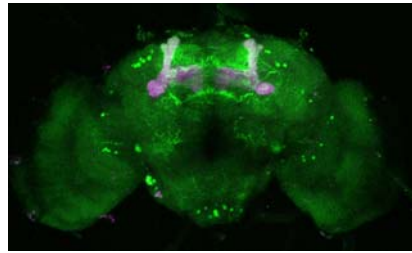
Es wurden Wholemout-Präparate von Gehirnen adulter Fliegen angefertigt. Hierzu wurden die Tiere in eisgekühltem Glutaraldehyd (1,25% in Ringer), versetzt mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (1%), präpariert und anschließend für drei Stunden in der gleichen Lösung auf Eis fixiert. Nach der Fixierung wurden sie drei mal 20 min in PBS gewaschen und bevor die Präparate über Nacht bei vier Grad in normal Goat Serum geblockt wurden, wurden sie zunächst noch einmal für 20 min in  $\text{BaBH}_4$  und mit PBS/  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (1%) gewaschen. Nach dem Blocken wurden die Gehirne für zwei Tage mit dem Antikörper gegen Dopamin auf 4°C inkubiert, anschließend drei mal 20 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und wiederum für zwei Tage mit dem zweiten Antikörper (Anti-Rabbit, Alexa 488; Verdünnung: 1:100) inkubiert. Um dem Hintergrund zu minimieren wurden die Präparate für zwei Tage bei 4°C gewaschen.

### **3.7.2 Immunhistochemische Färbungen gegen Tyrosin Hydroxylase**

Zur Detektion des Protein Tyrosin Hydroxylase im Gehirn adulter Fliegen wurden Gehirne auf Eis in Ringer präpariert und in 4% Paraformaldehyd für zwei Stunden auf Eis fixiert. Die so fixierten Präparate wurden drei mal für zwanzig Minuten in PBS gewaschen und über Nacht in PBS / NGS (1%) geblockt. Anschließend wurden die Präparate mit dem ersten Antikörper (Verdünnung: 1:1000) in Ringer/NGS (1%) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Präparate drei mal zwanzig Minuten in PBS gewaschen und direkt mit dem zweiten Antikörper für 2h bei

Raumtemperatur inkubiert (Anti-Rabbit, Cy 3; Verdünnung: 1:200) und zwei mal über Nacht gewaschen.

Die fertigen Präparate wurden unter dem Confocalen Laserscanning Microscope (CLSM) bei einer Pinhole-Appertur von 0,81 und einem Scan-Abstand von 1  $\mu\text{m}$  virtuell geschnitten. Die Einstellungen der Photomultiplier wurde je nach Bedarf geändert.

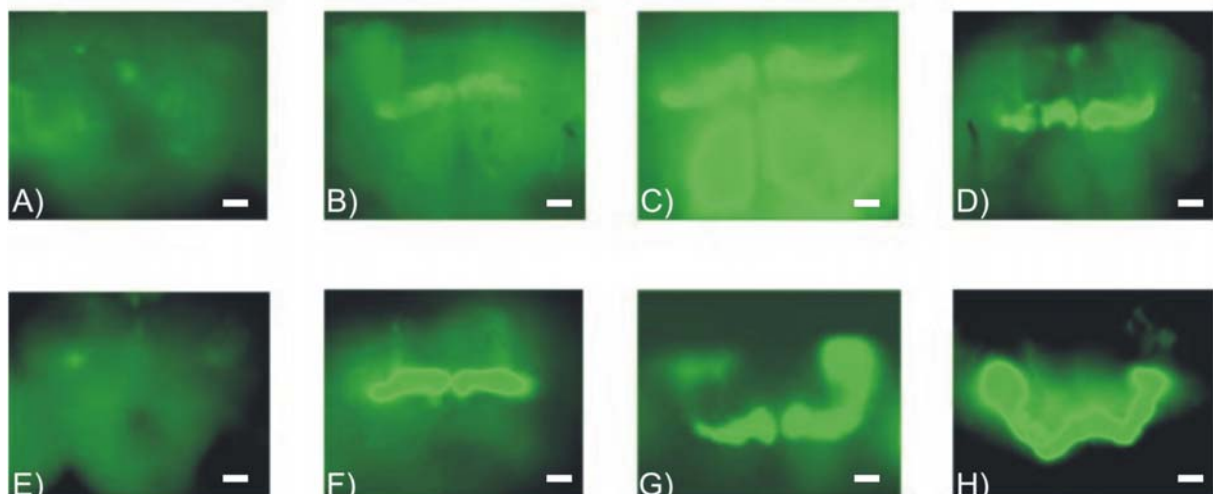


## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vergleich zwischen permutierten Sensoren und FRET-basierten Sensoren

#### 4.1.1 Anhebung der Expressionsstärke durch Vervielfältigung der Insertionen im Genom

Mit Hilfe von Balancer-Kreuzungen und Inverser-PCR ist es möglich, den Ort der Insertion eines P-Elementes zu detektieren, was für die transgenen Fliegen mit den Sensoren Yellow Cameleon 6.1 (YC6.1) und G-CamP 1.6 (GC1.6) im Vorfeld der Arbeit schon untersucht wurde (Schwab, 2004).



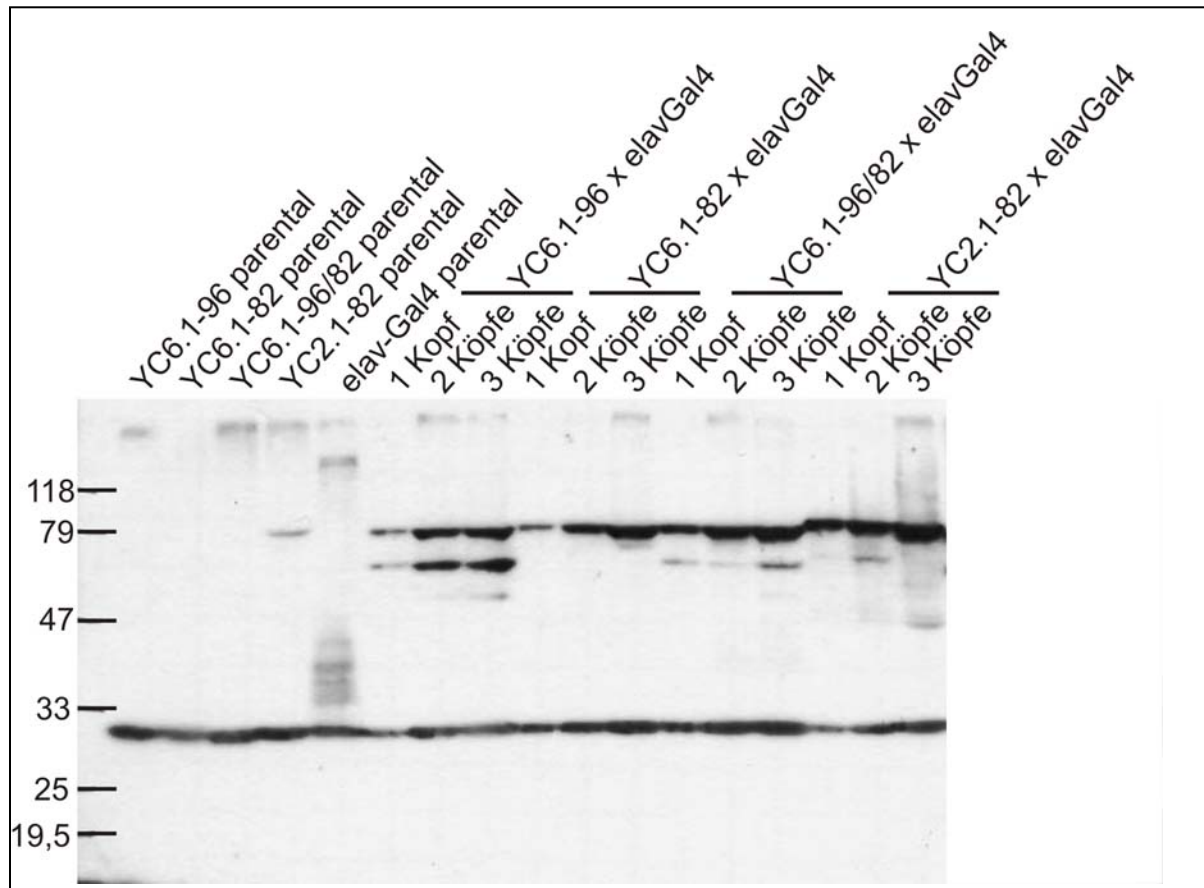
**Abb.4.1) Expressionsstärke der einzelnen transgenen Fliegenlinien für die Insertion des Sensors G-CamP1.6.** Um einen Vergleich zwischen den Expressionsstärken der einzelnen transgenen Linien erstellen zu können, wurden diese zunächst mit einem starken Treiber gekreuzt – in diesem Fall dem Pilzkörpertreiber 201Y. Aus den resultierenden Fliegen wurden die Gehirne 5 Tage alter adulter Tiere präpariert und bei 300 ms Belichtung Aufnahmen gemacht. Bei den einzelnen Transgenen handelte es sich um die Linien: A) GC1.6-39.9; B) GC1.6-68.3; C) GC1.6-81.4; D) GC1.6-103.2; E) GC1.6-138.1; F) GC1.6-154.4; G) GC1.6-162.1 & H) GC1.6162.2. Die stärkste Fluoreszenz wurde bei der X - und zweitchromosomalen Linie GC1.6-162.1 (G) und der drittchromosomalen Linie GC1.6-162.2 (H) festgestellt. Skalierungsbalken: 50µm.

Diese Fliegen wurden dann bezüglich ihrer Expressionsstärke charakterisiert und bei Bedarf wurde über Balancer-Kreuzungen die Anzahl der Insertionen erhöht. Bei den transgenen Fliegen mit dem Sensor G-CamP1.6 konnten zwischen den einzelnen Linien zum Teil sehr starke Unterschiede in der Expression des Transgens festgestellt werden (Abb. 4.1). Zur Untersuchung der Expressionsstärke wurden die für den Sensor transgenen Fliegen gegen 201Y gekreuzt, eine starke Treiberlinie, die Gal4 in den Pilzkörpern exprimiert, und dann das Expressionsmuster in der F1-Generation auf seine Stärke hin gestaffelt. Hierbei stellte sich heraus, dass es transgene Linien gab, die wenig bis gar keine Expression zeigten (Abb. 4.1 A/E), Linien, die außer der erwarteten Expression in den Pilzkörperloben auch noch eine Expression in den Antennalloben zeigten (Abb. 4.1 C) und solche Linien mit einer starken Expression, wie die X - / zweitchromosomale Linie GC1.6-162.1 (Abb. 4.1 G) und dritschromosomale Linie GC1.6-162.2 (Abb. 4.1 H). Für die weiteren Versuche zur Charakterisierung der Sensoren wurde die Linie GC1.6-162.1 verwendet.

Zur Untersuchung des Sensors Yellow Cameleon 6.1 wurde zunächst genauso vorgegangen und die Fliegenlinien herausgesucht, die die stärkste Expression zeigten. Jedoch war die Fluoreszenz dieses Sensors in allen erzeugten transgenen Linien eher schwach, so dass die jeweils stärksten Linien mit einer Insertion auf dem zweiten und die stärkste Linie mit einer Insertion auf dem dritten Chromosom über eine Balancerkreuzung mit einander kombiniert wurden. Dadurch erhielt man Fliegen, die je zwei Kopien auf je zwei unterschiedlichen Chromosomen stabil vererbten. Für die Transgene des Sensors YC6.1 wurden je eine Fliege mit starker Fluoreszenz mit Insertion auf dem dritten Chromosom (YC6.1-82) und auf dem zweiten Chromosom (YC6.1-96) verwendet und nach dem im Kapitel Material und Methoden dargestellten Kreuzungsschema miteinander kombiniert. Durch diese Vorgehensweise konnte die Expressionsstärke in den Tieren stark erhöht werden.

Durch eine semiquantitative Westernblot-Analyse ist es möglich die Expressionsstärke der einzelnen Sensoren miteinander zu vergleichen. Hierzu wurden die UAS-Fliegen der einzelnen Sensoren gegen einen panneuronalen Treiber gekreuzt und die Fliegen der F1-Generation dekapitiert. Auf das Gel wurden je 1, 2 oder 3 Köpfe aufgetragen. Auf dem Blot kann man sehr gut erkennen, dass die Fliegen YC6.1-82 und YC6.1-96 alleine je eine schwächere Bande zeigen (Abb. 4.2), als die Fliegen

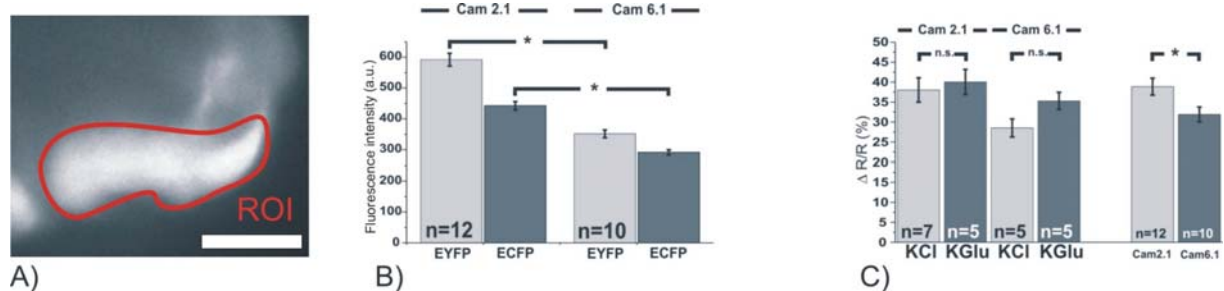
des Sensors Cam2.1, was auf eine schwächere Expression schließen lässt. Bei den Fliegen, bei denen YC6.1-96/82 miteinander kombiniert wurden, kann man jedoch eine etwa gleichstarke Expression feststellen, was die Fliegen nun direkt miteinander vergleichbar macht (Abb. 4.2).



**Abb.4.2) Semiquantitative Westernblotanalyse zur Ermittlung der Expressionsstärken der einzelnen Sensoren.** Bei den ersten vier Spuren von links wurden die Parentallinien aufgetragen (je 4 Köpfe). Im Anschluss daran wurden die gegen den panneuralen Treiber elav-Gal4 gekreuzten UAS – Sensoren Fliegenlinien aufgetragen, von links nach rechts je steigend ein Kopf bis 3 Köpfe. Die Sensoren YC6.1-96 und YC6.1-82 allein zeigen jeweils eine geringere Expressionsstärke als die Fliegenlinie für den Sensor YC2.1-82. Die durch Balancerkreuzungen miteinander kombinierten Fliegen YC6.1-96/82 zeigen ungefähr die gleiche Expressionsstärke für das Reporterprotein, wie die der Linie YC2.1-82. Das nachzuweisende Cameleon besteht aus zwei GFP-Derivaten und wurde über einen GFP-Antikörper nachgewiesen. Das Protein selbst hat eine Größe von ca. 80kD. Bis auf die Spur des Sensors YC2.1-82 zeigte keine der Parentallinien eine Bande auf der erwarteten Höhe. Für YC2.1-82 konnte hingegen eine, wenn auch schwache Bande auf dieser Höhe nachgewiesen werden, was auf eine „leaky“ Expression schließen lässt. Das Protein scheint also auch ohne Treiber schwach exprimiert zu werden. Bei der Bande bei ca. 30 kD handelt es sich um eine unspezifische Bindung des Antikörpers; in diesem Fall dient diese auch als Beladungskontrolle. Die Kreuzung YC6.1-96 X elav-Gal4 zeigt zusätzlich zu der erwarteten Bande eine Bande etwas unterhalb davon. Hierbei könnte es sich um eine Art Degradationsprodukt handeln, welches aber spezifisch nur bei dieser UAS-Linie auftritt. Weder YC2.1-82 X elav-Gal4, noch YC6.1-82 X elav-Gal4 zeigten dieses Degradationsprodukt. YC6.1-96 und YC6.1-82 zeigten eine schwächere Expressionsstärke als die Linie YC2.1-82. Um nun die zwei Sensoren miteinander vergleichen zu können wurden die zwei Linien des Sensors YC6.1 mit einander kombiniert. Die Bandenstärken zeigen, dass die Kombination aus YC6.1-96 (2.Chrom.) und YC6.1-82 (3.Chrom.) in etwa die gleiche Expressionsstärke besitzt wie die Linie YC2.1-82.

#### 4.1.2 Vergleich zwischen FRET-basierten Sensoren *in vivo* anhand Kaliumchlorid und KGlucuronat evozierten Signalen

Um die Sensoren vergleichen zu können wurden diese zunächst auf ihre Fluoreszenzstärke hin untersucht. Interessant war hierbei nicht nur der Unterschied zwischen den zirkulär permutierten Sensoren und den FRET-basierten Sensoren, sondern auch der Unterschied zwischen zwei verschiedenen Typen von FRET-basierten Sensoren. Bei den zu untersuchenden Calciumreportern handelt es sich um den Sensor Yellow Cameleon 2.1 (Cam2.1) (Myiawaki et al., 1999) und um seinen weiter entwickelten Nachfolger Yellow Cameleon 6.1 (Truong et al., 2001), sowie um die Sensoren TNL-15 (Heim & Griesbeck, 2004) und TNXL (Mank et al., 2006). Wie schon in der Einleitung dargestellt sind alle diese Sensoren strukturell ähnlich aufgebaut und bestehen aus zwei Fluorophoren die über Calcium bindende Sequenzen miteinander verbunden sind. Austausch von verschiedenen dieser calciumbindende Domänen und verschiedenen Fluorophoren sollten Verbesserungen der Kinetik der Sensoren ergeben und die Sensoren somit schnellere Signale auf die Calciumströme in die Zelle hin zeigen. Zunächst wurden die Sensoren aber auf ihre generellen Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht, wie die Grundfluoreszenz im Ruhezustand und die allgemeine Fluoreszenzänderung in Prozent bei einer Depolarisation des Gehirns durch Umspülung mit hoher Kaliumkonzentration.



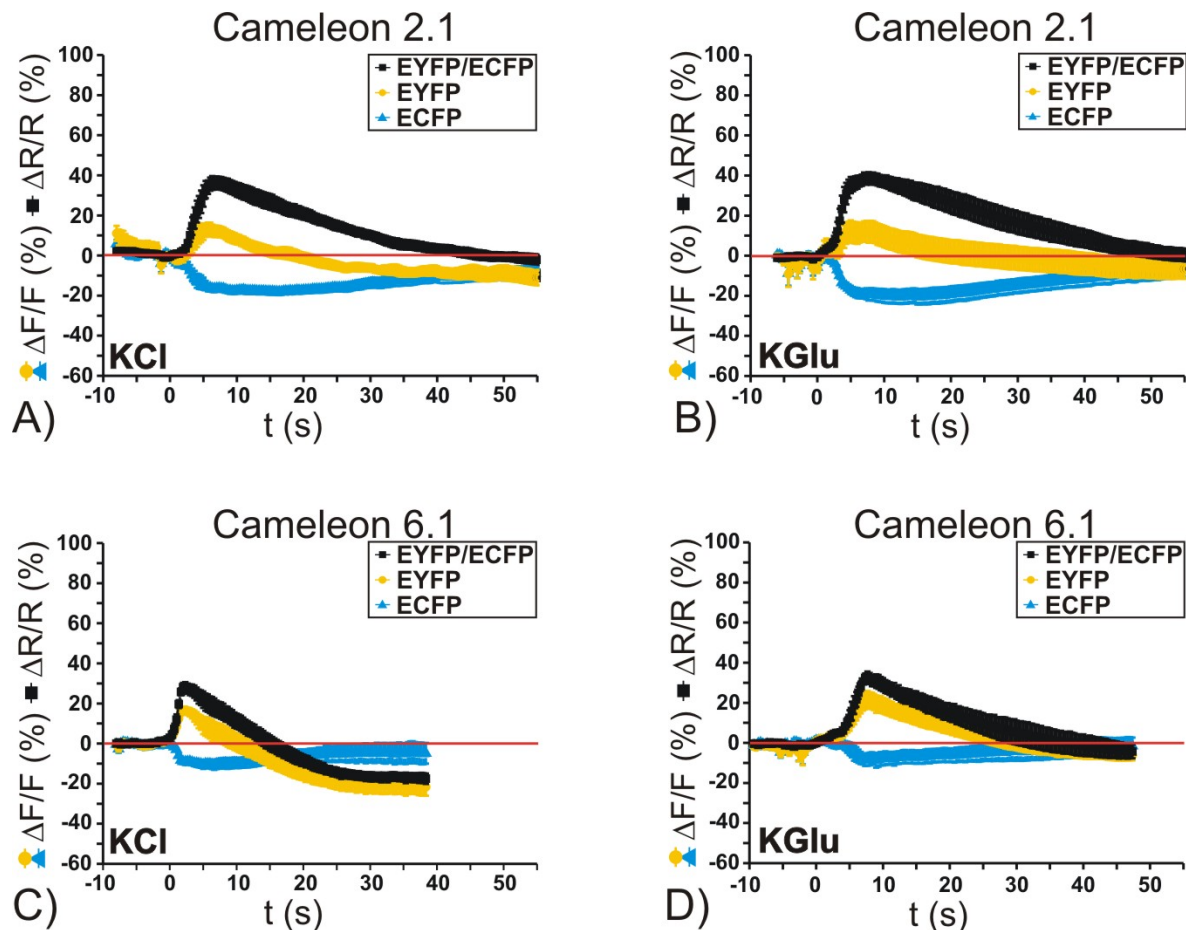
**Abb. 4.3) Fluoreszenzstärke der verschiedenen Cameleonsensoren und prozentuelle Darstellung der Signalstärken auf eine Depolarisation des Gehirnes. A)** Expression von Cameleon 2.1 unter der Kontrolle von 201Y (Belichtungszeit: 180ms). Es wurde jeweils immer über einen gesamten horizontalen Lobus gemessen, gekennzeichnet durch die rote Umrahmung (ROI: Region of interest). Skalierungsbalken: 50µm. **B)** Die Grundfluoreszenz im Ruhezustand liegt bei Cameleon 2.1 ca. um ein Drittel höher als bei dem Sensor YC6.1. Die Fluoreszenzwerte sind in einer freigewählten Einheit angegeben (a.u.: arbitrary unit) **C)** Prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensitäten auf die Depolarisation hin. Die angegebenen Werte stellen die absoluten Signalmaxima dar. Beide Sensoren zeigen in der Fluoreszenzänderung auf KCl- und KGluc- evozierte Depolarisation keine signifikanten Unterschiede. Die prozentuale Änderung auf die Kaliumgabe ist bei dem Sensor Cameleon2.1 signifikant höher als bei dem Sensor YC6.1.

Das als Salzlösung applizierte Kalium kann in Form eines Chloridsalzes (KCl) oder als Gluconatsalz (KGlu) gegeben werden. Weil Chloridionen Auswirkungen auf das Verhalten der Sensoren haben können, was sich wiederum auf deren Signal auswirken kann, wurden die Sensoren über Applikation von Kalium sowohl in Form des Chloridsalzes als auch in Form des Gluconatsalzes getestet. Um dies zu untersuchen, wurden die UAS-Sensor Fliegen gegen die Gal4-Fliegenlinie 201Y gekreuzt (Abb. 4.3 A), welche die Expression in den Pilzkörpern treibt, und die Salzlösungen von außen auf das Gehirn appliziert.

Im Ruhezustand zeigt der Sensor Yellow Cameleon 2.1 sowohl für das EYFP mit einer relativen Intensität von  $592,17 \pm 18,7$  als auch für das ECFP mit einer Intensität von  $442,71 \pm 13,51$  eine Grundfluoreszenz, die jeweils um ca. 40% höher liegt, als die Grundfluoreszenzen des EYFP ( $351,96 \pm 11,90$ ) und des ECFP ( $291,58 \pm 8,00$ ) des Sensors Yellow Cameleon 6.1 ( $p_{(eYFP)} = 1,80577E-9$ ;  $p_{(eCFP)} = 1,40079 E-8$ ) (Abb. 4.3 B).

Auf die Depolarisation des Gehirnes mit KCl oder KGlu konnte, was die Signaländerung angeht, bei dem Sensor Yellow Cameleon 2.1 kein Unterschied zwischen den verschiedenen Salzen festgestellt werden. Dies beträgt bei KCl  $38,04\% \pm 3,04\%$  und bei KGlu  $40,04\% \pm 3,14\%$  Steigerung in der Ratio relativ zur Grundlinie (Abb. 4.3 C). Bei dem Sensor Yellow Cameleon 6.1 konnte diesbezüglich auch kein signifikanter Unterschied der Signalstärke auf die verschiedenen Salze hin festgestellt werden ( $p=0,63$ ). Die Signaländerung dieses Sensors beläuft sich in der Ratio auf  $28,52\% \pm 2,27\%$  bei KCl-Gabe und auf  $38,28\% \pm 2,17\%$  bei Applikation von Kaliumgluconat (Abb. 4.3 C). Da für beide Sensoren keine signifikanten Unterschiede in der Signalgabe zwischen den Salzen festgestellt werden konnten, wurden die Daten aus KCl- und KGlu- Gabe gepoolt und die Sensoren direkt miteinander verglichen. Dies ergab, dass der Sensor Yellow Cameleon 2.1 über alle Fliegen gemittelt in der Ratio ein Signal von  $38,87\% \pm 2,13\%$  auf die Depolarisation des Gehirns gab, während Yellow Cameleon 6.1 lediglich eine Signaländerung von  $31,90\% \pm 1,68\%$  im Unterschied zur Grundlinie zeigte (Abb. 4.3 C). Der Sensor Yellow Cameleon 2.1 gibt also auf eine Depolarisation des Gehirns hin ein signifikant höheres Signal als der Sensor Yellow Cameleon 6.1 ( $p = 0,025$ ).

Zur Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der Sensoren wurden die oben als Säulendiagramm dargestellten Signale (Abb. 4.3) nun zeitlich aufgelöst. Als Nullpunkt der Zeitachse wurde hier der Beginn der Steigung definiert (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4) Zeitliche Darstellung der Signale auf die Depolarisation des Gehirnes mit KCl oder KClu. A)** Auf KCl zeigt Cameleon 2.1 einen relativ schnellen Anstieg und flacht nach dem Erreichen des Höhepunktes nur langsam ab. **B)** Bei Gabe von KClu verhält sich der Sensor nicht nennenswert anders als bei Gabe von KCl. **C)** Bei KCl-Gabe steigt der Sensor Yellow Cameleon 6.1 in etwa so schnell an wie Cameleon 2.1, zeigt aber im Abfall nach Erreichen des Höhepunktes eine deutliche Verschnellerung des Sensors im Vergleich zu seinem Vorgänger. Weiterhin ist bei KCl – Gabe eine Art „Undershoot“ zu beobachten, was von einem erhöhten Bleichen des EYFP durch die Chloridionen herzurühren scheint. **D)** Bei Gabe von KClu zeigt YC6.1 eine ähnliche Anstiegskurve, flacht aber nach dem Höhepunkt nicht so abrupt ab wie nach Gabe von KCl, wobei hier kein verstärktes Bleichen des EYFP festzustellen ist.

Da die Applikation der Kaliumsalzlösungen manuell erfolgte, und die Diffusionsgeschwindigkeit der Salze in Lösung nicht bestimmbar war, wurden zur Errechnung der Anstiegs- und Abfallskinetik die Zeiten ermittelt, welche die Sensoren benötigten um von 10% auf 90% des Maximalsignals zu steigen und wieder von 90% auf 10% zurück abzufallen. Yellow Cameleon 2.1 zeigte weder in der Kinetik des Anstiegs

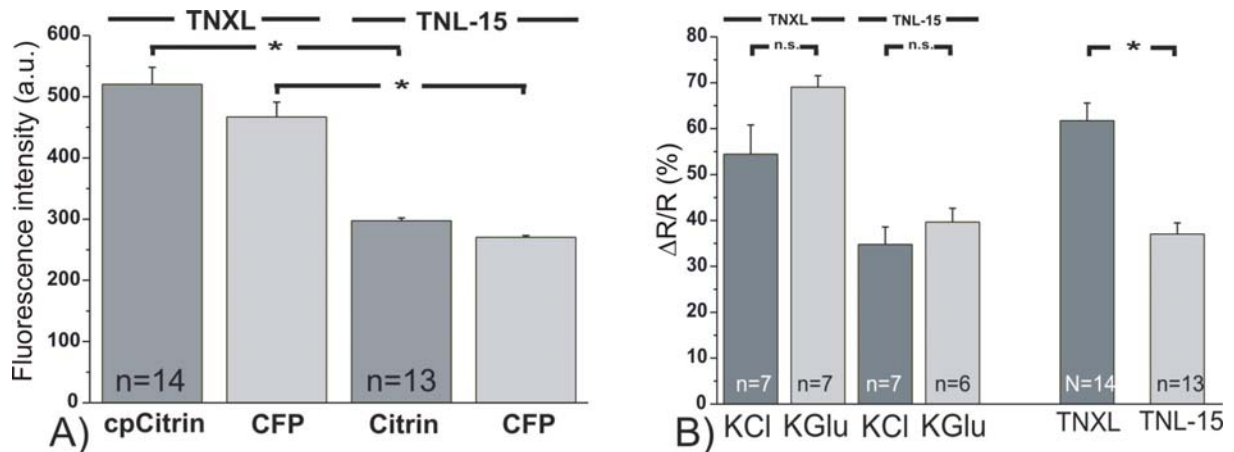


noch in der des Abfalls der Signale einen nennenswerten Unterschied zwischen den Experimenten mit dem Chloridsalz und dem Gluconatsalz des Kaliums. Sowohl für KCl (3,0 s (Abb. 4.4A)) als auch für KGlu (2,9 s (Abb. 4.4B)) braucht dieser Sensor in etwa die gleiche Zeit um von 10% des Signalmaximums nach Beginn der Depolarisation auf 90% des Maximums anzusteigen (Abb. 4.4 A/B). Bei Abfall wieder von 90% zurück auf 10% des Signalmaximums benötigt der Sensor bei Gabe von KCl ca. 39,8 s (Abb. 4.4 A), während er im Mittel bei KGlu-Gabe 40,7 s benötigt (Abb. 4.4 B). Bei Yellow Cameleon 6.1 konnte in der Kinetik jeweils eine kleine Abweichung in der Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls registriert werden. Bei KGlu-Gabe benötigt dieser Sensor im Mittel 3,6 s um die 90% zu erreichen (Abb. 4.4 D) und bei KCl 1.9 s (Abb. 4.4 C). Im Abfall wieder zurück auf die 10% des Maximalsignals kann man jedoch bei Yellow Cameleon 6.1 einen dramatischen Unterschied zwischen KCl und KGlu feststellen. So benötigt dieser Sensor im Mittel über alle gemessenen Fliegen 38,4 s um nach KGlu-Gabe wieder auf Null zurück zu gehen (Abb. 4.4 D), aber nur 19,4 s bei KCl-Applikation (Abb. 4.4 C), wobei zu dem schnellen Abfall auch beobachtet werden kann, dass das EYFP einem starken Bleichen unterliegt, das es weit unter die Nulllinie drückt (Abb. 4.4 C), was sich natürlich auch auf das Verhalten der Ratio auswirkt.

Weiterhin wurden die Sensoren TNL-15 und TNXL auf ihre Tauglichkeit für Messungen in lebenden Fliegen untersucht. Bei diesen wurde wie schon erwähnt die Calciumbindestelle des Calmodulins gegen die des Troponin C ausgetauscht. Des weiteren wurde kein EYFP, sondern ein Citriulin verwendet, da dieses weniger anfällig für Bleichen zu sein scheint. Der Sensor TNXL ist dem TNL-15 vom Aufbau sehr ähnlich, jedoch wurde für den TNXL Sensor das Citrulin zirkulär permutiert, um den calciumabhängigen FRET-Effekt zu verstärken. Für diese Experimente wurden ebenfalls Kreuzungen gegen 201Y vorgenommen und die Sensoren in Bezug auf ihre Fluoreszenzeigenschaften und deren kinetisches Verhalten bei einer Depolarisation untersucht.

Die relative Grundfluoreszenz, die wie auch bei den vorangegangenen Sensoren über einen der horizontalen Loben (vergleichend zu: Abb. 4.3A) gemessen wurde, liegt für das zirkulär permutierte Citrin des TNXL bei  $520,33 \pm 27,84$  und für das CFP bei  $467,09 \pm 23,95$  (Abb. 4.5 A). Die Grundfluoreszenz im nicht aktivierten Zustand

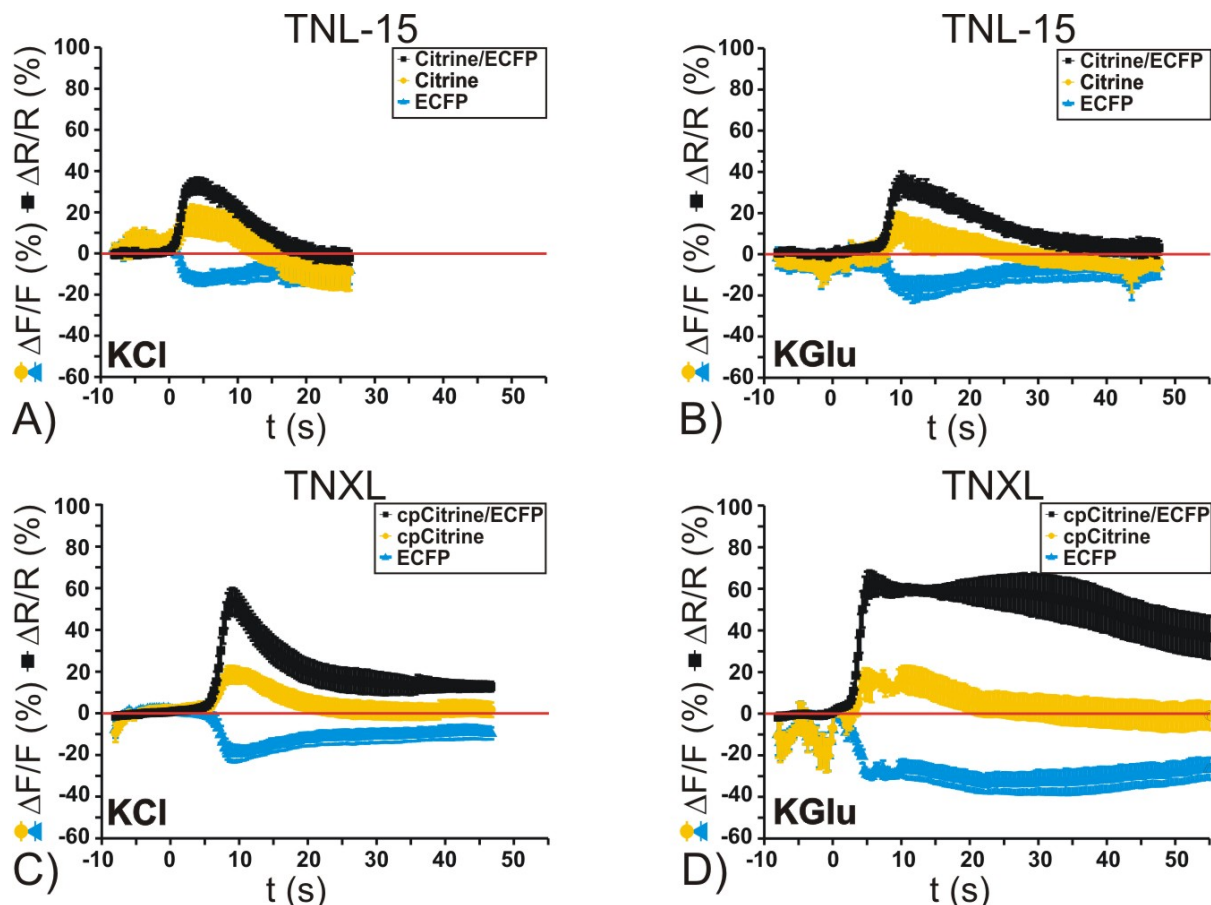
liegt bei dem Sensor TNL-15 für die jeweiligen Fluorophore etwas niedriger als für den Sensor TNXL und beträgt für das Citrin im Mittel  $297,47 \pm 4,41$  und für das CFP  $270,45 \pm 2,67$  (Abb. 4.5 A). Wie auch bei den vorher untersuchten FRET basierten Sensoren konnte auch bei den TN-Sensoren kein Unterschied in der Signalstärke zwischen den Applikationen der verschiedenen Kaliumsalze detektiert werden.



**Abb. 4.5) Fluoreszenzstärke der beiden verschiedenen TN-Sensoren und prozentuale Darstellung der Signalstärken auf eine Depolarisation des Gehirnes. A)**Die Grundfluoreszenz im Ruhezustand liegt für beide Fluorophore bei TNXL ca. um ein Drittel höher als bei dem Sensor TNL-15 (a.u.: arbitrary units). **(B)** Beide Sensoren zeigen in der Fluoreszenzänderung auf KCl- und KClu- evozierte Depolarisation keine signifikanten Unterschiede. Die prozentuale Änderung auf die Kaliumgabe ist bei dem Sensor TNXL signifikant höher ist als bei dem Sensor TNL-15.

Die Verabreichung von KCl ergab eine Änderung in der Ratio von  $54,45\% \pm 6,35\%$  für den Sensor TNXL (Abb. 4.5 B) und für den Sensor TNL-15 eine Änderung von  $34,76\% \pm 3,81\%$ . Die Gabe von KClu hingegen ergab einen Anstieg der Ratio um  $69,06\% \pm 2,46\%$  für TNXL einen um  $39,63\% \pm 3,00\%$  für TNL-15 (Abb. 4.5 B). Da die Signalen auf die Applikationen der verschiedenen Salze sich nicht signifikant unterschieden ( $p=0,053$  für TNXL und  $p=0,35$  für TNL-15), wurden die Daten gepoolt und die Sensoren direkt miteinander verglichen. Dies ergab, dass der Sensor TNXL signifikant höhere Signale auf die Depolarisation gibt als der Sensor TNL-15 ( $p=1,6435E-5$ ). Wenn auch die Sensoren in ihren Signalstärken keine Unterschiede zwischen der Applikation von KCl und der von KClu zeigten, so war dennoch der kinetische Verlauf der Aktivitäten der Sensoren unterschiedlich. So zeigte der Sensor TNXL bei Gabe beider Kaliumsalze einen sehr steilen Anstieg von 10% bis 90% des Signalmaximums und zwar innerhalb von 2,5 s für KCl (Abb. 4.6 C) und 2,3 s für

KGlu (Abb. 4.6 D), während der Abfall nur näherungsweise für die Gabe von KCl ermittelt werden konnte, da die Signalintensität weder der Sensor TNXL weder bei Applikation von KCl noch bei der von KGlu nach Erreichen des Maximums wieder unter die 10%-Marke abfiel (Abb. 4.6 C/D).



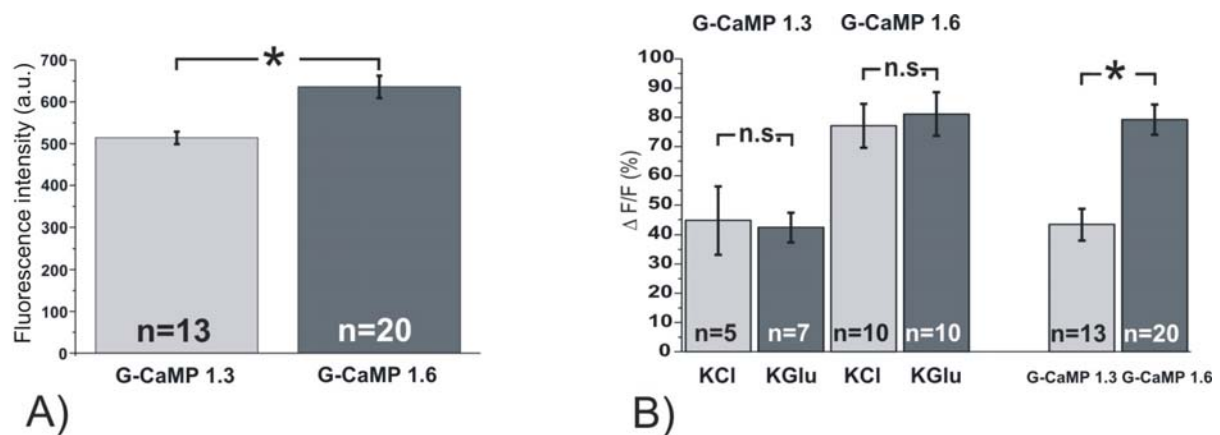
**Abb. 4.6) Zeitliche Darstellung der Signale auf die Depolarisation des Gehirnes mit KCl oder KGlu. A)** Bei KCl-Gabe steigt der TNL-15 etwas langsamer an als TNXL, zeigt aber im Abfall nach Erreichen des Höhepunktes einen sehr schnellen Rückgang auf die Grundfluoreszenz des Ruhezustands. **B)** Bei Gabe von KGlu zeigt TNL-15 eine ähnliche Anstiegskurve, flacht aber nach dem Höhepunkt nicht so abrupt ab wie nach Gabe von KCl, wobei hier kein verstärktes Bleichen des Citrin festzustellen ist. **C)** Auf KCl zeigt TNXL einen sehr schnellen Anstieg und flacht nach dem Erreichen des Höhepunktes auch wieder relativ schnell ab bis ein Plateau (bei ca. 15% der Signaländerung) erreicht wird, das der Sensor nicht mehr unterschreitet. **D)** Bei Gabe von KGlu verhält sich der Sensor entschieden anders, so scheint sich das cyane Fluorophor nicht mehr von dem Signal zu erholen, so dass das Signal nur sehr langsam abfällt und nach über 50s immer noch bei über 30% liegt.

Bei Gabe von KCl kam es nach Erreichen des Maximums zu einem sehr raschen Abfall der Kurve bis zu einem Plateau, das bei ca. 20% des Signalmaximums liegt. Zur Messung der Zeit des Abfalls wurde dieses Plateau als neue Grundlinie der Ruheaktivität gewertet und die Zeit des Abfalls von 90% auf 10% anhand dieser neu

definierten Nulllinie durchgeführt. Dies ergab, dass der Sensor TNXL bei Applikation von KCl im Mittel über die gemessenen Fliegen 12,1 s benötigt um auf den 10% - Wert abzusinken. Bei der Gabe von KGlu machte die Ermittlung einer neuen Grundlinie jedoch keinen Sinn, da die Werte 40 s nach Erreichen des Maximums immer noch weit über 40% lagen und die Kurve kein Plateau ausbildete, sondern weiter stetig, wenn auch langsam fiel. Wie bei den anderen getesteten Sensoren belief sich der Anstieg von 10% auf 90% des Maximalsignals des Sensors TNL-15 auf einen Zeitraum zwischen 2 s und 3,5 s (Abb. 4.6 A/B). So wurde eine Dauer von 2,3 s für den Anstieg bei Applikation von KCl ermittelt und eine von 3,2 s für KGlu. Im Abfall des Signals konnte auch bei diesem Sensor wieder eine Art Chloridionen abhängiges Bleichen registriert werden. So sinkt die Fluoreszenz des Citrins dieses Sensors nach Erreichen des Maximums unter die Nulllinie der Grundfluoreszenz vor dem Experiment ab. Zur Ermittlung der Abfallskinetik wurde auch hier für die Ratio eine neue Grundlinie festgelegt und der Abfall von 90% bis 10% auf diese Linie berechnet. Dies ergab für die KCl-Applikation 12,5 s. Bei Gabe von KGlu konnte dieses Ionen-abhängige Bleichen nicht registriert werden. Bei der Messung der Zeit des Abfalls von 90% des Signalmaximums auf 10% benötigte dieser Sensor bei der Gabe von KGlu eine Zeit von 20,3 s.

#### **4.1.3 Vergleich zweier zirkulär permutierter Sensoren anhand Kaliumchlorid und Kaliumgluconat evozierter Signale**

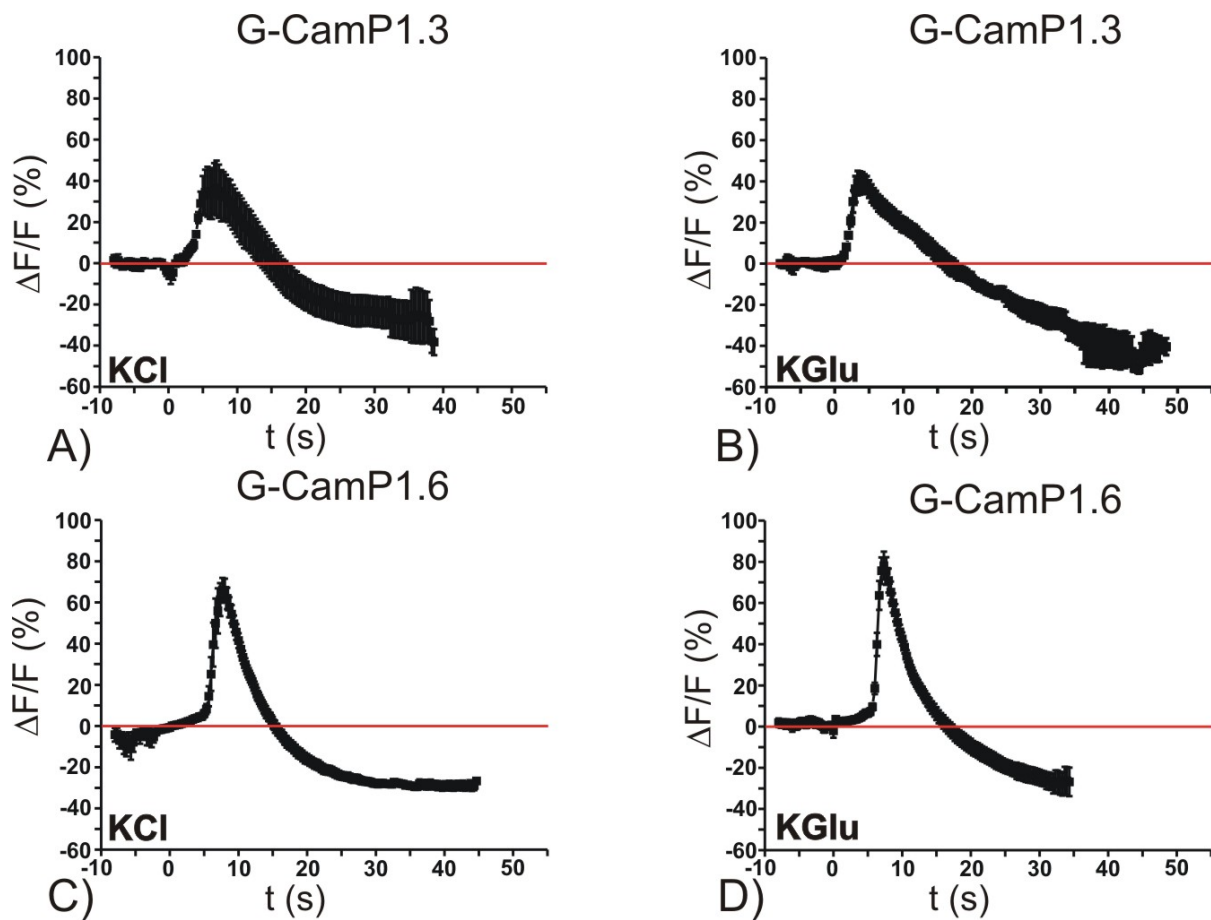
Wie auch die FRET-basiereten Sensoren wurden auch die Sensoren G-CamP1.3 und G-CamP1.6 zunächst auf ihre allgemeinen Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Hierzu wurden die Fliegen wieder gegen 201Y gekreuzt, und die Signale auf eine Depolarisation des Gehirnes in den Pilzkörperloben gemessen. Die relative Grundfluoreszenz im Ruhezustand war hier im Mittel über 13 Fliegen  $514,37 \pm 14,55$  bei G-CamP1.3 und damit signifikant niedriger als die bei  $636,39 \pm 14,55$  liegende Fluoreszenz von G-CamP1.6 ( $n=20$ ;  $p=0,002$ ) (Abb. 4.7 A). Auch diese Sensoren wurden auf etwaige Auswirkungen von Chloridionen auf ihre Signaleigenschaften untersucht und die Gehirne zum einen mit KCl und zum anderen mit KGlu depolarisiert.



**Abb. 4.7) Fluoreszenzstärke der verschiedenen G-CaMP-Sensoren und prozentuale Darstellung der Signalstärken auf eine Depolarisation des Gehirnes. A)** G-CaMP1.3 zeigt im Ruhezustand eine Grundfluoreszenz die bei 514 liegt, während G-CaMP1.6 eine Grundfluoreszenz von 636 zeigt. **B)** Keiner der beiden Sensoren zeigt Unterschiede im prozentualen Anstieg des Signals zwischen den Salzen KCl und KClu. Die mittlere Signalstärke auf die Depolarisation hin beträgt bei G-CaMP1.3 ca. 43% (n=13) und bei G-CaMP1.6 ca. 79% (n=20).

Hierbei konnten weder für G-CaMP1.3 noch für G-CaMP1.6 Auswirkungen der Chloridionen auf die Signalintensität festgestellt werden (Abb. 4.7 B). Da keinerlei Unterschiede zwischen Gluconationen und Chloridionen detektiert werden konnten, wurden die Daten gepoolt und die Sensoren auf ihre Fluoreszenzänderung auf die Depolarisation hin untersucht. Dies ergab, dass G-CaMP1.6 mit einer Fluoreszenzänderung um  $79,22\% \pm 5,18\%$  im Vergleich zur Grundfluoreszenz im Ruhezustand ein signifikant höheres Calciumsignal zeigt, als sein Vorgänger G-CaMP1.3 mit einer Fluoreszenzänderung von  $43,37\% \pm 5,32\%$  verglichen zur Grundlinie ( $p=7,60214E-5$ ) (Abb. 4.7 B).

Auch hier war nicht nur die Höhe der produzierten Signale von Interesse, sondern auch ihre Kinetik. Daher wurden wie auch bei den oben schon analysierten Sensoren die Signalkurven zeitlich dargestellt und die Zeit von 10% bis 90% des Maximums und das Wiederabfallen von 90% auf 10% in Bezug auf das Maximum gemessen. Im Mittel über fünf Fliegen benötigt der Sensor G-CaMP1.3 bei Applikation von KCl ungefähr 2,4 s um von 10% auf 90% des Maximums anzusteigen und ca. 18,7 s um wieder auf 10% des Maximums abzufallen, wobei es hierbei zu einem „undershoot“ weit unter die Grundfluoreszenz kommt (Abb. 4.8 A). Zur Berechnung der Abfallskinetik wurde auch hier eine neue Grundlinie definiert und für diese die Zeit ermittelt, die der Sensor benötigt um von 90% auf 10% abzufallen.



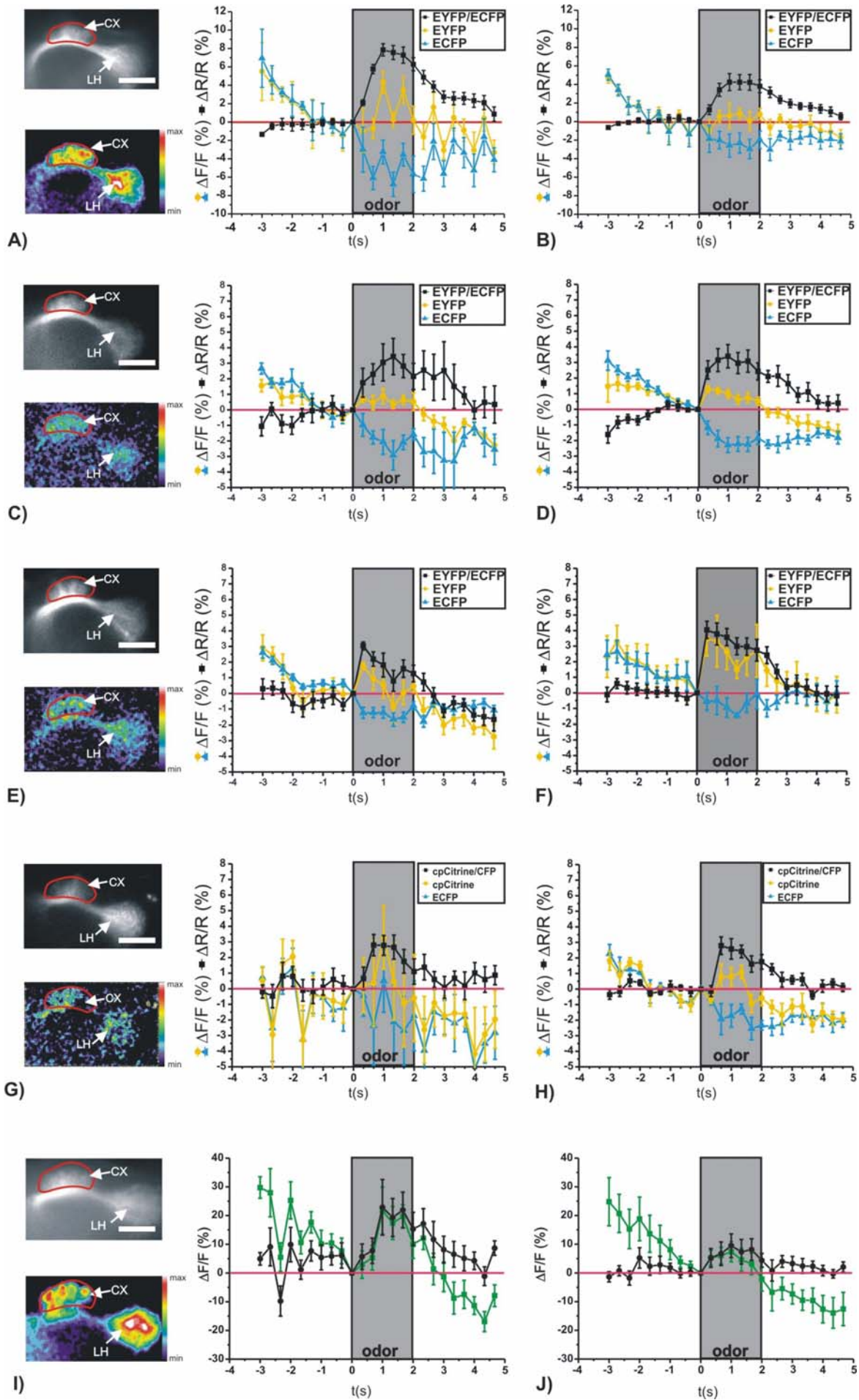
**Abb. 4.8) Zeitliche Darstellung der Signale auf die Depolarisation des Gehirnes mit Kaliumchlorid (KCl) oder Kaliumglukonat (KClu). A)** Auf KCl zeigt G-CamP1.3 einen relativ schnellen Anstieg und flacht nach dem Erreichen des Höhepunktes auch recht schnell ab. **B)** Bei Gabe von KClu verhält sich der Sensor nicht nennenswert anders als bei Gabe von KCl. **C)** Bei KCl-Gabe steigt das Signal des Sensors G-CamP1.6 schneller an als das von G-CamP1.3 und zeigt auch nach Erreichen des Höhepunktes einen deutlich schnelleren Abfall im Vergleich zu seinem Vorgänger. **D)** Bei Gabe von KClu zeigt G-CamP1.6 keine Unterschiede im Vergleich zu den KCl evozierten Signalen. Weiterhin ist bei allen Signalen eine Art „Undershoot“ zu beobachten, was von einem erhöhten Bleichen des GFPs nach dem Signal herrührt.

Bei Applikation von KClu benötigt der Sensor ca. 3,1 s um von 10% auf 90% des Maximums anzusteigen und 18,2 s um wieder auf die 10% zurückzufallen (n=7). Wie auch bei KCl-Gabe kommt es hier zu einem „undershoot“ nach dem Signal weit unter die Grundfluoreszenz zu Beginn der Messung (Abb. 4.8 B), weswegen auch hier wieder eine neue Grundlinie definiert wurde. Auf KCl-Gabe benötigte der Sensor G-CamP1.6 ca. 2,2 s (Abb.4.8 C) um von der 10% auf 90% des Maximums anzusteigen, wobei dieser Sensor eine relativ flache Anfangsphase zeigt und dann sehr schnell auf sein Maximum ansteigt, dies verhält sich für KClu-Gabe sehr ähnlich (2,28 s) (Abb. 4.8D). Auch im Abfall scheint es keinerlei Unterschiede in der Kinetik der Calciumsignalen zwischen den verschiedenen Kaliumsalzen zu geben, so

benötigt G-CamP1.6 ca. 14,8 s um wieder auf die 10% des Maximums zurückzufallen bei Gabe von KCl (Abb. 4.8 C) und ca. 15,3 s bei KGlu (Abb. 4.8 D). Wie auch schon bei dem Sensor G-CamP1.3 kommt es nach Erreichen des Maximums zu einem Abfall unter die Nulllinie, so dass auch hier eine neue Grundlinie definiert wurde, anhand welcher die Abfallskinetik ermittelt wurde.

#### **4.1.4 Vergleich der Sensoren mittels Duftapplikation als physiologische Stimuli**

Bei der Applikation von Kaliumsalzen handelt es sich um eine Stimulation der Neuronen, die so in der Natur nicht vorkommt. Interessanter sind natürlich aber Signale auf Stimulationen, die für die Tiere relevant sind. Daher wurden Duftstimulationen durchgeführt und die Antworten der olfaktorischen Projektionsneuronen in den Calyces der Pilzkörper gemessen. Den 5 Tage alten Tieren wurde hierfür der Duft Isoamylazetat in der Konzentration  $10^{-3}$  präsentiert. Eine Stimulation dauerte zwei Sekunden und wurde pro Tier sechs mal wiederholt. Nach jeder Duftpräsentation wurden 30 s Pause gegeben und ein zweiter Duft (Benzaldehyd) als Kontrolle ebenfalls für 2 s präsentiert (Daten nicht dargestellt), dann wiederum eine Minute Pause bevor der nächste Durchlauf gestartet wurde. Es wurden zum einen die Signale der einzelnen Sensoren gegeneinander verglichen, zum anderen aber auch für einen der Sensoren die Abhängigkeit der Signale von der Menge des exprimierten Reporterproteins. Die Signale konnten bei den Fliegen sehr unterschiedlich ausfallen, was von der Präparation herrühren könnte, da wohl die einzelnen Tiere die Operation an der Kopfkapsel mal besser oder schlechter überstanden. Deshalb wurden für die verschiedenen Sensoren jeweils ein Beispieletier (Abb. 4.9 linke Spalte) und das Mittel über sechs Tiere dargestellt (Abb. 4.9 rechte Spalte). Die Fliegen, die den Sensor Yellow Cameleon 2.1 exprimieren, wurden zum einen mit der Gal4-Treiberlinie GH146 auf dem zweiten Chromosom so rekombiniert (Spall, 2004), dass in jeder Fliege zwei Gal4- und zwei UAS-Kopien vorlagen, und zum anderen wurde einfach die Treiberlinie gegen die UAS-Linie gekreuzt, so dass jeweils nur eine Kopie von jedem Transgen in der getesteten F1-Generation vorlag.





**Abb. 4.9) Aktivität der olfaktorischen Projektsneuronen auf Duftstimuli (Isoamylacetat (IAA), Konzentration  $10^{-3}$  gemessen mit den unterschiedlichen Sensoren. Der graue Balken zeigt die Dauer des Duftreizes an. Linke Spalte: falschfarbenkodierte Signalbild (CX= Calyx; LH= laterales Horn); mittlere Spalte: Ca-Signal einer Beispielfliege auf einen Duftstimulus (6 Stimulationen); rechte Spalte: Zeitliche Darstellung des Duftsignals im Mittel über 6 Fliegen (6 Stimulationen pro Fliege) A/B) Cam2.1/GH146 homozygot: A) Auf die Stimulation kommt es im Calyx und dem lateralen Horn zu einer Aktivierung bestimmter Regionen (links); ca. 1 s nach Beginn der Stimulation erreicht das Signal des Sensors sein Maximum. Nach Erreichen dieses Maximums flacht das Signal bis zu einem Plateau hin ab, welches ca. 1 s nach Abklingen des Duftes erreicht wird; ca. 3 s nach Stimulus-Offset erreicht das Signal des Sensors wieder die Nulllinie. B) der zeitliche Verlauf verhält sich im Mittel über sechs Fliegen gleich zu der Beispielfliege (A); C/D) Cam2.1 X GH146 Heterozygot: C) Die Signale (links), des Sensors fallen im heterozygoten Zustand deutlich geringer aus, als im homozygoten Zustand (A, links); 1,3 s nach Einsetzen der Stimulation erreicht das Signal sein Maximum und erreicht ca. 2 s nach Ende der Stimulation die Nulllinie; D) Im Mittel über 6 Fliegen erreicht das Signal nach 1 s sein Maximum und fällt dann stetig bis zur Nulllinie ab, die erreicht diese ca. 2 s nach Ende der Duftgabe E/F) YC6.1-96/82 X GH146 heterozygot: E) Das Signal erreicht 0,3 s nach Einsetzen der Stimulation sein Maximum und überschreitet 0,6 s nach Ende des Stimulus die Nulllinie; F) Ähnlicher Zeitlicher Verlauf wie in (E), jedoch überschreitet im Mittel über 6 Fliegen das Signal die Nulllinie erst 1 s nach Ende der Stimulation; G/H) TNXL X GH146 heterozygot: G) In der Beispielfliege steigt das Signal innerhalb von 0,6 s auf sein Maximum hält dann für 1 s ein Plateau um dann 1 s nach Ende der Stimulation auf die Nulllinie zurückzufallen ; H) im Mittel über 6 Fliegen kommt es bei Signal-Onset zu einer Verzögerung von 0,3 s nach Beginn der Stimulation ehe der Sensor beginnt zu steigen, das Maximum erreicht er anschließend innerhalb von 0,3 s und fällt dann stetig ab, um 1,6 s nach Ende der Stimulation die Nulllinie zu überschreiten; I/J) G-CamP 1.6 X GH146 heterozygot (grün: Rohdaten; schwarz: bleichkorrigierte Daten) I) Auf die Stimulation kommt es im Calyx und dem lateralen Horn zu einer deutlichen Aktivierung bestimmter Regionen (links); im zeitlichen Verlauf erreicht das Signal ca. 1 s nach Duft-Onset das Maximum und fällt dann stetig innerhalb von 2,5 s auf die Nulllinie zurück (bleichkorrigierte Daten, schwarz). Die Rohdaten machen den Anschein eines sehr viel schnelleren Abfalls, ca. 0,6 s nach Ende der Duftstimulation; J) zeitlicher Verlauf des Calcium-Signals im Mittel über 6 Fliegen verhält sich ähnlich wie der der Beispielfliege (I). Alle Skalierungsbalken: 50 $\mu$ m.**

Im homozygoten Zustand für Gal4 und UAS erzeugten die getesteten Fliegen im Maximum (1s nach Beginn der Duftpräsentation) eine mittlere Signaländerung von  $4,3\% \pm 0,92\%$  im Vergleich zur Ratio der Grundfluoreszenz im Ruhezustand (Abb. 4.9 B). Bei Betrachtung der falschfarbenkodierten Bilder zur Zeit der Stimulationen kann man deutlich eine räumlich inhomogene Verteilung der Signale im Calyx und im lateralen Protocerebrum erkennen (Abb. 4.9 A). Die räumliche Verteilung der durch einen gewissen Duft aktivierten synaptischen Boutons bleibt gleich, so dass die Signalbilder in einer Fliege über die sechs gemessenen Durchläufe gemittelt werden konnten, was in einer Verbesserung des Signal/Rausch- Verhältnisses resultierte. An dem hier gewählten Beispiel der homozygoten Cam2.1-82/GH146 Tiere ist auch der Unterschied in der Signalstärke von Fliege zu Fliege gut zu erkennen, so zeigt diese Fliege eine maximale Änderung in der Ratio von  $7,86\% \pm 0,67\%$  im Vergleich zur Ratio der Grundfluoreszenz im Ruhezustand, während der Mittelwert von 6 Fliegen bei  $4,25\% \pm 0,92\%$  liegt. Nach Erreichen des Maximums der Signaländerung flacht das Signal schon relativ schnell wieder ab, noch bevor die Präsentation des Duftes

zu Ende ist. Im Anschluss daran kommt es zu einer Art stationäre Phase des Signals und es braucht sehr lange (ca. 5 s) um wieder auf die Grundratio des Ruhezustandes zurückzugehen. Im heterozygoten Zustand für UAS und Gal4 geben die Fliegen im Mittel ein etwas niedrigeres Signal auf den Duftstimulus ( $3,41\% \pm 0,98\%$ ) (Abb. 4.9 D), wobei aber der Unterschied zu den homozygoten Tieren nicht signifikant ist. Auch die allgemeine Kinetik des Signals ist vergleichbar zu den Signalen der Homozygoten. Bei Betrachtung des falschfarbenkodierten Signalbildes kann man jedoch sehr deutlich sehen, dass die räumliche Verteilung der Signale zwar erkennbar ist, aber im Vergleich zu dem Falschfarbenbild der homozygot exprimierenden Fliegen das Signal sehr viel stärker verwaschen ist.

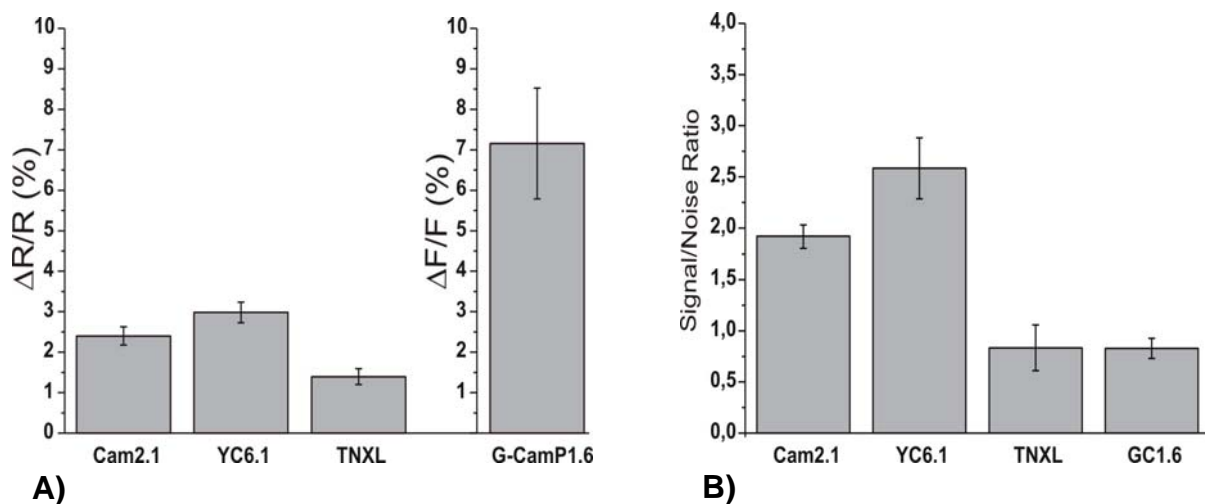
Wie schon oben erwähnt wurden die Fliegen, die den Sensor YC6.1 exprimieren, durch eine Kombination eines Fliegenstammes mit einer zweitchromosomalen Insertion mit einem Fliegenstamm mit einer drittchromosomalen Insertion erzeugt, um die Expressionsstärke der YC6.1 – Fliegen mit der für die Linie 2.1-82 vergleichbar zu machen. Die Signalstärke liegt bei Tieren mit zwei Kopien des Sensors YC6.1 im Mittel über sechs Fliegen bei  $3,99\% \pm 0,6\%$  (Abb. 4.9 F). Bei vergleichbarer Expressionsstärke zeigen YC6.1 und Cam2.1 ungefähr gleichstarke Signale auf die Duftstimulation. Auffällig ist aber hier, dass bei YC6.1 das Maximum der Signaländerung bereits nach 0,3 s erreicht ist (Abb. 4.9 F), bei Cam2.1 jedoch erst nach ungefähr einer Sekunde (Abb. 4.9 D). Nach Erreichen des Maximums fällt das Signal noch während der Duftgabe schon langsam ab, beschleunigt aber seinen Rückfall auf die Ratio der Grundfluoreszenzen des Ruhezustands nach Beendigung der Duftpräsentation rapide (Abb. 4.9 F).

Für die TN-Sensoren wurde der TNXL zur detaillierteren Charakterisierung durch duftvezierte Signale herangezogen, da die Grundfluoreszenz des Sensors TNL-15 sehr viel geringer ausfiel und keine zuverlässigen Signale auf die Duftstimulation hin detektiert werden konnten. Der Sensor erreicht auf die Duftstimulation hin ein Signalmaximum von  $2,79\% \pm 0,57\%$  und erreicht dieses nach ca. 0,6 s (Abb. 4.9 H), wobei zu beachten ist, dass der Sensor vor dem Anstieg zum Maximum des Signals eine Verzögerung von 0,3 s zeigt. Noch während der Duftgabe fällt das Signal nach Erreichen des Maximums schon stetig ab und erreicht die Grundfluoreszenz des Ruhezustands etwa 2 s nach Beendigung der Duftstimulation (Abb.4.9 H).

Der nicht ratiometrische Sensor G-CamP1.6 zeigte sehr viel stärkere Signale auf die Duftgabe hin als die ratiometrischen Sensoren. So bewegen sich die Änderungen der Fluoreszenz nach Berücksichtigung einer Bleichkorrektur bei Erreichen des Maximums, ca. 1s nach Stimulationsbeginn, im Mittel um die  $11,14\% \pm 3,99$  im Vergleich zur Grundfluoreszenz des Ruhezustands (Abb. 4.9 H – schwarze Linie). Nach Erreichen des Maximums geht das Signal auch sehr schnell wieder zurück auf die Grundfluoreszenz und erreichten diesen Zustand 0,3 s nach Ende der Stimulation. Diese Werte gelten für die bleichkorrigierten Daten. In den Originaldaten (Abb. 4.9 H – grüne Linie) ist das extreme Bleichen (ca. 30% in 4 s) (Abb. 4.9 G/H) gut zu erkennen. Dies macht eine Bleichkorrektur notwendig um vernünftige Aussagen über das Verhalten und die Kinetik des Sensors auf die Duftstimulation hin machen zu können. Eine Erstellung von falschfarbenkodierte Signalbildern macht auch hier sehr schön die Aktivierung von einzelnen Regionen in den höheren Hirnzentren des Calyx und des lateralen Protocerebrums sichtbar (Abb. 4.9 I)

Um zusammenfassend die Qualität der Sensoren vergleichen zu können wurden zunächst die Signale über den gesamten Zeitraum der Duftstimulation gemittelt. Als entscheidender Parameter wurde dann das Verhältnis von Signal zu Rauschen für die einzelnen Sensoren bestimmt und diese Werte mit einander verglichen. Zur Berechnung dieses Verhältnisses wurden die Signale an ihren Maxima durch ihre Standardabweichungen geteilt und das Verhältnis dargestellt. Da Reiff et al. (2005) in ihrer Arbeit zeigen konnten, dass die Expressionsstärke direkt auf das Verhältnis von Signal zu Rauschen Einfluss nimmt, wurden für diese Analyse lediglich die Daten herangezogen, die aus den Messungen heterozygoter Tiere für Sensor und Treiber erhoben wurden. Hierbei zeigt Yellow Cameleon 2.1 über den gesamten Zeitraum der Stimulation hinweg mit  $2,40\% \pm 0,23\%$  ein ähnlich großes Signal wie YC6.1 mit  $2,9\% \pm 0,25\%$  (Abb. 4.10 A). Der Sensor TNXL zeigt lediglich ein Signal über die gesamte Dauer der Stimulation von  $1,39\% \pm 0,19\%$  (Abb. 4.10 A). Nach Errechnung einer Bleichkorrektur für den Sensor G-CamP1.6, bei der die Funktion des Bleichens von der Aktivitätskurve des Signals abgezogen wurde, wurde auch das Signal über den Zeitraum während des Stimulus bestimmt. Hierbei ergab sich ein absolutes Signal über die gesamte Dauer der Stimulation von  $7,16\% \pm 1,37\%$  (Abb. 4.10 A). Die Errechnung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen (S/R) ergab, dass die

verbesserte Version der Cameleon Sensoren, der Sensor YC6.1 im Vergleich zu seinem Vorgänger YC2.1 ein tendenziell, jedoch nicht signifikant besseres Verhältnis von Signal zu Rauschen zeigt ( $p=0,063$ ). So ergibt sich für den Sensor Cam2.1 ein S/R-Verhältnis von  $1,92 \pm 0,27$  und für YC6.1 ein S/R von  $2,58 \pm 0,73$  (Abb.3.10 B). Trotz seiner ratiometrischen Eigenschaften zeigt der Sensor TNXL bei Messungen im lebenden Organismus ein sehr viel schlechteres S/R als die Sensoren Cam2.1 und YC6.1. Sein S/R-Wert liegt bei  $0,83 \pm 0,55$  und ist damit nicht signifikant unterschiedlich zu dem des zirkulär permutierten Sensors G-CamP1.6 mit einem S/R von  $0,83 \pm 0,22$  ( $p=0,118$ ) (Abb. 4.10 B).



**Abb. 4.10) Signal zu Rauschen (S/R) der verschiedenen Sensoren. A) Gegenüberstellung der über den Zeitraum der Stimulation (2s) gemittelten Signale.** Von den ratiometrischen Sensoren YC2.1, YC6.1 und TNXL zeigt der Sensor TNXL mit  $1,39\% \pm 0,2\%$  das geringste Signal über die gesamte Stimulation hinweg (YC6.1:  $2,98\% \pm 0,25\%$ ; Cam2.1:  $2,4\% \pm 0,23\%$ ). Der nicht ratiometrische Sensor G-CamP1.6 gibt auf den Stimulus hin sehr viel höheres Signal als die ratiometrischen Sensoren und produziert ein Signal von  $7,16\% \pm 1,37\%$ . **B) Direkte Darstellung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen (errechnet als: Signal / SD), errechnet über die gesamte Länge der Stimulation.** YC2.1 ( $1,92 \pm 0,27$ ) & YC6.1 ( $2,58 \pm 0,73$ ) zeigen ein deutlich besseres S/R im Vergleich zu den anderen getesteten Sensoren. Das S/R des Sensors YC6.1 ist tendenziell jedoch nicht signifikant besser als das von YC2.1 ( $p=0,063$ ). Für den Sensor TNXL ergibt sich das schlechteste S/R unter der ratiometrischen Sensoren ( $0,83 \pm 0,22$ ). Für G-CamP1.6 ergibt sich ein S/R von  $0,83 \pm 0,10$ .

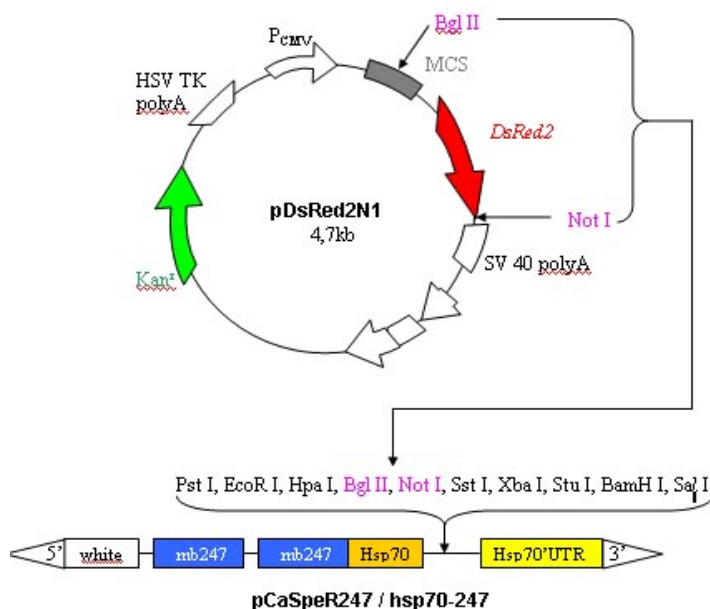
## 4.2 mb247-DsRED – Fliegen

### 4.2.1 mb247-DsRED als Landmarke im Gehirn

Das dopaminerge System von *Drosophila melanogaster* stellt ein sehr verzweigtes Netzwerk von Neuronen dar, das sich über das ganze Gehirn erstreckt. Für einen besseren Überblick während des Experiments wäre es also von Nutzen, sich bestimmte Landmarken im Gehirn zu generieren, die es einem ermöglichen sich grob zu orientieren, in welchen Regionen man eine Messung vornimmt. Zu diesem Zweck wurde eine Fliege generiert, welche das rot fluoreszierende Protein DsRED (Matz et al., 1999) unabhängig von der Kontrolle durch Gal4 in den Pilzkörperloben exprimiert. Hierfür wurde DsRED in einen abgeänderten CaSpeR-Vektor kloniert, der zwei Kopien des mb247-Promotor beinhaltet, welcher die Expression des dahinterliegenden Gens in den Loben der Pilzkörper treibt. So können die Pilzkörperloben mit ihrer vom UAS-Gal4 System unabhängiger roten Fluoreszenz als Orientierungshilfe im Gehirn dienen.

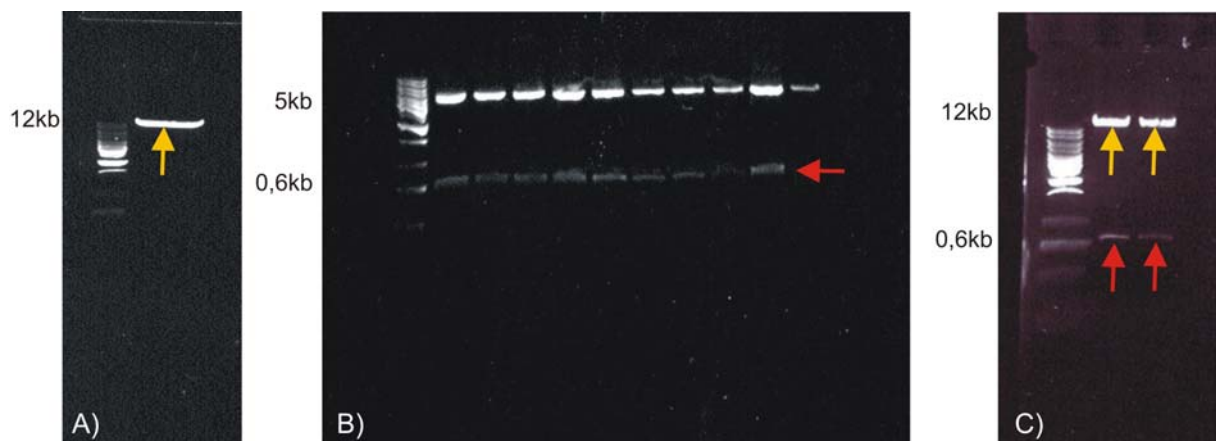
### 4.2.2 Klonierungsstrategie

Der als Grundbaustein verwendete abgeänderte CaSpeR-Vektor wurde von Andreas Thum zur Verfügung gestellt. Er beinhaltet neben den zwei mb247 Promotorsequenzen einen schwachen Heatshock Promotor und eine multiple cloning site, über die das zu exprimierende Gen eingefügt werden kann.



**Abb. 4.11) Schema zur Klonierung von DsRED in CaSpeR247:** Das DsRED-Insert wird über Bgl II und Not I aus dem Ursprungsvektor heraus geschnitten, der Empfänger – pCaSpeR247, wird über die selben Schnittstellen linearisiert und das Insert hineinligiert.

Weiterhin beinhaltet der CaSpeR247 eine Mini-white-Sequenz, die es im weiteren Verlauf ermöglicht, erfolgreich transformierte Tiere an der Augenfarbe zu erkennen. Für die Klonierung musste das DsRED-Insert zunächst über die Schnittstellen Bgl II und Not I aus seinem Ursprungsvektor herausgeschnitten und in den über die selben Schnittstellen geöffneten CaSpeR247 einligiert werden.



**Abb. 4.12) Klonierung des DsRED in den Zielvektor CaSpeR247:** **A)** Restriktionsverdau von CaSpeR247 über die Schnittstellen Bgl II und Not I (gelber Pfeil); **B)** Restriktionsverdau des DsRED-Inserts über Bgl II und Not I (roter Pfeil); **C)** DsRED-Insert (roter Pfeil) im Zielvektor CaSpeR247 (gelber Pfeil).

Wie erwartet ergab der Restriktionsverdau des CaSpeR247-Vektors über die Enzyme Bgl II und Not I ein linearisiertes Fragment bei einer Größe von ca. 12kb (Abb. 4.12 A, gelber Pfeil). Über die selben Enzyme konnte das ca. 600bp große DsRED-Insert in der richtigen Orientierung aus seinem Ursprungsvektor herausgeschnitten werden (Abb. 4.12 B, roter Pfeil). Der geöffnete CaSpeR247-Vektor und das DsRED-Fragment wurden im nächsten Schritt in einer Ligationsreaktion miteinander verbunden, und mit dem Ligationsansatz Zellen transformiert. Die gewachsenen Zellen wurden anschließend auf die Insertion gescreent und der Transformationsvektor (Abb. 4.12 C, gelbe Pfeile) mit dem richtigen Insert (Abb. 4.12 C, rote Pfeile) wurde amplifiziert und für die Keimbahntransformation vorbereitet.

### 4.2.3 Keimbahntransformation

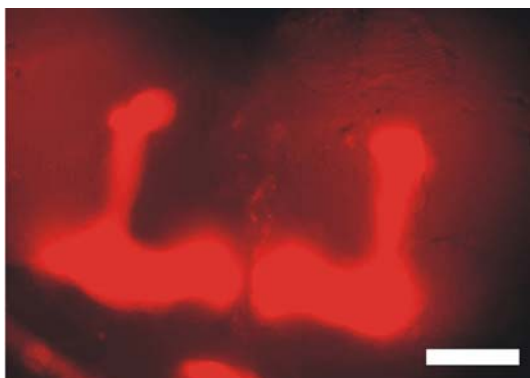
Der Transformationsvektor mit dem inserierten DsRED wurde in  $w^{1118}$  Embryonen injiziert und die aus den injizierten Embryonen geschlüpften Fliegen wurden gegen  $w^{1118}$  Fliegen rückgekreuzt. Die daraus resultierende  $G_1$ -Generation wurde nach dem auf dem CaSpeR-Vektor liegenden white-Augenfarbenmarker gescreent. Die Transformanten sollten anhand der gelben bis roten Augenfarbe, je nach Expressionsstärke des inserierten p-Elements, von den Nichttransformanten gut zu unterscheiden sein. Es wurden für die Insertion 3 unterschiedliche Transformanten isoliert und für jene eine homozygote Linie etabliert.

<i>Injizierte Embryonen:</i>	480
<i>Umgesetzte Larven, (% der Embryonen):</i>	186, (38,75%)
<i>Geschlüpfte <math>G_0</math>-Fliegen, (% der Larven):</i>	20, (10,75%)
<i>→ davon fertile, (% der <math>G_0</math>):</i>	19, (95,00%)
<i>Transformanten in der <math>G_1</math>:</i>	3
<i>Transformanten pro injizierter Embryonen:</i>	0,625%

**Tab. 4.1) Transformationsstatistik der Transformation von DsRED-mb247 in  $w^{1118}$  Embryonen**

### 4.2.4 Expressionseigenschaften von mb247-DsRED

Zur Untersuchung der Funktionalität des Transgens wurden Gehirne adulter Fliegen präpariert und auf ihre Fluoreszenz hin untersucht. Es zeigte sich, dass die Linie mb247-DsRED 13 die stärkste Fluoreszenz aufwies. Eine chromosomale Kartierung des Transgens über Balancerkreuzungen mittels zweit- und dritt- chromosomalen Doppelbalancern (siehe Material und Methoden) für diese Linie ergab eine zweifache Insertion, zum einen auf dem zweiten zum anderen auf dem dritten Chromosom.

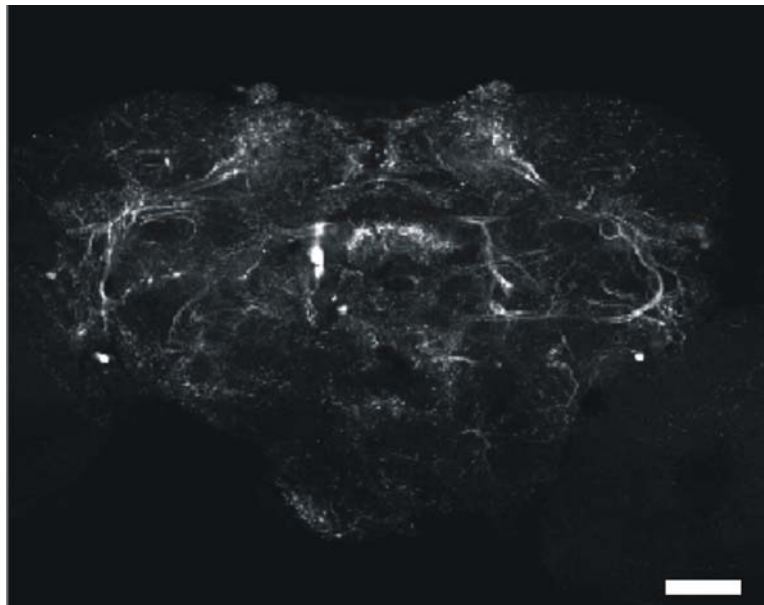


**Abb. 4.13) Expressionsmuster der Linie mb247-DsRED13.** Auflichtmikroskopische Aufnahme eines Gehirns einer adulten Fliege. Starke Expression von DsRED in den horizontalen und vertikalen Loben. Fluoreszenz-Mikroskop / TexasRed-Filter. Skalierungsbalken: 50µm

### 4.3 Das dopminerger System von *Drosophila melanogaster*

#### 4.3.1 Kolokalisationsstudien zur Untersuchung der Spezifität der TH-Gal4 Treiber Linie

Das Gehirn von *Drosophila melanogaster* wird sehr engmaschig von Neuronen durchwoben (Abb. 4.14), die unter der Kontrolle des Promotors der Tyrosin Hydroxylase (TH) das Reporterprotein Yellow Cameleon 2.1 (Cam2.1) exprimieren was eine Färbung mit Antikörpern gegen GFP eindrucksvoll zeigt.

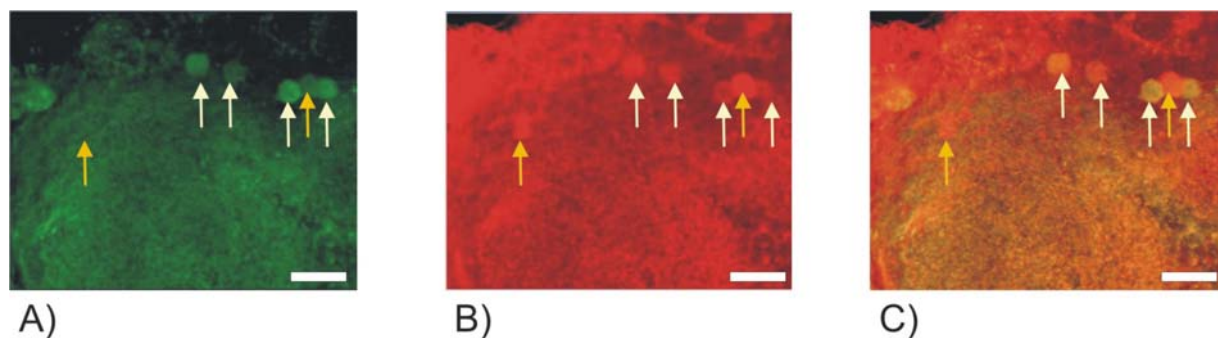


**Abb. 4.14:** TH-Gal4 getriebene Expression von Cam2.1 in den dopaminergen Zellen im Gehirn einer adulten Fliege. (zur Verfügung gestellt von A. Fiala). Skalierungsbalken: 50µm.

Das Enzym Tyrosin Hydroxylase stellt das Schlüsselenzym in der Herstellung des biogenen Amins Dopamin dar. Somit sollte die Färbung absolut spezifisch für alle dopaminergen Neurone sein. Da aber klonierte Promotorregionen oft unvollständig sind, ist es möglich, dass solche Gal4-Linien die Expression nicht nur in den wirklichen Zielzellen treiben, sondern auch unspezifisch in anderen Zellen, in denen dieses Enzym nicht exprimiert wird. Daher muss zunächst das Expressionsmuster der verwendeten Gal4-Linie auf ihre Spezifität untersucht werden. Darüber hinaus sind anatomische Studien über die Vernetzung der markierten Zellen hilfreich, um einen besseren Eindruck über das Ziel der axonalen Projektionen einzelner Zellcluster zu ihren Zielregionen zu bekommen. Um die Spezifität der TH-Gal4



Treiberlinie zu überprüfen wurden Färbungen durchgeführt, bei denen die von TH-Gal4 getriebene ektopische Expression des Yellow Cameleon 2.1 (Abb. 4.15 A) und die Expression von Dopamin (Abb. 4.15 B) in der Fliege gegen einander verglichen wurden. Hierbei konnte eine große Übereinstimmung der Expressionsmuster festgestellt werden (Abb. 4.15 A-C, weiße Pfeile), jedoch wurden auch Zellen detektiert, die zwar Dopamin bilden aber kein Yellow Cameleon 2.1 exprimieren. Dies lässt darauf schließen, dass die TH-Gal4-Treiber-Linie zwar einen großen Teil der Dopamin produzierenden Zellen abdeckt, jedoch nicht alle. Es konnten jedenfalls in den untersuchten Zellclustern keinerlei Zellen gefunden werden, die Cam2.1 exprimierten, jedoch nicht dopaminerg wären. Bei dem hier untersuchten Neuronengruppe handelte es sich um ein Zellcluster, das dorso-lateral zu den Pilzkörperloben liegt, und zumindest einen Teil seiner Projektionen von dort in Richtung der horizontalen Loben schickt.

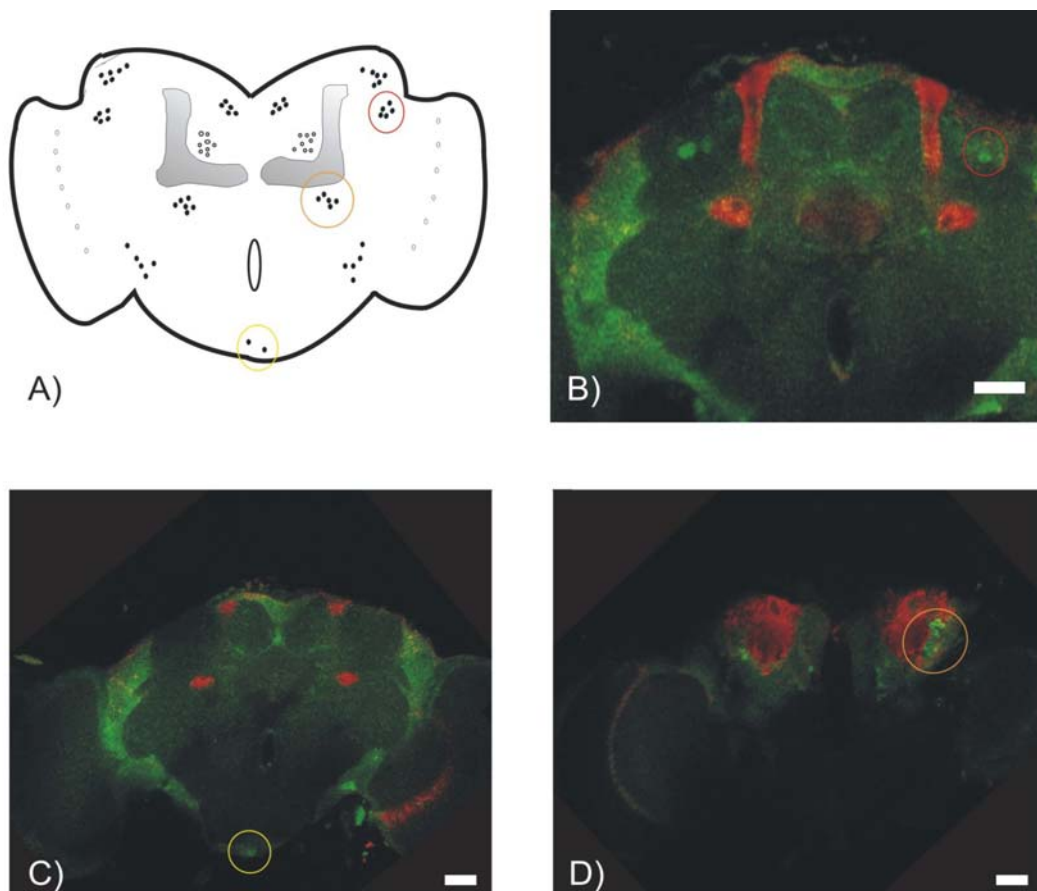


**Abb. 4.15) Spezifität der Treiber-Linie TH-Gal4 in einem dorsolateralen Cluster dopaminergere Zellen einer adulten Fliege.** **A)** Expressionsmuster des von TH-Gal4 getriebenen Cameleonproteins. **B)** Immunhistochemische Färbung gegen Dopamin, zweiter Antikörper Cy3. **C)** Überlagerung der zwei Fluoreszenzen. Zellen die dopaminerg sind und auch Cam2.1 exprimieren sind mit einem weißen Pfeil markiert, Zellen, die keine Expression des Yellow Cameleon 2.1 zeigen, jedoch dopaminerg sind, sind mit gelben Pfeilen gekennzeichnet. Skalierungs-balken: 10µm.

#### 4.3.2. Anatomische Studien zum Dopaminergen System

Mit Hilfe einer Fliegenlinie, die als Orientierungshilfe unabhängig vom UAS-Gal4-System das rot fluoreszierende DsRED unter der Kontrolle des mb247 Promotors in den Pilzkörpern exprimiert (siehe 4.2.1-4), war es möglich, durch Vergleich mit älteren Färbungen von Budnik und White (1988) einzelne Zellcluster zu identifizieren. Hierzu wurden Hirne adulter Mb247-DsRED Fliegen präpariert und immunhistochemische Färbungen gegen Tyrosin Hydroxylase durchgeführt und unter

dem konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht. Hierbei konnten eindeutig gewisse Zellcluster den alten Nomenklaturen zugeordnet werden. So wurde ein Zellcluster, das lateral zu den  $\alpha$ -Loben der Pilzkörper liegt als das PPL1-Cluster (dorsolateral posterior protocerebral) nach Budnik und White (1988) identifiziert (Abb. 4.16 A, B, roter Kreis).

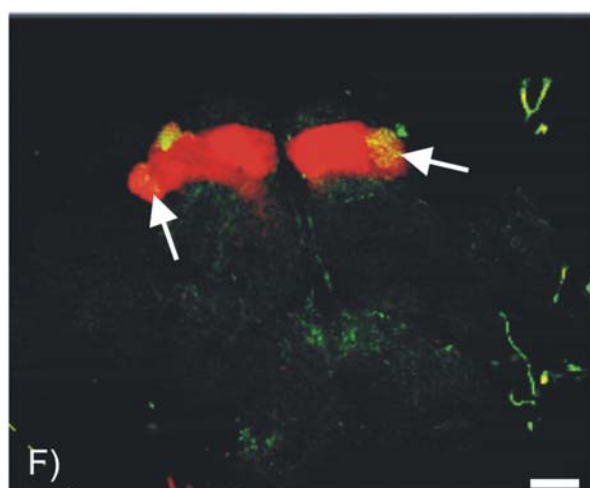
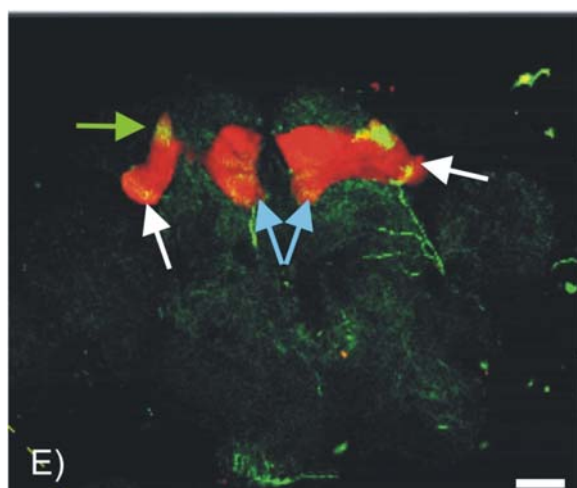
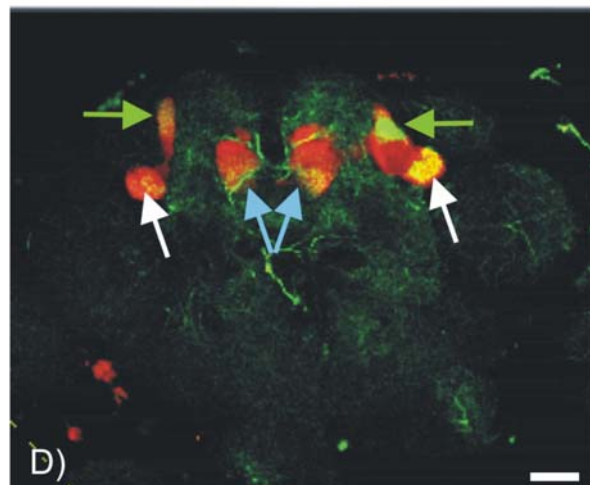
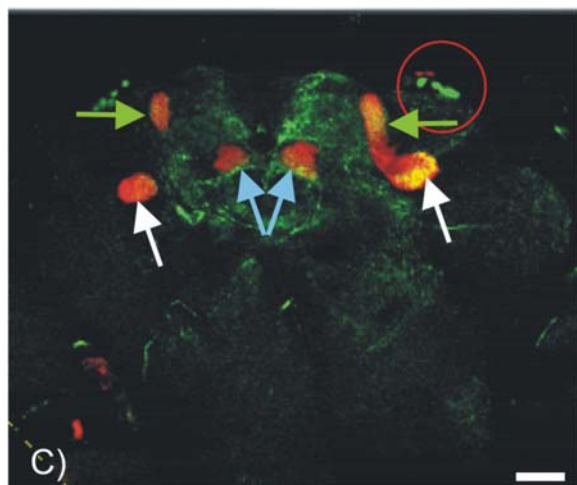
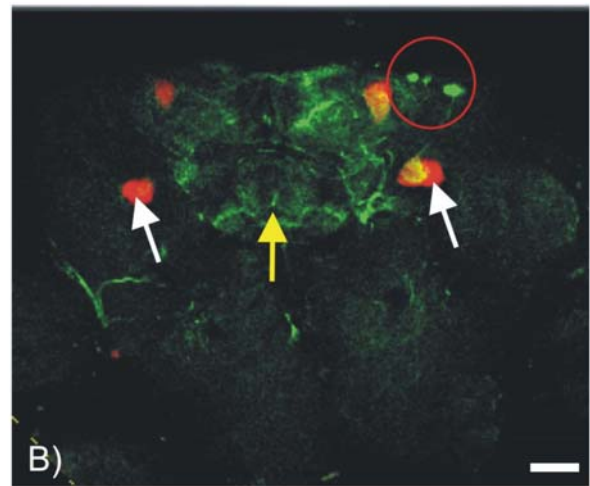
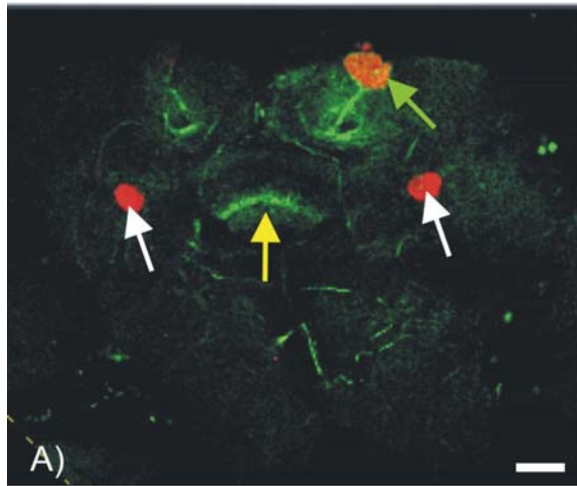


**Abb. 4.16) Verteilung dopaminergener Zellcluster im Gehirn adulter Fliegen:**

**A)** Schematische Darstellung zur Anatomie der dopaminergen Zellen im Gehirn adulter Fliegen (nach Budnik & White, 1988). Die dorsolateralen posterioren protocerebralen Zellen (PPL1-Cluster) sind durch einen roten Kreis gekennzeichnet, die dorsomedialen posterior protocerebralen Zellcluster (PPM3) durch einen orangenen Kreis und die subösophagealen dopaminergen Zellen durch einen gelben Kreis. **B)** Focus auf die PPL1-Cluster (roter Kreis); **C)** Focus auf die subösophagealen dopaminergen Zellen (gelb); **D)** Focus auf die PPM3-Cluster (orange). **B-D)** Immunhistochemische Färbung gegen Tyrosin Hydroxylase (grüne Fluoreszenz) an Gehirnen adulter mb247-DsRED-Fliegen. 20-fache Vergrößerung. Alle Skalierungsbalken: 50 $\mu$ m.

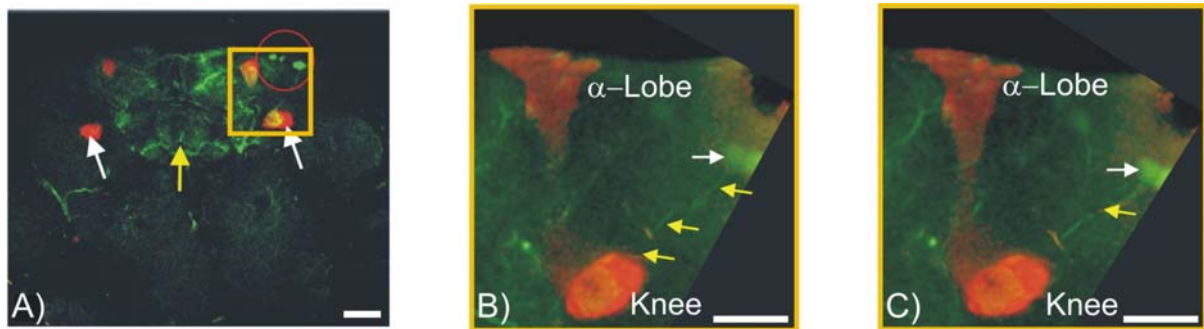
Etwas weiter dorsal und medial zu diesen Zellen liegt ein Cluster um die Calyces herum, das als dorsomediales posterior protocerebrales Cluster benannt wurde (PPM3) (Abb. 4.16 A, D orangener Kreis). Dieses Zellcluster liegt zwar in direkter Nähe zu den Calyces, scheint aber keinerlei Arborisationen in diese hineinzuschicken, sondern sendet seine Projektionen in Richtung der horizontalen

Loben der Pilzkörper, was im weiteren Verlauf der Arbeit noch deutlicher aufgezeigt werden wird. Zwei weitere dopaminerge Zellen, die der Nomenklatur nach Budnik zugeteilt werden konnten, liegen unterhalb des Ösophagus und wurden als subösophageale Zellen bezeichnet (Abb. 4.16 A, C, gelber Kreis).



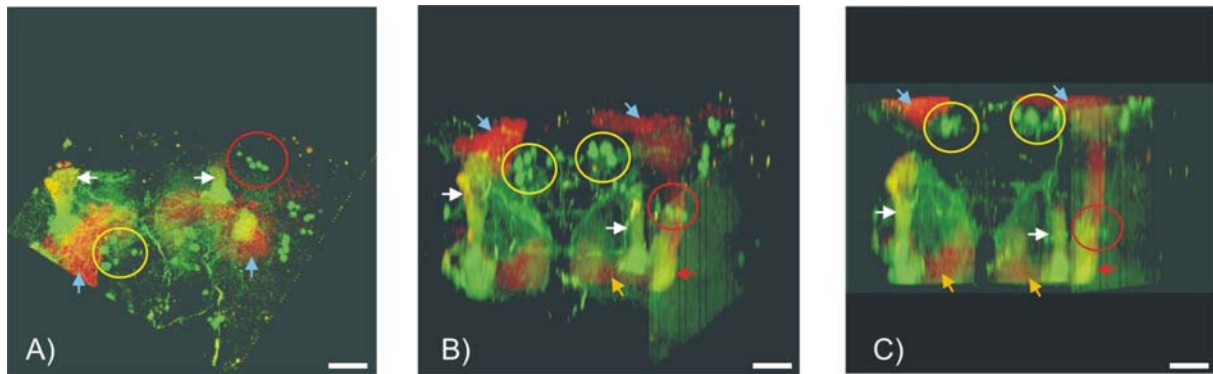
**Abb. 4.17) Innervationsmuster von dopaminergen Neuronen in die Pilzkörper: TH-Cam2.1 x mb247-DsRED, Konfocale Schnitte durch das Gehirn einer adulten Fliege, Cy3/FITC-Filter, 20 x Vergrößerung: A)** Die Spitzen der  $\alpha$ -Loben zeigen eine starke Innervation durch dopaminerge Neuronen (grüne Pfeile), während die Pedunkel der Pilzkörper auf dieser Focusebene nur ganz fein innerviert sind (weiße Pfeile), außerdem konnte eine dichte Innervation des fächerförmigen Körpers durch dopaminerge Neuronen festgestellt werden (gelber Pfeil). **B)** Die PPL1-Neuronen (roter Kreis) senden Projektionen in Richtung des Pedunkels (weißer Pfeil), weiterhin ist eine schwache Innervationen des Zentralkomplexes zu erkennen (gelber Pfeil). **C)** Dichte Innervationen im Knie des  $\gamma$ -Lobus, wahrscheinlich vom PPL1-Cluster herkommend (weiße Pfeile), weiterhin dichte Innervationen der  $\alpha$ -Loben (grüne Pfeile), sowie der Spitzen der  $\beta$ -Loben (blaue Pfeile). **D,E)** Innervationsmuster wie in C), jedoch anterior zu C) gelegen. **F)** Innervationen der Knieregion der  $\gamma$ -Loben. Alle Skalierungsbalken: 50 $\mu$ m.

Von besonderem Interesse für diese Arbeit waren die dopaminergen Zellcluster, die zu den Pilzkörperloben hin projizieren. Nachdem die Spezifität der TH-Gal4 Expression über die Antikörperfärbung bestätigt und die Lage der dopaminergen Cluster grob lokalisiert werden konnten, wurde nun nach bestimmten Clustern gesucht die zu den Pilzkörperloben hin projizieren. Hierfür wurden Fliegen, die unter TH-Gal4 Kontrolle Cam2.1 exprimieren, mit den mb247-DsRED-Fliegen gekreuzt und in der LIII-Larve nach solchen gescreent, die beide Fluoreszenzen aufwiesen. Diese wurden dann im Adult-Stadium präpariert und unter dem Konfokal-Mikroskop untersucht. Die Schnitte zeigten, dass sowohl die horizontalen als auch die vertikalen Loben dicht von dopaminergen Neuronen innerviert werden, ebenso wie die Strukturen des Zentralkomplexes, insbesondere des fächerförmigen Körpers (Abb. 4.17 A, B gelber Pfeil). Im Pedunkel kann man zunächst nur ganz feine dopaminerge Innervationen erkennen (Abb. 4.17 A, weiße Pfeile), während die Spitzen der  $\alpha$ -Loben in dieser Ebene sehr starke Innervationen zeigen (Abb. 4.17 A, grüne Pfeile). Dem Pedunkel weiter nach anterior folgend nimmt die Innervation dieser Struktur durch dopaminerge Zellen stark zu (Abb. 4.17 B, weiße Pfeile), wobei zumindest ein Teil dieser Innervationen von dem Cluster der PPL1-Zellen (Abb. 4.17 B, roter Kreis; Abb. 4.18 A, roter Kreis; Abb. 4.18 B/C – weißer Pfeil) herzukommen scheint (Abb. 4.18 B/C – gelbe Pfeile). In der Region des Knies des  $\gamma$ -Lobus nimmt die Dichte an dopaminergen Zellprojektionen sehr stark zu (Abb. 4.17 C-F, weiße Pfeile), während die  $\beta$ -Loben nur an ihren Spitzen innerviert zu sein scheinen (Abb. 4.17 C-E, blaue Pfeile). Die  $\alpha$ -Loben bleiben in allen Ebenen ungefähr gleich stark innerviert (Abb. 4.17 C, D, grüne Pfeile). Bei höherer Vergrößerung kann man sehen, wie zumindest eines der PPL1-Neuronen seine Projektionen in Richtung des Knies der Pilzkörper schickt (Abb. 4.18 A-C).



**Abb. 4.18) Projektionen einer Zelle des PPL1-Clusters hin zur Knie-Region der Pilzkörper-loben:**  
**A)** Gesamtauficht auf das Gehirn einer adulten mb247-DsRES x TH-Gal4/Cam2.1-Fliege; leichte Innervation des Zentralkomplex (gelber Pfeil) durch dopaminerge Neuronen, starke Innervationen des Knies unter anderem auch durch einzelne Neuronen aus dem PPL1-Cluster (roter Kreis) (20 x Vergrößerung). Das gelbe Quadrat zeigt das Feld der Vergrößerung. **B/C)** 40x-Vergrößerung des gelben Feldes. Eine Zelle des PPL1-Clusters (weißer Pfeil) sendet seine Projektionen in Richtung des Knies der Pilzkörperloben aus (gelbe Pfeile). Alle Skalierungsbalken: 50 $\mu$ m.

Die horizontalen virtuellen Schnitte des Konfokalmikroskops können nur teilweise die räumliche Zusammenhänge der Neuronencluster und den Verlauf ihrer Projektionen aufklären. Unter Zuhilfenahme von bildverarbeitender Computersoftware ist es jedoch möglich die einzelnen Schnitte zu einem dreidimensionalen Bild zusammen zufügen, das dann besser Aufschluss hierüber geben kann. So liegen rund um den Calyx herum dopaminerge Zellkörper die aber den Calyx selbst nicht zu innervieren scheinen, jedenfalls konnten bei den durchgeführten Färbungen keinerlei Arborisationen im Calyx selbst festgestellt werden. Die Cluster der PPL1-Zellen (Abb. 4.17 B/C; Abb. 4.19 A-C, roter Kreis) projizieren zumindest teilweise von ihren Somata aus hin zum Knie des  $\gamma$ -Lobus (Abb. 4.18 B/C, weißer Pfeil), während die um den Calyx (Abb. 4.19 A-C, blaue Pfeile) herum dorsomedial liegenden PPM3-Clusterzellen (Abb. 4.19 A-C, gelber Kreis) ihre Projektionen in Richtung der horizontalen Loben zu senden scheinen (Abb. 4.19 C). Wie bei den horizontalen Schnitten bereits gut zu sehen war zeigt auch die dreidimensionale Rekonstruktion der konfokalen Schnitte eine sehr dichte Innervation der vertikalen (Abb. 4.17 A-E, grüne Pfeile; Abb. 4.19 A-C, weiße Pfeile) und der horizontalen Loben (Abb. 4.17 B-F, weiße Pfeile; Abb. 4.19 B/C, gelbe Pfeile). Die  $\alpha$ -Loben scheinen komplett von dopaminergen Neuronen durchwoben zu sein, während bei den  $\beta$ - Loben nur die Spitzen, an denen sich die Loben der beiden Hemisphären treffen, besonders starke Innervationen zeigen.



**Abb. 4.19) 3D-Rekonstruktion der Konfokalen Schnitte: Innervationen der Pilzkörperloben durch dopaminerge Neuronen: A)** Caudale Aufsicht auf die Pilzkörper, gut zu sehen sind die PPL1- (roter Kreis) und PPL3-Cluster (gelber Kreis) (vgl.: Abb. 4.16 A), starke Innervationen in die  $\alpha$ -Loben (weiße Pfeile) und in das Knie der  $\gamma$ -Loben (roter Pfeil). **B)** 45° - Aufsicht zu A), Innervationen in die  $\alpha$ -Loben und in die  $\gamma$ -Loben sind von dieser Aufsicht besser zu erkennen. **C)** 90°-Aufsicht zu A): zu sehen sind sehr deutlich die Projektionen der PPM3-Zellen (gelbe Kreise), die um den Calyx (blaue Pfeile) herum liegen, hinunter zu den horizontalen Loben der Pilzkörper. Skalierungsbalken: 50 $\mu$ m.

Die Pedunkel, in denen die Kenyonzellen von den Calyces hinunter zu den Loben ziehen, wo sie sich dann unterschiedlich verzweigen, scheinen nur sehr wenig von solchen dopaminergen Zellen innerviert zu werden, lediglich in der Region des Knies an den  $\gamma$ -Loben ist eine sehr deutliche Kolo-kalisation von dopaminergen Neuronen und mit dem in den Pilzkörpern getriebenen DsRED zu detektieren, was auf eine dichte Innervation schließen lässt (Abb. 4.19 B, C, roter Pfeil)

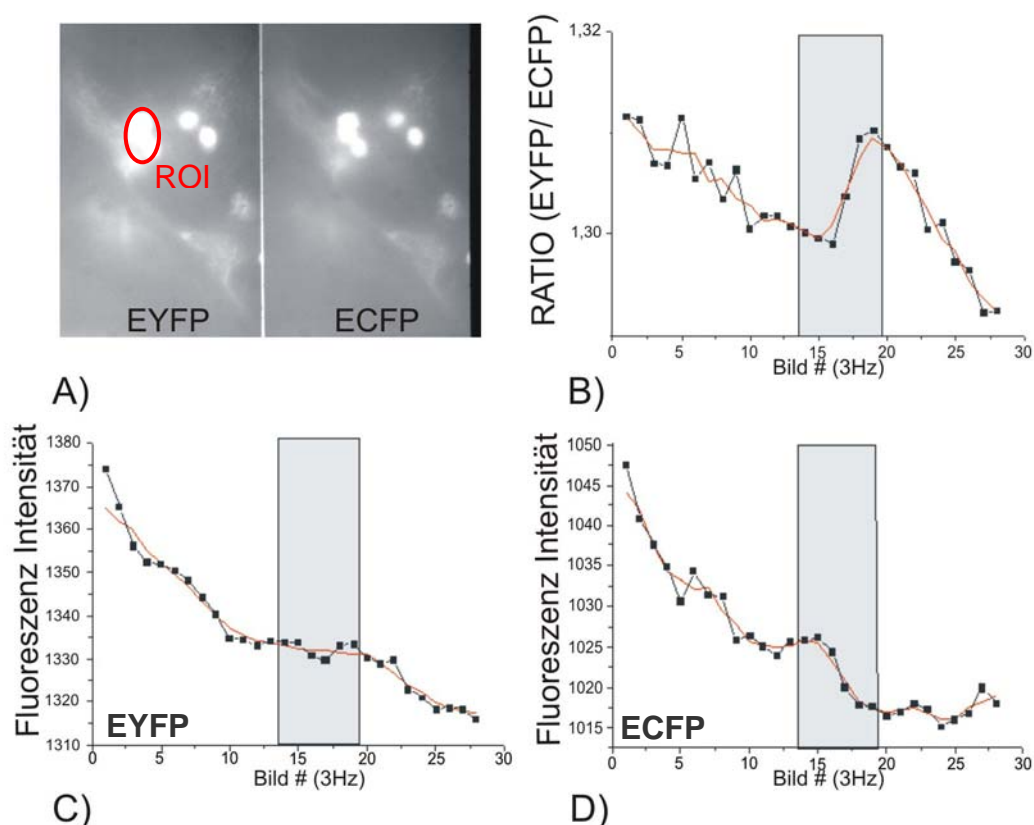
Durch virtuelle konfokale Schnitte und deren dreidimensionale Rekonstruktionen ist es möglich ein Bild über die räumliche Verteilung der gefärbten Zellen zu bekommen und bei einzelnen Fällen, wie in Abb. 4.18 A-C gezeigt, einzelne Projektionen dopaminergere Zellen von ihrem Soma hin zu ihrem Ziel zu verfolgen. Das dopaminerge System ist jedoch zu verwoben und kompliziert um exakte Aussagen machen zu können, welche Zellen welche Strukturen im Gehirn als Ziel haben.

Untersuchungen haben gezeigt, dass das olfaktorische Gedächtnis von *Drosophila melanogaster* mit den Strukturen der Pilzkörper korreliert. Daher wurde der Focus der weiteren Arbeit auf solche Neurone gerichtet, die zu dieser Struktur projizieren. Da aber eine eindeutige Identifikation der Zellcluster im lebenden Tier aufgrund der begrenzten Auflösung nicht möglich ist, und wie oben dargestellt, keine exakten Aussagen über die Zielregionen der Projektionen einzelner Somata gemacht werden können, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf die Projektionen fokussiert, die direkt in die horizontalen Pilzkörperloben projizieren.

## 4.4 Untersuchungen des dopaminergen *Reinforcement*-Systems von *Drosophila melanogaster* mittels *Calcium Imaging*

### 4.4.1 Aktivierbarkeit dopaminergener Neurone durch Elektroschocks

Wie schon in der Einleitung dargestellt, konnten vorangegangene Studien von Schwärzel et al. (2003) zeigen, dass die Prozessierung bestrafender Stimuli direkt vom dopaminergen System abhängig ist, da durch Blockierung dieser Neurone während des Trainings eine signifikante Reduktion des Lernens zu beobachten ist. Dies lässt darauf schließen, dass dopaminerge Neurone durch den Stimulus des Elektroschocks aktiviert werden. Um dies zu überprüfen, wurden im Vorfeld dieser Arbeit von Fiala & Stock zunächst die Somata dopaminergener Neurone auf ihre Aktivierbarkeit durch einen Elektroschock hin untersucht.



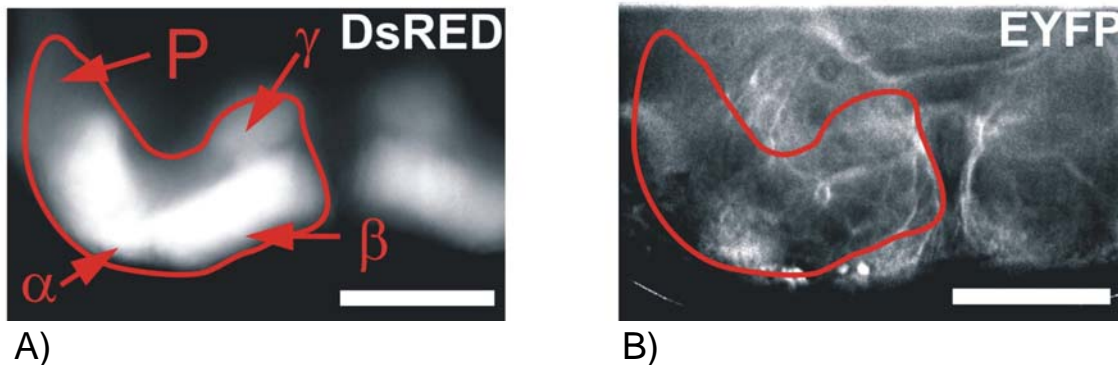
**Abb. 4.20) Aktivierbarkeit dopaminergener Zellen durch Elektroschocks:** **A)** Aufsicht auf ein dopaminerges Zellcluster in einer lebenden adulten Fliege (40x Vergrößerung). Zum Messen werden die zwei Fluoreszenzen (EYFP/ ECFP) des Yellow Cameleon 2.1 getrennt voneinander in definierte Regionen (roter Kreis; ROI: region of interest) aufgenommen und anschließend miteinander verrechnet. **B)** Graphische Darstellung der Ratio eines Ca-Signals im Soma auf einen Elektroschock. Die Dauer des Schocks, repräsentiert durch den grauen Kasten, beträgt 2 s (6 Bilder). **C)** Signal des EYFP – die Fluoreszenz steigt auf den Stimulus hin leicht an. **D)** Signal des ECFP – ein deutlich Abfall der Fluoreszenz des ECFP nach dem Stimulus. (zur Verfügung gestellt von Fiala & Stock)

Hierzu wird einer adulten Fliege ein Loch in die Kopfkapsel geschnitten, so dass man mit dem Objektiv eines Mikroskops optischen Zugang zum Hirn bekommt. Dann wird die Fliege auf ein Gitter gespannt, so dass sie positiven und negativen Pol berührt und unter dem Mikroskop fixiert. Mit Hilfe eines geteilten CCD-Chips (siehe: Methoden) werden die zwei Fluoreszenzbilder des EYFP und des ECFP des Calciumsensors Yellow Cameleon 2.1 (Cam2.1) getrennt von einander, jedoch zeitgleich mit einer Frequenz von 3Hz aufgenommen (Abb. 4.20 A). Der Quotient aus zwei Fluoreszenzwerten ergibt für jeden Bildpunkt einen Ratiowert, der über einen ausgewählten Bereich (region of interest, ROI) gemittelt. Aufschluss über die Intensität des Signals gibt. Auf den Stimulus des Elektroschocks hin kann man sehr deutlich sehen, dass es zu einem Abfall der Fluoreszenz im Kanal des ECFP kommt (Abb. 4.20 D). EYFP (Abb. 4.20 C) dagegen steigt, wenn auch verhalten zum gleichen Zeitpunkt, an dem ECFP abfällt. Die Gegenläufigkeit der Signale schließt ein Bewegungsartefakt aus. Das Signal, das in den Somata der dopaminergen Zellen auf die Stimulierung hin festgestellt werden konnte, gibt ein, wenn auch kleines, dennoch deutliches Signal (ca. 1,5%). Jedoch scheint es erst mit einer Verzögerung von ca. 0,6 s nach Beginn des Elektroschocks zu einer Aktivierung der dopaminergen Neurone zu kommen. Wie schon erwähnt, ist das dopaminerge System jedoch zu unübersichtlich, um im lebenden Tier während eines Versuches mit Sicherheit sagen zu können, welche Zellcluster man misst und wohin deren Projektionen ziehen. Daher wurde in dieser Arbeit auf die dopaminergen Projektionen zu den, für das olfaktorische Lernen relevanten, Pilzkörperloben fokussiert, um deren Aktivitäten zu messen.

Für die nachfolgenden Versuche wurde zunächst über Balancer-Kreuzungen die TH-Gal4-Treiberlinie mit der UAS-Cam2.1-Linie kombiniert, um eine stabil exprimierende Linie für den Reporter zu erhalten (siehe Methoden). Die daraus hervorgegangenen Fliegen wurden dann mit der Linie mb247-DsRED gekreuzt, die unabhängig vom UAS-System das rotfluoreszierende DsRED in den Pilzkörperloben exprimiert. Aus dieser Kreuzung gingen dann in der F1-Generation Fliegen hervor, die beide Fluoreszenzen – rot in den Pilzkörpern und cyan/ gelb des Yellow Cameleon 2.1 in den dopaminergen Neuronen - exprimieren. Die bei 505 nm angeregte rote Fluoreszenz wurde dann als Landmarke zur Orientierung im Gehirn benutzt. Nachdem die Loben in den Focus gesetzt wurden (Abb. 4.21 A) konnte nun eine



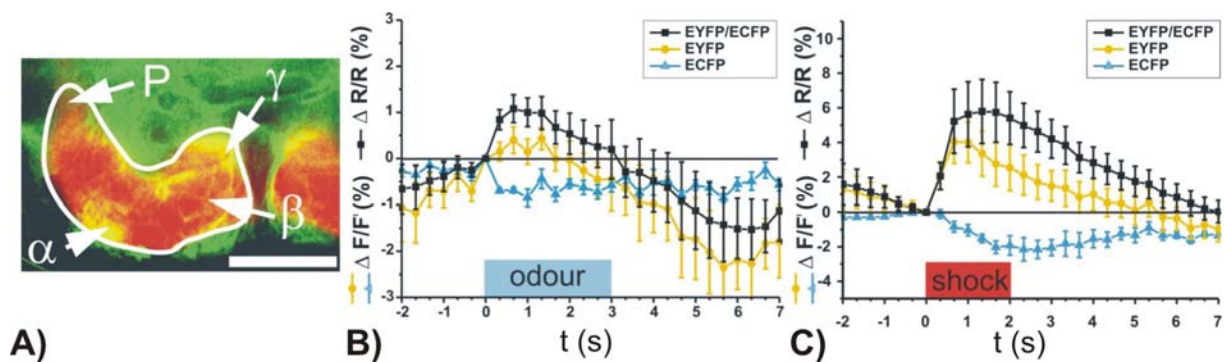
Region festgelegt werden, in der dann die spätere Messung der Aktivitäten vorgenommen werden sollte (Abb. 4.21 A/B – rote Umrahmung). Dann wurden die Filter gewechselt und das in den dopaminergen Neuronen exprimierte Yellow Cameleon 2.1 gemessen (Abb. 4.21 B).



**Abb. 4.21) Orientierung anhand einer fluoreszierenden Landmarke im Gehirn einer adulten Fliege:** **A)** Expressionsmuster von DsRED in den Pilzkörpern einer adulten Fliege. Mit Hilfe der roten Fluoreszenz der Pilzkörper wird die Region festgelegt (rote Umrahmung), die Teile des Pedunkels (P), des  $\gamma$ -Lobus ( $\gamma$ ), die  $\beta$ -Loben ( $\beta$ ) und eine dorsale Aufsicht auf die  $\alpha$ -Loben ( $\alpha$ ) beinhaltet. **B)** Expression von Cam2.1 in dopaminergen Neuronen: Nach Markierung der Region, die gemessen werden soll, kann nun in den dopaminergen Neuronen die Calciumaktivität bestimmt werden (nach Riemensperger et al., 2005). Skalierungsbalken: 50 $\mu$ m.

In den ersten Vorversuchen (in Zusammenarbeit mit Thomas Völler, siehe auch: Völler, 2005) ging es nun darum zu untersuchen, ob eine Aktivierbarkeit der dopaminergen Neuronen auch in deren Projektionen festgestellt werden kann. Hierfür wurden zehn Tage alte Fliegen präpariert und Änderungen in der Fluoreszenz des Yellow Cameleon 2.1 in der Region der Pilzkörper (Abb. 4.21 B; Abb. 4.22 A) auf die Stimuli Düfte und Elektroschock (120 V) hin gemessen. Die Tiere (n=5) wurden vier mal den verwendeten Düften ausgesetzt. Für die Duftstimulation wurden die Düfte Ethylacetat und Benzaldehyd gewählt, da dies Düfte sind, die schon vorher in verschiedenen Verhaltensexperimenten verwendet wurden und Spall (2004) in seiner Arbeit zeigen konnte, dass die Düfte in der Konzentration  $10^{-3}$  zumindest die Projektionsneurone in gleichem Maße anregen. Die Untersuchungen der Aktivitäten der Neuronen auf die Duftstimulation hin zeigten, dass die dopaminergen Neurone eine schwache, aber dennoch signifikante Antwort ( $p < 0,05$ ) auf die in den Versuchen verwendeten Düfte zeigten, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Düften festgestellt werden konnten ( $p > 0,05$ ). Die Daten der zwei Duftstimulationen wurden daher gepoolt, was ein Signal ergab, das bei einer Änderung der Ratio auf die Duftstimulation von  $1,1\% \pm 0,3\%$  (Abb. 4.22 A) lag.

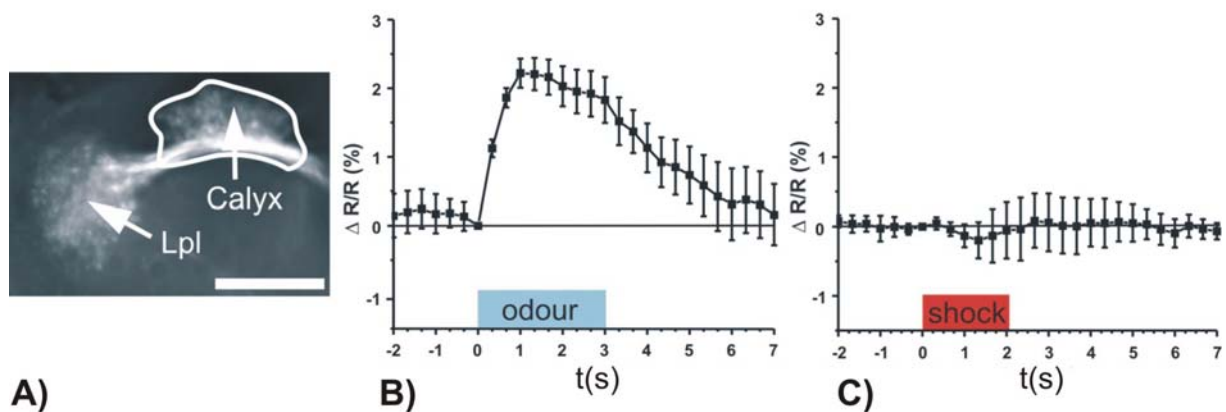
Während die Antworten auf die Duftreize eher gering ausfielen, zeigten die dopaminergen Neurone auf den Elektroschock hin ein fast 5 mal größeres Signal, und zwar eine Änderung der Ratio von  $5,8\% \pm 1,9\%$ . Das Maximum dieses Signals wurde ca. 1,3 s nach Beginn der Schockgabe erreicht und hielt dann an bis ungefähr 4 s nach Beenden des Stimulus ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$  Fliegen; Mittel aus 2-8 Stimulationen pro Fliege). Die Gegenläufigkeit der Signale des EYFP und des ECFP, sowohl auf die Duftstimulation als auch auf die Schockstimulation hin, schließt ein Bewegungsartefakt aus, da bei einem solchen sich beide Fluoreszenzen auf dem Graphen in die gleiche Richtung bewegen würden (Abb. 4.22 B/C – blaue Kurve = ECFP, gelbe Kurve = EYFP, schwarze Kurve = resultierende Ratio ( $F^{EYFP}/F^{ECFP}$ ) in Prozent, normiert auf den letzten Zeitpunkt vor dem Stimulus)



**Abb. 4.22) Aktivität von dopaminergen Neuronen auf Duft- und Elektroschock-Stimulation:** **A)** Überlagerungen der zwei in Abb. 27 dargestellten Fluoreszenzen DsRED (rot) und EYFP (grün) aus Cam2.1. Die Überlagerung zeigt deutlich die Innervationsmuster der dopaminergen Neurone zu den Pilzkörpern hin. Skalierungsbalken:  $50\mu\text{m}$ . **B)** Durch Duft (blauer Balken) evozierte Calciumsignaländerungen ( $1,1\% \pm 0,3\%$  in der Ratio). **C)** Elektroschock-Stimulation (roter Balken) evoziert ein 5-fach höheres Signal von  $5,8\% \pm 1,9\%$  Ratioänderung in den gleichen Fliegen (Riemensperder et al., 2005).

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den auf den Elektroschock hin detektierten Signalen nicht um das Resultat einer generellen unspezifischen Aktivierung des ganzen Gehirns handelt, wurden die selben Versuche mit Fliegen durchgeführt, die Yellow Cameleon 2.1 in den olfaktorischen Projektionsneuronen exprimierten, welche die Antennalloben mit den höheren Hirnzentren der Calyces und des lateralen Protocerebrums verbinden und somit zentrale Komponenten für die Verarbeitung von olfaktorischen Informationen darstellen. Unter den selben Bedingungen, unter denen auch die Fliegen analysiert wurden, die Yellow Cameleon 2.1 in den dopaminergen Neuronen exprimierten, wurden diese Fliegen auch zunächst auf Duft und dann auf den Schock hin untersucht, wobei hier die Daten, die durch die Stimulationen durch

zwei Däfte erhoben wurden, wiederum gepoolt wurden. In den Arborisationen der Projektionsneuronen im Calyx konnten auf die Däfte hin verlässlich und wiederholbar Calciumsignale einer Intensität, die im Mittel  $2,2\% \pm 0,2\%$  in der Ratioänderung betrug, festgestellt werden (Abb. 4.23 B;  $n=8$  Fliegen, Mittel aus 8 Stimulationen pro Fliege). Auf die Stimulationen durch Elektroschocks dagegen konnten keinerlei Calciumsignale detektiert werden. Diese Ergebnisse widersprechen der Möglichkeit einer allgemeinen unspezifischen Depolarisation des Gehirns durch den 120 V starken Elektroschock.

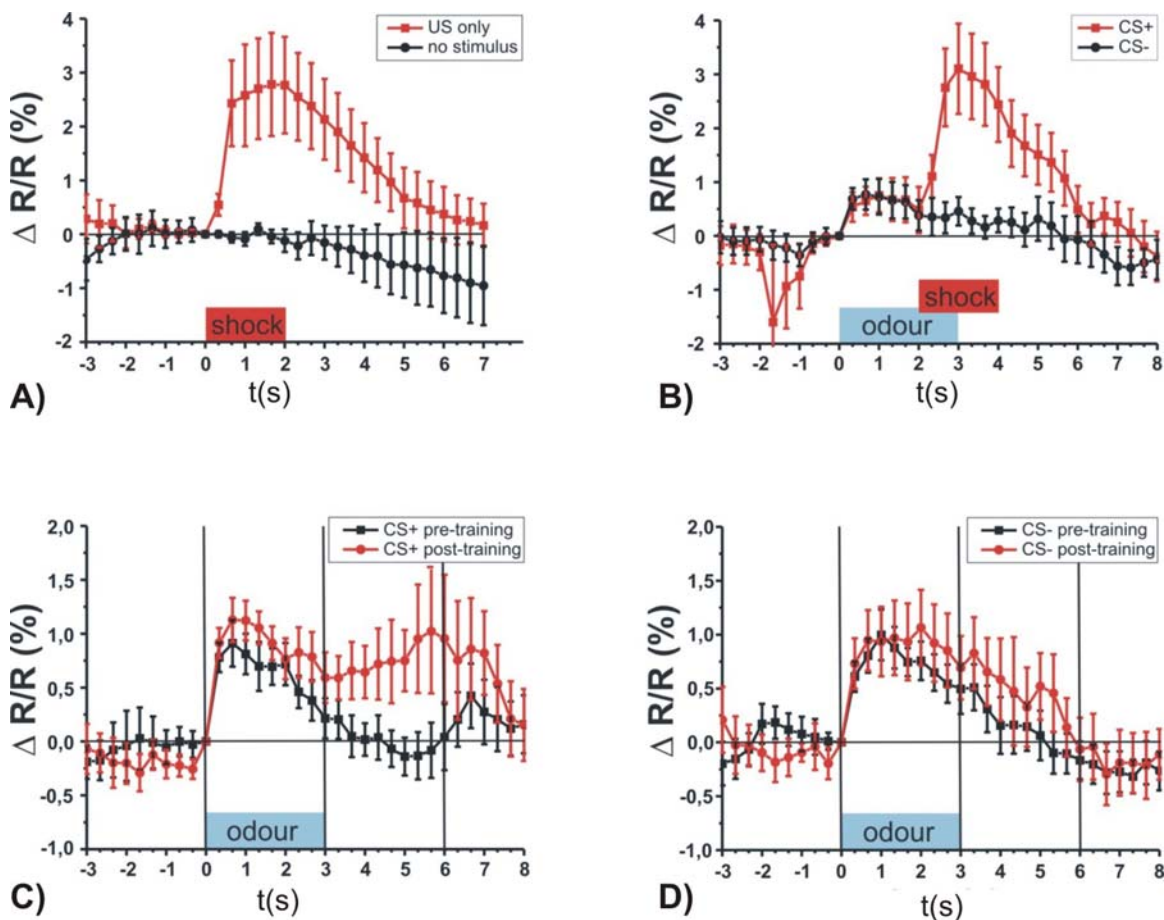


**Abb. 4.23) Aktivität von olfaktorischen Projektionsneuronen auf Duft- und Elektroschock-Stimulation:** **A)** Olfaktorische Rezeptorneurone einer adulten Fliege, die Messregion ist durch eine weiße Umrahmung gekennzeichnet. Skalierungsbalken:  $50\mu\text{m}$ . **B)** Die Änderung der Calciumaktivität der Projektionsneurone auf die applizierten Däfte (blauer Balken) hin liegt bei  $2,2\% \pm 0,2\%$ . **C)** Auf den Elektroschock (roter Balken) hin konnte keinerlei Änderung der Calciumkonzentration in den Neuronen detektiert werden (Riemensperger et al., 2005).

#### 4.4.2 Experimente zur Untersuchung prädiktiver Eigenschaften dopaminergere Neurone

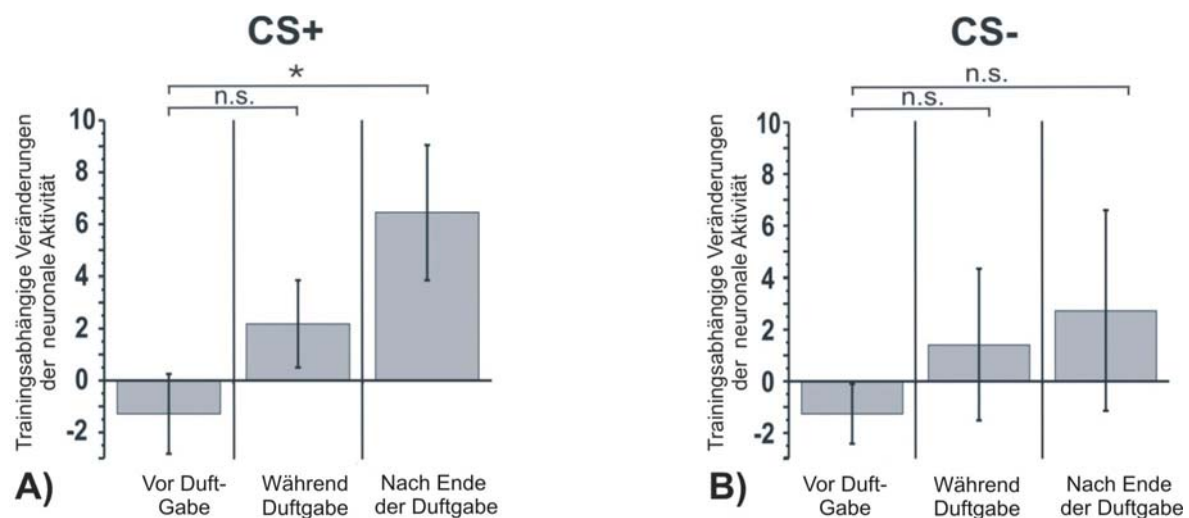
Mit den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass, wie die Ergebnisse von Schwärzel et al. (2003) haben erwarten lassen, die dopaminergen Zellen durch aversive Stimulation, wie zum Beispiel Elektroschocks, aktivierbar sind. Bei Vertebraten werden, wie schon in der Einleitung erwähnt, nicht die aversiven, sondern die belohnenden Stimuli durch die dopaminergen Neuronen vermittelt. Weiterhin konnte bei Vertebraten eine andere interessante Eigenschaft dieser Neuronen festgestellt werden, nämlich, dass sie die Belohnungsreize nicht nur vermitteln, sondern auch vorhersagen können, wenn diese zuvor mit einem vorher-sagenden Stimulus gepaart wurden (Schultz, 2002). Um zu untersuchen, ob

dopaminerge Neurone bei *Drosophila* ähnliche Effekte zeigen, wurden die Fliegen einem bestimmten Training unterzogen (in Zusammenarbeit mit Thomas Völler, siehe auch: Völler, 2005). In einem ersten Schritt, in dem zunächst überprüft wurde, ob die Fliege die Präparation gut überstanden hatte, wurde zunächst ein Elektroschock verabreicht. Nach einer Pause von 20 s wurde die Fliege einem Messdurchlauf ohne jegliche Stimulation unterzogen, um eventuelle Spontanaktivität ausschließen zu können. Im zweiten Teil des Experiments wurden nun den Fliegen die zwei verwendeten Düfte ohne Bestrafung in einer Prätrainingsphase präsentiert.



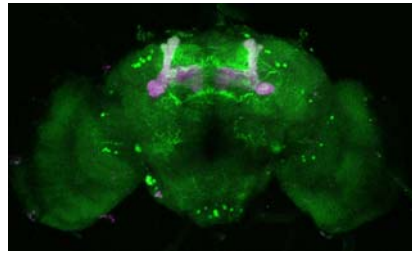
**Abb. 4.24) Dopaminerge Neuronen ändern ihre Calcium Signale auf die präsentierten Düfte während des Trainings der Fliegen: Dargestellt ist jeweils die Ratio, errechnet aus den Fluoreszenzen von EYFP und ECFP und normiert auf den letzten Zeitpunkt vor der Stimulation. A)** Die rote Kurve zeigt das Signal auf einen Elektroschock, während ohne Schock keine Signale zu detektieren sind (schwarze Kurve). **B)** Aktivität der dopaminergen Neurone während des letzten Trainingsdurchlaufs vor dem Test. Einer der beiden Düfte (blauer Balken) ist mit einer Überlappung von 1sec mit einem Elektroschock (roter Balken) gepaart (CS+, rote Kurve), während der andere ohne Reinforcer präsentiert wird (CS-, schwarze Kurve). Beide Düfte geben signifikante Calcium Signale auf die Düfte, bei dem geschockten Duft ist dem Calcium Signal des Duftes die Antwort auf den Schocks überlagert. **C)** Testphase: dargestellt ist der trainierte Duft (CS+) vor ( schwarze Kurve) und nach dem Training (rote Kurve). Nach dem Training ist das Calcium Signal der dopaminergen Neurone verlängert im Vergleich zu vor dem Training. **D)** Dagegen scheint es keine Unterschiede zwischen dem nicht trainierten Duft (CS-) vor (schwarze Kurve) und nach dem Training (rote Kurve) zu geben. Es kommt zu keiner Verlängerung der Aktivität der Neurone auf diesen Duft (Riemensperger et al., 2005).

Das eigentliche Training bestand dann darin, der Fliege in sieben aufeinander folgenden Durchläufen alternierend die beiden Düfte für 3 s zu präsentieren, von denen der eine mit einer 1 s Überlappung mit einem 2 s Elektroschock gepaart wurde, und der andere nach einer Pause von 20 s als Kontrollduft ohne jegliche Bestrafung präsentiert wurde. Zwischen den einzelnen Trainingsläufen wurde immer eine Minute Pause gegeben. Nach dem Training wurden der Fliege abschließend die zwei Düfte ohne Bestrafung präsentiert (für eine detailliertere Darstellung siehe Methoden, Kap.:3.6.7). Im ersten Schritt des Versuches, in welchem dem Tier ein Elektroschock (120 V) ohne Duft präsentiert wurde, ist deutlich zu sehen, dass die dopaminergen Neurone auf die Stimulation hin stark aktiviert werden (Abb. 4.24 A, rote Kurve), während im Kontrolldurchlauf ohne Elektroschock Stimulation keine Aktivierung der Neurone festgestellt werden konnte. Während des Trainings kann man sehen, wie die dopaminergen Neurone schon durch den Duft aktiviert werden (Abb. 4.24 B, rote & schwarze Kurve), das Calciumsignal auf den Elektroschock aber dem Signal der Duftpräsentation überlagert ist (Abb. 4.24 B, rote Kurve). Nach dem Training wurden dann die Calciumsignale auf den konditionierten Duft (CS+) vor dem Training mit den Signal nach dem Training verglichen.



**Abb. 4.25) Mittlere Veränderungen der Duftantwort durch aversive Konditionierung mittels Elektroschock, Daten aus Abb. 24.4 jeweils zusammen gefasst in drei Abschnitten – vor der Duftgabe, während der Duftpräsentation und nach Ende der Duftpräsentation: Die Integrale zwischen der Nulllinie und den Messwerten der Signalkurven vor und nach dem Training wurden berechnet und die Differenz als „Trainingsabhängige Veränderung der neuronalen Aktivität dargestellt: A) Bei dem konditionierten Duft konnte vor und auch während der Duftgabe keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Jedoch kommt es durch das Training zu einer deutlichen Verlängerung der Aktivität auf den trainierten Duft, d.h. zu einer signifikanten Erhöhung der Calciumsignale nach der Duftpräsentation ( $p < 0,02$ ). B) Für den nichtkonditionierten Duft kommt es durch das Training in keinem der gewählten Abschnitte zu signifikanten Veränderungen ( $p_{\text{nach-Duft}} > 0,8$ ) (Riemensperger et al., 2005).**

Dies ergab eine deutliche Verlängerung der Aktivität der dopaminergen Neurone auf den trainierten Duft nach der Konditionierung (Abb. 4.24 C, rote Kurve) im Vergleich zur Aktivität vor der Konditionierung (Abb. 4.24 C, schwarze Kurve). Im Gegensatz dazu kann bei dem Kontrollduft (CS-) keine signifikante Verlängerung der Aktivität der dopaminergen Neurone beobachtet werden. Ohne Konditionierung bleibt das Signal auf den präsentierten Duft vor (Abb. 4.24 D, schwarze Kurve) und nach dem Training (Abb. 4.24 D, rote Kurve) im Wesentlichen unverändert. Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen der Aktivität der dopaminergen Neurone als Antwort auf den konditionierten Duft und den Kontrollduft vor und nach dem Training wurden die Integrale zwischen der Nulllinie und den Werten der einzelnen Kurven berechnet. Die Integrale der Kurven der Signaländerung eines Duftes vor und nach dem Training wurden von einander abgezogen und die Differenzen als trainingsabhängige Aktivitätsänderung graphisch dargestellt (Abb. 4.25). Die gemessenen Kurven wurden in drei verschiedene Abschnitte des Durchlaufs unterteilt – in die Phase vor der Duftpräsentation, die Phase während der Duftgabe und die Phase nach Ende der Duftpräsentation. Die Auswertung bestätigte für den konditionierten Duft, dass der trainingsabhängige Aktivitätsunterschied der dopaminergen Neurone in der Phase vor und während der Duftgabe nicht signifikant von null verschieden ist, während es in der Phase nach Ende der Duftpräsentation zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Integralen der Aktivitätskurven vor und nach dem Training kommt (Abb. 4.25 A). Für den Kontrollduft ergeben sich in keiner der gewählten Phasen signifikante Unterschiede zwischen der Aktivität auf den Duft vor, nach oder während der Stimulation (Abb. 4.25 B).



## 5. Diskussion

### 4.1 *In vivo* Calcium Imaging von neuronalen Aktivitäten im Zentralgehirn von *Drosophila melanogaster*: Ein Vergleich zwischen zirkulär permutierten Sensoren und FRET-basierten Sensoren

Der größte Vorteil genetisch kodierter fluoreszierender Calciumsensoren besteht darin, dass sie selektiv in ganz bestimmten Zielpopulationen von Neuronen im Gehirn exprimiert werden können (Fetcho & Bhatt, 2004). Mit konventionellen Calciumfarbstoffen, wie Fura, ist dies in der Regel nicht möglich. Als Ziel der Etablierung dieser neuen Technik steht das Messen neuronaler Aktivitäten in einem lebenden, sich verhaltenden Tier, um letztendlich die Brücke zwischen Verhalten und neuronalen Aktivitätsmustern schlagen zu können. Neu entwickelte Sensorproteine werden meist als erstes in Zellkulturen oder in Gewebeschnitten untersucht, da diese Systeme, verglichen mit *in-vivo*-Präparaten, bessere Bedingungen für die Applikation von Pharmaka oder die Positionierung von Reizelektroden unter visueller Kontrolle, sowie gut definierte optische Bedingungen für die Fluoreszenzmessung bieten. Solche Charakterisierungen von Sensoren ergeben erste Informationen bezüglich Signalstärke, Bleichen und Fluoreszenzintensität des Sensors. Beim Messen in einem intakten, sich verhaltenden Tier sieht man sich mit neuen Problemen konfrontiert, wie zum Beispiel Bewegungen der zu messenden Gewebe, die durch Muskelkontraktionen oder durch Blutströmungen auftreten und die sich oft nicht vermeiden lassen, auch wenn das Tier fest mit dem Kopf fixiert ist. Ein weiterer Punkt, der die Messungen mit solchen Sensoren im lebenden Tier erschwert, ist die Tatsache, dass man zuweilen nur schwer optischen Zugang zu den ausgewählten Neuronen bekommt, ein Problem, das in einer zweidimensionalen Zellkultur nicht auftritt. Dazu kommt, dass solche neuen Sensoren mit Pharmaka untersucht werden, die, abhängig von ihrer Dosierung sehr starke Antworten hervorrufen können,

während die zellulären Antworten auf physiologisch relevante Stimuli, wie zum Beispiel Düfte, sehr gering ausfallen können. Durch das Testen von Sensoren in Zellkulturen bekommt man demnach zwar Informationen über die allgemeinen Qualitäten eines Sensors, aber sie geben nur wenig bis keinen Aufschluss über dessen Verwendbarkeit im lebenden Organismus. Um in einem sich verhaltenden Tier einsetzbar zu sein, muss ein Sensor verschiedene Voraussetzungen erfüllen, wie zum Beispiel eine Grundfluoreszenz, die stark genug ist, so dass die zu messenden Strukturen im Gehirn vor dem Hintergrund anderer autofluoreszierender Gewebe detektiert werden können. Hinzu kommt, dass der Sensitivitätsbereich des Sensors mit der Größenordnung der Änderungen der Ionenkonzentrationen in einer Zelle auf einen physiologischen Stimulus hin übereinstimmen muss. Als ein weiterer sehr wichtiger Punkt sei noch das Verhältnis von Signal zu Rauschen genannt, das groß genug sein muss, damit ein Signal eindeutig von Bewegungsartefakten oder zufälligen Fluktuationen in den Fluoreszenzeigenschaften zu unterscheiden ist. In anderen Arbeiten wurden solche Sensoren schon in Präparationen der neuromuskulären Synapsen (Reiff et al., 2005) und an Kulturen von Pyramidalzellen und Hippocampusschnitten (Pologruto et al., 2004) verglichen. Eine Studie über das Verhalten solcher Sensoren in intakten Tieren stand bisher aber noch aus. In dieser Arbeit wurden die einzelnen Vor- und Nachteile von sechs verschiedenen Sensoren in Bezug auf eine *in vivo* Situation untersucht. *Drosophila* stellt diesbezüglich ein optimales Modellsystem dar, da über genetische Techniken, wie das UAS-Gal4 System (Duffy, 2002), eine Vielzahl von verschiedenen Sensoren ohne einen hohen Aufwand in den Tieren getestet werden kann. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass die meisten der Arbeiten, bei denen genetisch kodierte Sensoren verwendet wurden, an *Drosophila* durchgeführt wurden (Fiala et al., 2002; Reiff et al., 2002, 2005; Wang et al., 2003; Wang et al., 2004; Yu et al., 2003; Liu et al., 2003).

In einem ersten Schritt wurden zwei der auf dem FRET-Effekt basierten Sensoren, nämlich Yellow Cameleon 2.1 (Miyawaki et., 1999) und Yellow Cameleon 6.1 (Trung et al., 2001) auf ihre Tauglichkeit als Sensoren in lebenden Fliegen untersucht. Um die Qualität der Sensoren aber miteinander vergleichen zu können, wurden zunächst über Western Blot Analysen die Expressionsstärken der Transgene in den einzelnen Fliegenlinien bestimmt. Dies ergab, dass für einen direkten Vergleich zwischen den Sensoren Yellow Cameleon 2.1 und Yellow Cameleon 6.1 zunächst die am stärksten



exprimierenden Linien des Reporters Yellow Cameleon 6.1 miteinander kombiniert werden mussten, um eine Expressionsstärke zu erzielen, die mit der des Sensors Yellow Cameleon 2.1 vergleichbar war. Nachdem über Western Blot sicher gestellt werden konnte, dass die Expressionsstärken der zwei zu vergleichenden Sensoren sich in etwa glichen, wurden die Sensoren unter der Kontrolle einer pilzkörperspezifischen Gal4-Linie auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht. Der Sensor Yellow Cameleon 2.1 wies eine um ca. 60% höhere Fluoreszenzintensität auf als der Sensor Yellow Cameleon 6.1. Aufgrund der begrenzten quantitativen Aussagekraft der Western Blot Analyse (Abb. 4.2) kann dieser relativ geringe Unterschied sowohl an der Stärke der Expression der verschiedenen Linien, als auch an den Fluoreszenzeigenschaften der Sensoren oder einer Kombination beider Faktoren liegen.

Auf ähnliche Weise wurden die Sensoren TNXL und TNL-15 unter der Kontrolle von 201Y in den Pilzkörpern exprimiert und deren Fluoreszenzintensität gemessen. Dies ergab eine ca. 70% stärkere Fluoreszenz für TNXL im Vergleich zu seinem Vorgänger TNL-15, was in diesem Fall sowohl durch Unterschiede in der Expressionsstärke, als auch der Sensoreigenschaften begründet liegen könnte. Jedoch wurde diese Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften von TNXL auch in der Arbeit von Mank et al. (2006) gezeigt.

Für die zirkulär permutierten Sensoren G-CamP1.3 und G-CamP1.6 wurden die gleichen Versuche durchgeführt. Wie Wang JW et al., (2003) und Wang Y et al., (2004) in ihren Arbeiten zeigen konnten, eignen sich die GFP basierten zirkulär permutierten Calciumsensoren sehr gut für die *in vivo* Situation. Wie sich auch in dieser Arbeit herausstellen sollte, geben diese Sensoren eine weitaus stärkere Fluoreszenz als die bei den FRET basierten Sensoren verwendeten Fluorophore EYFP oder ECFP des Yellow Cameleon 2.1 oder 6.1. Die neue Version dieser G-CamP Sensoren, das G-CamP1.6, beinhaltet einige Verbesserungen, die durch zwei Punktmutationen eingeführt wurden (Ohkura et al., 2005). Zum einen wurden die Fluoreszenzeigenschaften verbessert, was die Lokalisation der zu untersuchenden Strukturen stark erleichtert, und zum anderen reift der Sensor bei 37°C schneller als sein Vorgänger, was für *Drosophila* zwar irrelevant ist, aber für Vertebratensysteme von großem Interesse sein könnte. Wie in Zellkultur beobachtet, konnte diese

Untersuchung auch *in vivo* beweisen, dass im Ruhezustand der Sensor G-CamP1.3 eine signifikant um 20% geringere Fluoreszenzintensität zeigt als seine verbesserte Version G-CamP1.6. Auch in diesem Fall kann die etwas höhere Fluoreszenz unter anderem in einem Unterschied der Expressionsstärken liegen.

Um einen ersten Eindruck von den Signalintensitäten, den Signalmaxima, den Auswirkungen von Chloridionen und der Kinetik des Signalverlaufs der Sensoren zu bekommen, wurden die einzelnen Sensoren über das UAS-Gal4 System zunächst über den Treiber 201Y in den Loben der Pilzkörper exprimiert und die Sensoren mit Hilfe von Kaliumsalzen pharmakologisch untersucht. Die Weiterentwicklung des Yellow Cameleon 2.1, das Yellow Cameleon 6.1, zeichnet sich durch einen Austausch des Zielproteins von Calmodulin aus, nämlich durch den Austausch der M13-Sequenz gegen eine pKK-Sequenz. Wie von Truong (2001) in Zellkultur beschrieben, sollte sich dies im Dynamikbereich des Sensors in Bezug auf die Calciumkonzentration in der Zelle und in einem erhöhten FRET-Effekt widerspiegeln. Im Vergleich zu diesen in Kultur durchgeführten Versuchen scheint die Situation *in vivo* in einem intakten Gehirn etwas unterschiedlich zu sein. So ergaben die Versuche *in vivo*, dass keine Verbesserung des FRET-Effekts zu beobachten war. Hingegen konnte gezeigt werden, dass unter den FRET-basierten Sensoren TNXL das höchste Signal bei Depolarisation des Gehirns zeigte. Auch was die Geschwindigkeit des Anstiegs des Signals auf sein Maximum betrifft, schien dieser Sensor den anderen weit überlegen zu sein. Jedoch war es nicht möglich, den Abfall in seiner Geschwindigkeit zu quantifizieren, da die Signale innerhalb der Messdauer nicht mehr unter zehn Prozent des Signalmaximums fielen. Das zum Design dieses Sensors gewählte cpCitrin zeigt, wie erwartet, einen steilen Anstieg auf das Maximum. Auch fällt das CFP in gleichem Maße auf sein Minimum ab. Während jedoch das cpCitrin nach Erreichen des Maximums wieder auf die Fluoreszenz des Ruhezustands zurückfällt, scheint sich das CFP nicht von einem signalabhängigen Bleichen zu erholen und steigt nicht mehr auf die Fluoreszenz des Ruhezustands. Dieser Effekt konnte sowohl bei der Gabe von KCl, als auch bei der Gabe von KGlu beobachtet werden, wobei sich das Citrinderivat auf beide Salze hin relativ gleich in seiner Kinetik und in seinen Fluoreszenzeigenschaften verhält, jedoch das CFP stärker von dem Gluconatsalz beeinträchtigt zu werden scheint. Vor Gabe des Salzes zeigen beide Fluorophore keinerlei nennenswertes Bleichen, was eine

deutliche Verbesserung zu den Cameleonsensoren zu sein scheint. Sowohl das EYFP, das bei TNXL durch das cpCitrin ersetzt wurde, als auch das ECFP der Cameleonsensoren unterliegen einem weitaus stärkeren signalunabhängigen Bleichen als das CFP des TNXL. Jedoch erholen sich diese Fluorophore offensichtlich besser auf das Signal hin als die in TNXL verwendeten Fluoreszenzproteine. Das Problem des signalabhängigen Bleichens zeigt auch der Sensor TNL-15, bei dem das selbe CFP verwendet wurde. Während jedoch das cpCitrin des TNXL zum einen ein höheres Signal gibt und zum anderen wieder auf die Grundfluoreszenz des Ruhezustandes zurückfällt, ist bei dem im TNL-15 verwendeten Citrin ein zum einen schwächeres Signal zu beobachten, zum anderen zeigt das Fluorophor einen „Undershoot“ unter die Fluoreszenz des Ruhezustands, so dass bei gleichem kinetischen Verhalten des CFP wie im TNXL, bei TNL-15 in der Ratio wiederum ein Rückgang auf die Nulllinie zu beobachten ist. Ein Effekt, der auch bei den Cameleonsensoren zu beobachten ist, bei denen sich das ECFP nach dem Erreichen seines Minimums am Signalmaximum nicht mehr ganz zu erholen scheint. Jedoch führt hier wiederum eine Art Undershoot des EYFP auf das Signal hin zu einem Abflachen der Ratio auf die Grundlinie, ein Effekt, der besonders stark bei Yellow Cameleon 6.1 auf die Gabe von KCl hin zu beobachten ist. So scheint dieser Sensor besonders anfällig auf Chloridionen zu reagieren, da es hier nach Erreichen des Maximums zu einem sehr auffälligen Bleichen der gelben Fluoreszenz zu kommen scheint, was aber auf die Applikation von KCl beschränkt ist. Bezüglich der Signalgeschwindigkeit der Sensoren scheinen die TN-Sensoren den Cameleonsensoren überlegen zu sein. Auch das Signalmaximum des TNXL übertrifft das der beiden hier getesteten Cameleonsensoren bei weitem. Jedoch könnte die Tatsache, dass der Sensor TNXL auf die Gabe von Salzen hin in der Ratio nicht mehr die Nulllinie erreicht, in physiologischen Messungen ein Problem darstellen, da nicht nur der Signal-Onset, sondern auch der Signal-Offset von Interesse ist.

Die beiden hier untersuchten zirkulär permutierten Calciumsensoren G-CamP1.3 und die verbesserte Version G-CamP1.6 zeigen auch die schon oben angeführten Probleme des signalabhängigen Bleichens. So ist bei beiden Sensoren unabhängig von der Präsenz von Chloridionen ein starkes Bleichen nach dem Erreichen des Signalmaximums zu registrieren. Von allen Sensoren, ob FRET basiert oder zirkulär permutiert, zeigt der Sensor G-CamP1.6 den schnellsten Anstieg zum

Signalmaximum und den schnellsten Abfall nach dessen Erreichen. Hinzukommt, dass dieser Sensor auch mit die Abstand größten Signale auf die Depolarisation zeigt.

Mit der Gabe von Kaliumsalzen ist es zwar möglich einen extrem starken Calciuminflux zu evozieren, jedoch handelt es sich hierbei um ein Ereignis, mit dem eine Zelle in der Natur nicht konfrontiert wird. So ist diese Methode gut dafür geeignet, Eigenschaften der Sensoren vorab zu charakterisieren. Die Frage jedoch, wie sich solche Sensoren bei physiologischen Reizen verhalten, bleibt durch diese Versuche unbeantwortet. Hierfür wurden die Sensoren in den olfaktorischen Projektionsneuronen exprimiert und die Signale verglichen, die in diesen Zellen durch Düfte evoziert werden. Wie Fiala et al. (2002) in ihrer Arbeit zeigen konnten, handelt es sich hierbei um einen zuverlässigen Versuchsaufbau, bei dem reproduzierbar Aktivitäten auf Düfte detektiert werden können. Den Fliegen wurden hierzu zwei verschiedene Düfte präsentiert, nämlich Isoamylacetat und Benzaldehyd, jeweils in der Konzentration  $10^{-3}$ . Der Sensor Yellow Cameleon 2.1 wurde zum einen im homozygoten Zustand sowohl für den Gal4-Treiber als auch für den Sensor untersucht, zum anderen wurden, um die Sensoren direkt miteinander vergleichbar zu machen, die gleichen Experimente mit Fliegen durchgeführt, die heterozygot für den Sensor und Gal4 waren. Dies ergab, dass Yellow Cameleon 2.1 im homozygoten Zustand ein nur unwesentlich höheres Signal als im heterozygoten Zustand produziert. Die Kinetik des Signalverlaufs lässt keine Unterschiede zwischen dem homozygoten und dem heterozygoten Zustand erkennen. So erreichen die Signale ihre Maxima ca. 1 s nach Beginn der Duftpräsentation und flachen dann nur sehr langsam innerhalb von 2-3 s auf die Grundfluoreszenz ab. Da die Signale stets auf Fluoreszenzänderungen beruhen, ist eine Abhängigkeit ihrer Amplitude und Dynamik von der Expressionsstärke nicht zu erwarten. Lediglich das Rauschen wird bei niedriger Expression stärker, wodurch sich der entscheidende Messparameter, das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen, verschlechtert. Die Sensoren Yellow Cameleon 6.1 und TNXL zeigen die wohl schnellste Kinetik im Anstieg auf den Signal-Onset, und erreichen das Maximum innerhalb von 0,3 s nach Beginn der evozierten Antwort. Jedoch muss hierzu angemerkt werden, dass es bei dem Sensor TNXL zu einer Verzögerung von ungefähr 0,3 s zu kommen scheint, die bei den anderen Sensoren nicht registriert werden konnte. Da alle Sensoren unter gleichen

Bedingungen untersucht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass dies eine Eigenschaft des Sensors ist. Auffällig ist auch, dass TNXL auf KCl und KGlu sehr viel höhere Signale zeigte als die anderen FRET basierten Sensoren, auf physiologische Signal hingegen sich in etwa gleich verhielt. Es scheint also der Fall zu sein, dass dieser Sensor bei hohen Calciumkonzentrationen sehr gut arbeitet, bei niedrigen jedoch nur mäßig. So kann die bei den physiologischen, durch Duft evozierten Signalen beobachtete Verzögerung von 0,3 s vielleicht damit erklärt werden, dass dieser Sensor erst bei höheren Calciumkonzentrationen zuverlässig zu funktionieren scheint, und somit zunächst ein bestimmter Schwellenwert, die Calciumkonzentration betreffend überschritten werden muss. Was Signal-Onset und Offset angeht, so stellt der Sensor Yellow Cameleon 6.1 eine Verbesserung gegenüber seinem Vorgänger dar und zeigt auch im Vergleich mit den anderen Sensoren die schnellsten Kinetiken bei physiologischer Reizung. Der Sensor G-CamP 1.6 produziert zum einen die höchsten Signale auf die Duftstimulation hin, zum anderen auch die schnellste Kinetik was den Signal-Offset angeht, weswegen der Sensor G-CamP 1.6 für schnelle Stimulationspulse wohl der geeignetste wäre, wenn da nicht das Problem des starken Bleichens wäre, das eine lange Messung ohne Unterbrechung, bei der sich der Sensor wieder erholen kann, fast unmöglich macht. Auch was die Signalstärke angeht, gibt der Sensor G-CamP 1.6 die besten Signale, wenn man diesen mit den anderen getesteten Sensoren vergleicht. Die GFP basierenden Sensoren, wie auch das hier getestete G-CamP 1.6, haben gegenüber den ratiometrischen Sensoren verschiedene Vorteile, wie zum Beispiel die Verwendung von nur einer Emissionswellenlänge, was den Aufbau der optischen Apparatur stark vereinfacht, da lediglich nur ein dichroidischer Spiegel und nur ein Emissionsfilter benötigt werden. Dies bringt hierzu noch einen zweiten Vorteil, nämlich, dass man bei Verwendung einer CCD-Camera den ganzen Chip für die eine Wellenlänge benutzen kann, was wiederum eine Verbesserung der Auflösung bzw. eine Vergrößerung der zu messenden Regionen mit sich bringt. Auch die Verwendung eines regulären GFP stellt eine Vereinfachung der Experimente dar, da die meisten handelsüblichen Konfokalmikroskope mit einem Laser zur Anregung dieses Proteins und dem dazugehörigen Filter-Setup ausgestattet sind. Ein großer Nachteil dieser Sensoren ergibt sich jedoch aus einem ihrer Vorteile, nämlich aus gerade der Verwendung von nur einer Wellenlänge. Während bei den ratiometrischen Sensoren, wie Yellow Cameleon 2.1 oder 6.1 Calciumsignale aufgrund des gegenläufigen

Verlaufs der Fluoreszenzen von EYFP und ECFP eindeutig von Bewegungsartefakten zu unterscheiden sind, können bei geringen Signalen bei den G-CaMP Sensoren hierbei Zweifel bestehen. Dies stellt ein Problem dar, welches für die Anwendung der Sensoren wie zum Beispiel in Hippocampusschnitten nicht relevant ist, bei einer Messung in einem lebenden sich bewegendem Tier aber einen sehr wichtigen Faktor darstellt. So ändern sich die Fluoreszenzwerte allein durch die Bewegung des Präparates in Richtung der z-Achse des Mikroskops drastisch. Dies könnte bei einer durch einen Duft evozierten starken Bewegung Probleme ergeben, da dann das Calciumsignal von einem zeitgleich auftretenden Bewegungsartefakt zu trennen ist. Da bei FRET basierten Sensoren das Signal aus der Ratio zwischen zwei Fluoreszenzen, die bei Calciumeinstrom gegeneinander laufen, errechnet wird, minimiert dies die Probleme, die durch solche Bewegungen entstehen. Um diesen Effekt zu quantifizieren wurden die Werte der Signale im Verhältnis zu deren Standardabweichungen dargestellt, was einen Wert für das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen (S/R) ergibt. Diese S/R-Werte geben Aufschluss darüber wie gut der Sensor die eigentlichen Signale gegenüber Hintergrundaktivitäten und Bewegungsartefakten auflösen kann. Wie zu erwarten (s.o.) und auch schon von Reiff et al. (2005) in ihrer Arbeit an der neuromuskulären Synapse dargestellt, beeinflusst auch bei Messungen im Gehirn der Fliege die Menge an exprimiertem Protein das S/R-Verhältnis. So zeigen Fliegen, die sowohl für den Treiber, als auch für den Reporter homozygot sind, ein fast doppelt so gutes S/R wie solche, die beide Transgene lediglich heterozygot beinhalten. Dies ist theoretisch auch zu erwarten, da in für beide Konstrukte homozygoten Tieren eine vierfach höhere Expression erfolgen sollte und das Fluoreszenzsignal linear, das Quantenrauschen aber nur proportional zur Wurzel aus der Zahl der emittierten Quanten steigt. Die neue Version des Yellow Cameleon 2.1, das Yellow Cameleon 6.1 zeigt ein um 30% besseres S/R-Verhältnis als sein Vorgänger bei gleicher Expressionsstärke (siehe Abb. 4.2 – Western Blot) Diese Aussage ist jedoch statistisch nicht abgesichert. Wohl aus schon oben angeführten Gründen zeigt der Sensor G-CaMP 1.6 bei der Stimulation durch einen Duft in einem lebenden Tier das schlechteste Verhältnis zwischen Signal und Rauschen. Überraschend schien zunächst, dass der Sensor TNXL auf die Untersuchung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen einen ähnlichen Wert wie der Sensor G-CaMP1.6 erzielte (Abb. 4.11), ein Ergebnis das nach dem Prinzip der Ratiometrie nicht zu erwarten gewesen wäre, aber Sinn macht,

wenn man sich die Signalverlaufskurven auf die verschiedenen Salze hin noch einmal vor Augen hält. So erzielt dieser Sensor zwar sehr hohe Signale, jedoch bleibt die Fluoreszenz des CFP nach Erreichen des Minimums relativ gleich, so dass es sich nicht mehr um eine wirklich gegenläufige Bewegung der Fluoreszenzänderungen handelt, und somit der Effekt der Ratiometrie zur Verbesserung des Signals gegenüber bewegungs-korrelierten Fluoreszenzänderungen zu minimieren scheint. Was das Verhältnis von Signal zu Rauschen angeht kann also gesagt werden, dass die Sensoren der Cameloerienreihe den anderen Calciumsensoren überlegen sind.

Die Wahl des jeweiligen Sensors sollte je nach Versuchsaufbau individuell getroffen werden. So sind zwar die starken Signale der GFP basierten Sensoren wünschenswert, aber bei Messungen in einem lebenden Organismus, bei dem mit Bewegung der unterschiedlichen Strukturen gerechnet werden muss, sollte man sehr gut abwägen, wie groß die Calciumsignale im Vergleich zu den durch die Bewegungen entstehenden Fluoreszenzänderungen sein werden. Die in den Arbeiten von Wang (2002) mit G-CaMP 1.3 durchgeführten Messungen scheinen diesen Ergebnissen zu widersprechen, da hier auch in lebenden Tieren duftvezierte Signale detektiert wurden, jedoch gilt hierbei zu beachten, dass die gemessenen Signale einem in Agarose eingebetteten Gehirn entstammten. Pumpbewegungen der Hämolymphe, oder Bewegungen des Ösophagus, die das ganze Gehirn verlagern, fielen bei diesen Messungen nicht an. Die von Fiala et al. (2003) entwickelte Präparation, bei der nur ein kleines Loch in die Kopfkapsel der Fliege geschnitten und durch dieses das Imaging durchgeführt wird, machen das Präparat natürlich sehr anfällig für Bewegungen jeglicher Art, besonders, wenn man eben das Ziel verfolgt, Verhalten und funktionelles Imaging zu kombinieren und die neuronale Aktivität in sich bewegenden Tieren misst. Ein solches Ziel wäre mit einer Präparation wie der von Wang et al. (2002) nicht realisierbar. Die hier getesteten Sensoren stellen nur einen Teil der entwickelten Sensoren dar. Jedoch macht die Zahl immer neuer Entwicklungen und Verbesserungen von Sensoren es kaum möglich, alle auf dem Markt erhältlichen Sensoren zu verwenden.

Im weiteren Teil der Arbeit wurde mit dem Sensor Yellow Cameleon 2.1 gearbeitet. Dieser Sensor zeigte bei etwa gleichem Expressionslevel eine nur etwa 60% höhere

Fluoreszenzintensität als sein Nachfolger Yellow Cameleon 6.1. Yellow Cameleon 2.1 zeigt ein nur wenig niedrigeres Calciumsignal als sein Nachfolgemodell. Sein Signal ist im Verhältnis zum Rauschen tendenziell etwas schlechter und die Signale sind im Anstieg auf das Maximum etwas langsamer. Diese Nachteile werden jedoch dadurch kompensiert, dass die Handhabung der Fliegen sehr viel einfacher ist, da mit nur einer Kopie auf dem zweiten Chromosom das gleiche Expressionslevel erreicht werden konnte, wie bei YC6.1 Fliegen mit den zwei Kopien, einer auf dem zweiten und einer auf dem dritten Chromosom. Die nachstehenden Experimente machten eine möglichst einfache Genetik erforderlich, da zunächst Fliegen generiert werden mussten, die Yellow Cameleon 2.1 stabil in den dopaminergen Neuronen exprimieren, um diese dann mit Fliegen kreuzen zu können, die das DsRED unter der Kontrolle von Mb247 exprimieren. Hierfür wurden Fliegen mit der Sequenz für UAS-Cam2.1 auf dem zweiten Chromosom mit solchen, die die Gal4 Treiber Sequenz auf dem dritten Chromosom inseriert hatten, kombiniert. Aus den genannten Gründen wurden die weiteren Experimente nicht mit dem Sensor Yellow Cameleon 6.1 durchgeführt. Der Sensor G-CamP 1.6 war wegen seiner extremen Anfälligkeit auf Bewegungen eher unbrauchbar, da es bei der Applikation eines Elektroschocks mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zu starken Bewegungen kommt, was die Auswertung der erhobenen Daten sehr stark beeinträchtigen würde.

## **5.2 Untersuchung der prädiktiven Eigenschaften des dopaminergen Systems mittels *in vivo* Calcium imaging**

Die durch die Treiberlinie TH-Gal4 verursachten Expressionsmuster stimmten im Wesentlichen mit der Verteilung von dopaminergen Neuronen überein, wie sie auch von Monastrioti (1999) beschrieben wurde. Vergleiche zwischen der mit der Gal4-Linie getriebenen Expression von Yellow Cameleon 2.1 und Antikörperfärbungen gegen Dopamin selbst ergaben ebenfalls eine hohe Übereinstimmung zwischen den Expressionsmustern. Es fiel auf, dass nicht alle von dem Antikörper gegen Dopamin erkannten Zellen auch Yellow Cameleon 2.1 exprimierten, dagegen konnte in den untersuchten Zellclustern der umgekehrte Fall nicht beobachtet werden. Jedoch stellten die Penetrationseigenschaften des verwendeten Antikörpers ein großes



Problem dar, welches nur bedingt Aussagen über die Expression von Dopamin in tieferen Gehirnregionen zulässt.

In ersten Vorversuchen wurde den Tieren über ein Gitter ein Elektroschock appliziert und die Antwort der dopaminergen Zellen direkt in deren Somata gemessen. In den für die Untersuchung verwendeten Zellclustern konnten hierbei auch zuverlässig Aktivitäten der Neurone auf den Schock hin gemessen werden. Das Problem, das sich hierbei jedoch stellt, ist die Komplexität des dopaminergen Systems von *Drosophila*. In der Präparation des lebenden Tieres war es nicht möglich, einzelne dopaminerge Zellen zu identifizieren und deren Projektionen zu ihren Zielgeweben hin zu verfolgen. Von besonderem Interesse waren die Neurone, die zu den Pilzkörperloben hin projizieren, da hier das olfaktorische Gedächtnis vermutet wird (Heisenberg, 2005). Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die Tiere nicht nur mit einem Elektroschock konfrontiert werden, sondern es sollte auch untersucht werden, inwieweit sich die durch den Duft evozierten Calciumsignale der dopaminergen Zellen bei Paarung des Duftreizes mit einem Elektroschock verändern. Hierfür wurde eine Fliegenlinie generiert, die das rot fluoreszierende DsRED in den Pilzkörperloben exprimiert. Diese Fliegen wurden mit solchen Fliegen gekreuzt, die Yellow Cameleon 2.1 stabil in den dopaminergen Neuronen exprimierten. So konnten in Lebendpräparationen genau die dopaminergen Projektionen ausgemacht werden, die den Pilzkörper als Zielregion hatten. Auch in diesen Projektionen konnten Signale auf die Elektroschockstimulation detektiert werden. Um sicher zu stellen, dass es sich hierbei nicht um eine allgemeine Depolarisation des Gehirns auf den Elektroschock hin handelt, wurden die gleichen Versuche auch mit Neuronen des olfaktorischen Signalweges durchgeführt. Hierbei konnten in den Projektionsneuronen keinerlei Aktivitäten auf die Elektroschockstimulation hin detektiert werden. Auf die Duftstimulationen hingegen antworteten diese Neuronen zuverlässig mit deutlichen Calciumsignalen. Dies scheint zunächst Ergebnissen der Arbeit von Yu et al. (2004) zu widersprechen, die auf Applikation von Elektroschocks im Antennallobus reproduzierbar Aktivitäten in Glomeruli messen konnten und darüber hinaus noch eine Rekrutierung eines zusätzlichen Glomerulus beobachten konnten, wenn sie den Schock mit einem Duft paarten. Diese Rekrutierung war jedoch transient und nur für kurze Zeit nach dem Training detektierbar. Die Unterschiede zwischen unseren Experimenten und der zitierten Arbeit können zum

einen durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau erklärt werden, da bei den von Yu et al. (2004) durchgeführten Experimenten eine Elektrode direkt in das Abdomen des Tieres invasiert wurde, während in den Versuchen dieser Arbeit die Elektroschocks, wie bei dem Standardlernparadigma, über ein Gitter appliziert wurden. Zum anderen fokussierten Yu et al. auf die Antennalloben, während bei der hier erhobenen Kontrolle auf die terminalen Arborisationen im Calyx fokussiert wurde. Eine dritte alternative Erklärungsmöglichkeit für die beobachteten Unterschiede zwischen den zwei Versuchsansätzen könnte auch in der Verwendung unterschiedlicher Sensorproteine liegen. So verwendeten Yu et al. (2004) den nicht ratiometrischen Sensor SynaptopHluorin, der auf die pH-Änderung an der Synapse reagiert, während in dieser Arbeit der ratiometrische Calciumsensor Yellow Cameleon 2.1 verwendet wurde.

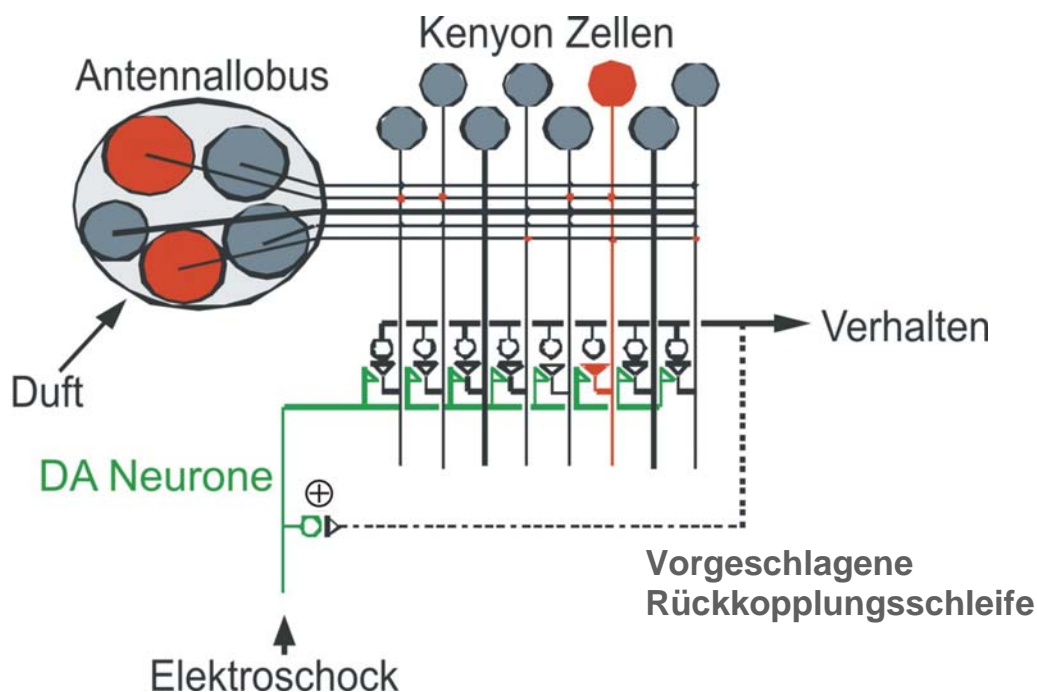
Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass auch die dopaminergen Neuronen auf die Düfte eine schwache, jedoch signifikante Aktivierung zeigen. Um nun die prädiktiven Eigenschaften der dopaminergen Neurone untersuchen zu können, wurden die Tiere präpariert und unter dem Mikroskop trainiert. Zur Kontrolle, ob die Tiere die Präparation soweit überstanden hatten, um noch sinnvoll einer Messung unterzogen werden zu können, wurde den Tieren zunächst ein Elektroschock gegeben. Danach wurde den Tieren der zu konditionierende Duft und der Kontrollduft präsentiert und die Aktivitäten der dopaminergen Neurone darauf hin gemessen. Im Anschluss daran wurden die Fliegen einem Training unterzogen, das aus mehreren Durchläufen bestand, da dies ein effektiveres Lernen zu induzieren vermag, als durch lediglich einmaliges Training (Beck et al, 2000). Zum Schluss wurde den Tieren der konditionierte Duft und der Kontrollduft präsentiert. Wie bereits erwähnt, konnte schon auf die naiven Düfte hin eine Aktivierung der dopaminergen Neurone festgestellt werden. Auch nach dem Training wurden die Neurone sowohl von dem konditionierten Duft wie auch von dem Kontrollduft in ihrer Amplitude gleichermaßen aktiviert. Das heißt, es kam nach dem Training zunächst zu keiner Veränderung der Aktivitätsstärke während der Duftstimulation. Es konnte jedoch eine signifikante Verlängerung der Aktivität auf den konditionierten Duft hin festgestellt werden, die ungefähr der Dauer des auf den Duft folgenden Elektroschocks entsprach. Auf den Kontrollduft hingegen verhielten sich die dopaminergen Neurone

nach dem Training in etwa gleich wie zuvor. Dies deutet darauf hin, dass es sich hier um einen konditionierungsspezifischen Effekt handelt.

Die meisten Daten vorangegangener Arbeiten deuten darauf hin, dass die olfaktorische Konditionierung auf einer Detektion von Koinzidenzen von CS und US in präsynaptischen Endigungen der Kenyonzellen beruht. Dadurch werden postsynaptische pilzkörperextrinsische Neuronen verstärkt aktiviert, was wiederum das Verhalten des Tieres beeinflussen kann (Heisenberg, 2003; Gerber et al., 2004). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten deuten jedoch auf eine Erweiterung dieses Modells hin, und zwar auf eine anatomisch noch nicht festgelegte Rückkopplungsschleife, die von diesen zu den Pilzkörpern extrinsischen Neuronen wieder auf die dopaminergen Neurone zurückführt (Abb. 5.1). Daraus würde sich die Konsequenz ergeben, dass ein bisher irrelevanter Duft durch die Paarung von CS und US und der in der Fliege erfolgenden Assoziation zwischen diesen beiden Stimuli eine verlängerte Aktivierung der dopaminergen Neurone zur Folge hätte, was wiederum eine aversive Verstärkung vermitteln könnte. Auf diese Weise wäre eine sogenannte „second order“ Assoziation realisierbar, bei der ein konditionierter Reiz selbst wieder als US verwendet werden kann.

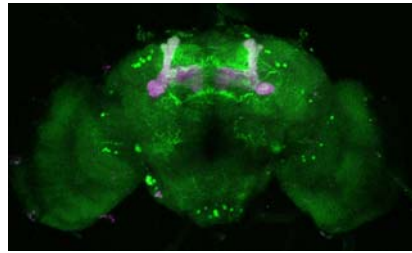
Natürlich kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass andere Gehirnregionen, die ebenfalls von dopaminergen Neuronen innerviert werden, ähnlich prädiktive Eigenschaften an den Tag legen. Auf jeden Fall scheint die vorhersagende Eigenschaft der dopaminergen Projektionen im Pilzkörperbereich nicht primär zur Bildung eines aversiven olfaktorischen Gedächtnisses notwendig zu sein, da Ausgangsneurone nicht für die Bildung eines solchen Gedächtnisses benötigt werden (Dubnau et al., 2001; McGuire et al., 2001; Schwärzel et al., 2002). Interessanterweise ähneln die hier gefundenen prädiktiven Eigenschaften der dopaminergen Neurone in *Drosophila* einem Phänomen, das auch schon in dopaminergen Neuronen von Vertebraten beschrieben wurde (Schultz, 2002; Schultz et al., 1997; Schulz & Dickinson, 2000). Hierbei vermitteln die dopaminergen Neurone der Vertebraten belohnende Stimuli, während bei *Drosophila* appetitives Lernen sehr gut auch ohne dopaminerge Neurone funktioniert, wie Schwärzel et al. (2003) in ihrer Arbeit zeigen konnten. Bei *Drosophila* (Schwärzel et al., 2003) und Bienen (Hammer & Menzel, 1998; Hammer, 1999; Menzel et al., 1999) wird

offensichtlich die Rolle des positiven *Reinforcers* von dem Amin Octopamin übernommen. So konnten in Bienen Neurone, welche den Stimulus des US während einer Konditionierung vermitteln, direkt als octopaminerg identifiziert werden (Hammer, 1999). Ob hingegen bei *Drosophila* Dopamin wirklich für die Verarbeitung ausschließlich aversiver Stimuli zuständig ist, oder ob diese Neurone im allgemeinen auf konditionierende Reize antworten, bleibt offen. Allerdings sind sie offenbar für die Assoziation des Duftes mit dem appetitiven Reiz Zucker nicht notwendig (Schwärzel et al., 2003). Es wäre auch zu überlegen, ob Dopamin in erster Linie lediglich den allgemeinen Zustand der Aufmerksamkeit des Tieres heraufsetzt. Ein zweiter Unterschied zwischen den hier erhobenen Daten bei *Drosophila* und den Befunden bei Vertebraten ist die Tatsache, dass bei Vertebraten die Antwort auf den belohnenden Stimulus im Laufe des Trainings immer geringer ausfällt, beziehungsweise näher an den vorhersagenden Stimulus heranrückt (Schultz, 2002; Schultz et al., 1997; Schultz & Dickinson, 2000).



**Abb. 5.1) Model der neuronalen Verschaltung zur Fähigkeit dopaminergischer Neurone, eine bevorstehende Bestrafung vorherzusagen:** Ein Duft wird über die Antennen wahrgenommen und über die Rezeptorneurone zu den Antennalloben geleitet, wo der Duft als glomeruläres Aktivitätsmuster abgebildet wird (rote Glomeruli). Diese Information wird an die Pilzkörper Calyces weitergegeben, in denen mehrere Verbindungen mit Kenyonzellen, den intrinsischen Pilzkörperzellen, eingegangen werden. Der kombinatorische Code der Antennalloben und der terminalen Projektionen in den Calyces wird in einen „ausgedünnten“ Code umgewandelt, so dass nur ein geringer Teil der vielen Kenyonzellen aktiviert wird. Die zeitgleiche Aktivierung der Kenyonzellen durch den Duft und die bestrafungskorrelierte Aktivierung der dopaminergen Neuronen, welche die Präsynapsen der Kenyonzellen innervieren, führt zu einer Verstärkung der Kenyonzellausgangssynapsen hin zu den Pilzkörperausgangssynapsen. Die prädiktiven Eigenschaften der dopaminergen Neuronen lassen hierzu noch eine exzitatorische Feedbackschleife vermuten, die Informationen von den Pilzkörperausgangssynapsen wieder zurück auf die dopaminergen Neuronen leitet.

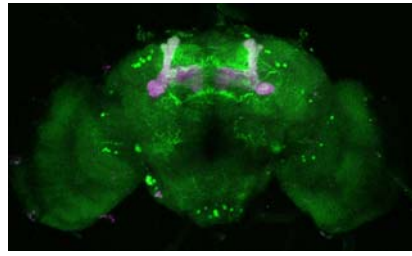
In *Drosophila* gibt es hierfür keinerlei Anhaltspunkte, da die detektierten Calciumsignale der ersten US – Präsentation und die des letzten Trainingsdurchlaufs in ihrer Amplitude nicht von einander zu unterscheiden sind. Dies könnte darauf schließen lassen, dass das *Reinforcement*-System von Invertebraten sehr viel einfacher aufgebaut ist als das der Vertebraten. Eine andere Erklärung dafür, dass ein solches Phänomen bei den hier durchgeführten Versuchen nicht beobachtet wurde, könnte darin begründet liegen, dass das Training an sich zu kurz, oder der US mit 120 V zu stark gewählt war. Ungeachtet dieser Unterschiede kann jedoch gesagt werden, dass die *Reinforcer*-Eigenschaften dopaminergener Neurone und ihre Fähigkeit, einen bevorstehenden US vorherzusagen, ein verbreitetes Prinzip komplexer Gehirne darstellt und es sich hierbei nicht ausschließlich um eine Eigenschaft des zentralen Nervensystems von Säugetieren handelt.



## 6. Zusammenfassung

Die Technik des optischen Imaging unter Verwendung DNA-codierter Sensoren ermöglicht es, Messungen neuraler Aktivitäten in genetisch definierten Populationen von Neuronen durchzuführen. In der Vielzahl der verschiedenen entwickelten Sensoren konnten die Calciumsensoren bisher das beste Verhältnis zwischen Signal und Rauschen und die beste zeitliche Auflösung aufzeigen. Hierbei handelt es sich in erster Linie um zwei Typen von Sensoren, zum einen ratiometrische Sensoren, deren Signal auf einem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) basiert, und zum anderen um zirkulär permutierte Sensoren, die auf einem modifizierten GFP-Molekül basieren, wobei das Signal auf einer veränderten Protonierung des Chromophors beruht. Beide Arten dieser Sensoren wurden schon erfolgreich zum Messen neuraler Aktivitäten in Nervensystemen verschiedener Tierarten verwendet. Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, zu untersuchen, welche Sensoren sich für die Messung an einem lebenden Organismus am besten eignen. Hierfür wurden die Eigenschaften von vier verschiedenen FRET basierten Sensoren und zwei der zyklisch permutierten Sensoren nach Expression im zentralen Nervensystem von *Drosophila* charakterisiert. Die Sensoren wurden in Neuronen zweiter und dritter Ordnung des olfaktorischen Signalwegs exprimiert und ihre Antworten auf physiologische Duftstimulation oder artifiziell induzierte Depolarisation des Gehirns untersucht. Während die calciumabhängigen Signale der zyklisch permutierten Sensoren in der Regel größer waren als die der FRET basierten Sensoren, zeichneten sich letztere durch ein besseres Signal zu Rausch-Verhältnis aus, wenn Bewegungen der fluoreszierenden Strukturen nicht zu vermeiden waren. Dies war auch der ausschlaggebende Grund für die Verwendung eines FRET basierten Sensors im anschließenden Teil der Arbeit.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Effekt untersucht, den die Paarung eines neutralen Stimulus mit einem bestrafenden Stimulus auf dopaminerge Neurone hat. Eine solche Paarung kann zu einer klassischen Konditionierung führen, einer einfachen Form des Lernens, in welcher das Tier einem ursprünglich neutralen Stimulus einen Wert zuordnet, und dadurch sein Verhalten dem Stimulus gegenüber ändert. Die olfaktorische klassische Konditionierung in *Drosophila* wird seit vielen Jahren intensiv untersucht, um die molekularen und neuronalen Grundlagen von Lernen und Gedächtnis zu charakterisieren. Dabei hat sich gezeigt, dass besonders die Pilzkörper von essentieller Bedeutung für die Ausbildung eines olfaktorischen Gedächtnisses sind. Während das olfaktorische System bei Insekten bereits detailliert analysiert wurde, ist über die Neurone, die den bestrafenden Stimulus vermitteln, nur sehr wenig bekannt. Unter Anwendung des funktionellen optischen Calcium Imaging konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden, dass die Projektionen von dopaminergen Neuronen im Bereich der Loben der Pilzkörper schwach auf die Präsentation eines Duftes, jedoch sehr stark auf eine Stimulation durch einen Elektroschock antworten. Nach mehrmaliger Paarung eines Duftes mit einem Elektroschock während eines Trainings, verlängert sich die Aktivität dieser dopaminergen Neurone auf den bestrafenden Duft hin im Test ohne Elektroschock drastisch, während die Antwort auf den Kontrollduft keine signifikanten Veränderungen aufweist. Während bei Säugetieren belohnende Reize bei appetitiven Lernvorgängen über dopaminerge Neurone vermittelt werden, spielen bei *Drosophila* diese Neurone offensichtlich eine Rolle bei der aversiven Konditionierung. Jedoch blieb, auch wenn sich die Rolle des Dopamins im Laufe der Evolution geändert zu haben scheint, die Fähigkeit dieses Neuronentyps, nicht nur auf einen eintreffenden verstärkenden Stimulus zu reagieren, sondern diesen auch vorherzusagen zu können, zwischen Säugern und *Drosophila* erhalten.



## 7. Summary

The technique of optical *in vivo* imaging using genetically encoded fluorescent sensors in transgenic animals has paved the way for real-time monitoring of spatio-temporal activity in the brain. Among the different fluorescent probes, the calcium sensors produce signals with the highest signal to noise ratio and the best temporal resolution. Basically these sensors can be split into two groups, those based on a FRET-effect between two modified green fluorescent proteins (GFPs) and those which make use of on a circular permutation of GFP. Both types have successfully been used for measuring neuronal activity in various species. One part of the present work was to test which of these different sensor types are best suited for an *in vivo* situation. For this, two members of the class of circularly permuted sensors and four members of the class of FRET based sensors were tested and compared in *Drosophila*. Each sensor was expressed in second and third order neurons of the olfactory pathway and the calcium activity evoked by artificial depolarisation or physiological odour stimuli was recorded. Whereas the Calcium dependent change in signal intensity is substantially higher for the circularly permuted sensors, the FRET based sensors tested in this work showed a better signal to noise ratio when movement of the brain structures under investigation could not be prevented. For this reason a FRET based sensor was chosen to measure the activity of dopaminergic neurons in a classical conditioning paradigm.

In the second part of this work the effect of pairing a neutral stimulus with a negative reinforcer (in this case an electric shock) on the activity of dopaminergic neurons was investigated. The pairing of these two stimuli can lead to classical conditioning, a simple form of learning in which the animal assigns a value (positive or negative) to the formerly neutral stimulus. Olfactory classical conditioning in *Drosophila melanogaster* is a prime model for the analysis of the molecular and neuronal



substrate of this type of learning and memory. In particular the mushroom bodies have been shown to be essential for olfactory memory formation. While the olfactory system of insects has been extensively characterized little is known about the neurons that mediate the reinforcing stimulus. Using the technique of optical calcium imaging it was possible to show that dopaminergic projections in the region of the mushroom body lobes responded weakly to odour presentations, but strongly to the stimulation by an electric shock. After pairing for several times one of two odours presented to the fly with an electric shock (training), the activity of the dopaminergic neurons to the punished odour is significantly prolonged in a test after the training. No change is observed after the training for the control odour that was not paired with the electric shock. Whereas in mammals rewarding stimuli are mediated by dopaminergic neurons, in *Drosophila* this catecholamine apparently plays a role in mediating aversive reinforcement. Even though the role of dopamine seems to have changed during evolution the capability of dopaminergic neurons to predict a reinforcing stimulus appears to be conserved between *Drosophila* and mammals.

## 8. Literaturverzeichnis:

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidenkiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, WoodageT, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM & Venter JC. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287 (5461): 2185-2195.

**Annau Z & Kamin LJ.** (1961). The Conditioned emotional response as a function of the intensity of the US. *Jour. Of Comp. & Phys. Psych.*, 54, 428-433.

**Armstrong JD, de Belle JS, Wang Z & Kaiser K.** (1998). Metamorphosis of the mushroom bodies; large-scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in *Drosophila*. *Learn Mem* 5: 102–114.

**Beck CDO, Schröder B & Davis RL.** (2000). Learning performance of normal and mutant *Drosophila* after repeated conditioning trials with discrete stimuli. *Jour. Neurosci.* 20, 2944-2953.

**Berridge, MJ.** (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*;Vol.21; 13-26.

**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.

**Bockaert J & Pin JR.** (1999). Molecular tinkering of G-Protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO Jour.* 18, 1723-1729.

**Brand AH & Perrimon N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.

**Budnik V & White K.** (1988). Catecholamine-containing neurons in *Drosophila melanogaster*. Distribution and development. *Jour. Comp. Neurol.* 268, 400-418.

**Civelli O, Bunzow J & Grandy D.** (1993). Molecular diversity of the dopamine receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33, 281-307.

**Clyne PJ, Warr CG & Carlson JR.** (2000). Candidate taste receptors in *Drosophila*. *Science* 287, 1830-1834.

**Crittenden JR, Skoulakis EM, Han KA, Kalderon D & Davis RL.** (1998). Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn. Mem.* 5 (1-2), 38-51.

**Cole K & Curtis H.** (1939). Electrical impedance of the squid giant axon during activity. *Jour. Gen. Physiol.* 22, 649-670.

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

**Davis RL, Cherry J, Dauwalder B, Han PL & Skoulakis E.** (1995). The cyclic AMP system and *Drosophila* learning. *Mol. Cell. Biochem.* 149-150, 271-278.

**Diegelmann S, Fiala A, Leibold C, Spall T & Buchner E.** (2002). Transgenic Flies expressing the fluorescent calcium sensor Cameleon 2.1 under UAS control. *Genesis* 34, 95-98.

**Dubnau J & Tully T.** (1998). Gene discovery in *Drosophila*: New insights for learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 407-444.

**Dubnau J, Grady L, Kitamoto T & Tully T.** (2001). Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroombody blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411, 476-480.

**Dudel J, Menzel R & Schmidt RF.** (1996). *Neurowissenschaften – Vom Molekül zur Kognition*, Springer

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

**Faber T, Joerges J & Menzel R.** (1999). Associative learning modifies neural representations of odours in the insect brain. *Nat. Neurosci.* 2, 74-78.

**Feng G, Hannan F, Reale V, Hon YY, Kousky CT, Evans PD & Hall LM.** (1996). Cloning and functional characterisation of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *Jour. Neurosci.* 16, 3925-3933.

**Fetcho JR & Bhatt DH.** (2004). Genes and photons: new avenues into the neuronal basis of behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:707-714.

**Fiala A, Spall T, Diegelmann S, Eisermann B, Sachse S, Devaud JM, Buchner E & Galizia CG.** (2002). Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Curr. Biol.* 12:1877-1884.

**Fiala, A. & Spall, T.** (2003). In vivo calcium imaging of brain activity in *Drosophila* by transgenic cameleon expression. *Sci. STKE* 174:PL6.

**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. *Jour. Neurobiol.* 54, 618-627.

**Gerber B, Tanimoto H & Heisenberg M.** (2004). An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 737-744.

**Goldstein M & Deutsch A.** (1992). Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. *FASEB Jour.* 6, 2413-2421.

**Gordon JW & Ruddle FH.** (1982). Germ line transmission in transgenic mice. *Prog. Clin. Biol. Res.* 85, 111-124.

**Gotzes F & Baumann A.** (1996). Functional properties of *Drosophila* dopamine D1-receptors are not altered by size of the n-terminus. *Bochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 121-126.

**Grice GR.** (1968). Stimulus intensity and response evocation. *Psych. Review*, 75: 359-373.

**Griesbeck O.** (2004). Fluorescent proteins as sensors for cellular functions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:636-641.

**Guerrero G & Isacoff EY.** (2001). Genetically encoded optical sensors of neuronal activity and cellular function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:601-607.

**Guo A, Simone DA, Stone LS, Fairbanks CA, Wang J & Elde R.** (2001). Developmental shift of vanilloid receptor 1(VR1) terminals into deeper regions of the superficial dorsal horn: correlation with a shift from TrkA to Ret expression by dorsal root ganglion neurons. *Eur. Jour. Neurosci.* 14, 293-304.

**Hammer M.** (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59–63.

**Hammer M.** (1997). The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci.* 20 (6): 245-52.

**Hammer M & Menzel R.** (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn. Mem.* 5(1-2): 146-156.

**Han KA, Millar NS, Grotewiel MS, Davis RL.** (1996). DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* 6:1127-35.

**Hasan MT, Friedrich RW, Euler T, Larkum ME, Giese G, Both M, Duebel J, Waters J, Bujard H, Griesbeck O, Tsien RY, Nagai T, Miyawaki A & Denk W.** (2004). Functional fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator proteins in transgenic mice under TET control. *PLOS Biol.* 2:e163.

**Hearn MG, RenY, McBride EW, Reveillaud I, Beinborn M & Kopin AS.** (2002). A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterisation and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14554-14559.

**Heim N, & Griesbeck O.** (2004). Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. *Jour. Biol. Chem.* 279:14280–14286.

**Heisenberg M, Wolf R & Brembs B.** (2001). Flexibility in a single behavioral variable of *Drosophila*. *Learn Mem.* 8(1):1-10.

**Heisenberg M.** (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (4): 266-275.

**Higashijima S, Masino MA, Mandel G & Fetcho JR.** (2003). Imaging neuronal activity during zebrafish behavior with a genetically encoded calcium indicator. *Jour. Neurophysiol* 90, 3986-3997.

**Hilliard MA, Apicella AJ, Kerr R, Suzuki H, Bazzicalupo P & Schafer WR.** (2005). In vivo imaging of *C. elegans* ASH neurons: cellular response and adaptation to chemical repellents. *EMBO Jour.* 24:63-72.

**Hornykiewicz O.** (1962). Dopamine and brainfunction. *Pharmacol. Rev.* 18, 925-964.

**Jaenisch R.** (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the erogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1260-1264

**Jefferis GS, Marin EC, Stocker RF & Luo L.** (2001). Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature* 414 (6860): 204-208.

**Ji G, Feldman ME, Deng KY, Greene KS, Wilson J, Lee JC, Johnston RC, Rishniw M, Tallini Y, Zhang J, Wier WG, Blaustein MP, Xin HB, Nakai J & Kotlikoff MI.** (2004).  $Ca^{2+}$ -sensing transgenic mice: postsynaptic signaling in smooth muscle. *Jour. Biol. Chem.* 279:21461-21468.

**Kandel ER, Schwartz JH & Jessel TM.** (2000). *Principles of Neuroscience* (Fourth Edition), *Raven Press, New York.*

**Kerr R, Lev-Ram V, Baird G, Vincent P, Tsien RY. & Schafer WR.** (2000). Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron* 26, 583-594.

**Kim YC, Lee HG, Seong CS, Han KA.** (2003). Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr. Patterns* 2, 237-45

**Knöpfel T, Diez Garcia J & Akeman W.** (2006). Optical probing of neuronal circuit dynamics: genetically encoded versus classical fluorescent sensors. *Trends in Neurosci.* 29, 3, 160-166.

**Kyhse-Andreson J.** (1984). Electroblothing of multiple gels. *Jour. Biochem. Biophysics Methods* 10, 203.

**Laissue PP, Reiter C, Hiesinger PR, Halter S, Fischbach KF & Stocker RF.** (1999). Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *Jour. Comp. Neurol.* 405, 543-552.

**Lieberman A.** (2004). Learning and memory. An integrative Approach. Thomson Learning Inc. .

**Liu L, Yermolaieva O, Johnson WA, Abboud FM & Welsh MJ.** (2003). Identification and function of thermosensory neurons in *Drosophila* larvae. *Nat Neurosci.* 6:267-273.

**Liy J, Mack JA, Souren M, Yaksi E, Higashijima S, Mione M, Fetcho JR & Friedrich RW.** (2005). Early development of functional spatial maps in the zebrafish olfactory bulb. *Jour. Neurosci.* 25 (24): 5784-5795.

**Luo L, Liao YJ, Jan LY & Jan YN.** (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPase: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes & Development* 8, 1787-1802.



**Mank M, Reiff DF, Heim N, Friedrich MW, Borst A & Griesbeck O.** (2006). A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys Jour.*; 90(5):1790-6.

**Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML & Lukyanov SA.** (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17, 969-973.

**Mauelshagen J.** (1993). Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *Jour. Neurophysiol.* 69(2),609-25.

**McGuire SE, Le PT & Davis RL.** (2001). The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* 293, 1330-1333.

**McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K & Davis RL.** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765-1768.

**Menzel R, Heyne A, Kinzel C, Gerber B & Fiala A.** (1999). Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behav. Neurosci.* 113, 744-754.

**Miesenböck G.** (2004). Genetic methods for illuminating the function of neural circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 395-402.

**Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R & Tsien RY.** (1999). Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5), 2135-40.

**Miyawaki A.** (2003). Fluorescence imaging of physiological activity in complex systems using GFP-based probes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 591-596.

**Monastriotti M.** (1999). Biogenic Amine System in the Fruit Fly *Drosophila Melanogaster*. *Microscopy Research and Technique.* 45, 106-121.

**Morise H, Shimomura O, Johnson FH & Winant J.** (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*. 13(12), 2656-62.

**Müller U.** (2000). Prolonged activation of camp-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* 27, 159-168.

**Muri R & Knöpfel T.** (1994). Activity induced elevations of intracellular calcium concentration in neurons of the deep cerebellar nuclei. *Jour. Neurophysiol.* 71(1), 420-8.

**Mustard JA, Beggs KT & Mercer AR.** (2005). Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Arch. Ins. Biochem. & Physiol.* 59, 103-117.

**Nakai J, Ohkura M & Imoto K.** (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 19, 137-141.

**Ohkura M, Matsuzaki M, Kasai H, Imoto K, & Nakai J.** (2005). Genetically encoded bright Ca<sup>2+</sup> probe applicable for dynamic Ca<sup>2+</sup> imaging of dendritic spines. *Anal. Chem.* 77(18), 5861-9.

**Pavlov IP.** (1927). *Conditioned Reflexes.* (trans. Anrep GV). Oxford: Oxford Univeristy Press.

**Pinsker H, Kandel ER, Castelluci V & Kupfermann I.** (1970): An analysis of habituation and dishabituation in *Aplysia*. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 2, 351-373

**Pologruto TA, Yasuda R & Svoboda K.** (2004). Monitoring neural activity and [Ca<sup>2+</sup>] with genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *Jour. Neurosci.* 24(43), 9572-9.

**Quinn WG, Harris WA & Benzer S.** (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 71(3), 708-12.

**Reiff DF, Thiel PR & Schuster CM.** (2002). Differential regulation of active zone density during long-term strengthening of *Drosophila* neuromuscular junctions. *Jour. Neurosci.* 22(21), 9399-409.

**Reiff DF, Ihring A, Guerrero G, Isacoff EY, Joesch M & Borst A.** (2005). In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies. *J. Neurosc.* 25(19), 4766-78.

**Rescorla RA & Wagner AR.** (1972). A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In A. H. Black & W.F. Prokasy (Eds.), *Classical conditioning II: Current research and theory*. New York: Appleton-Century-Crofts.

**Riemensperger T, Völler T, Stock P, Buchner E & Fiala A.** (2005). Punishment Prediction by Dopaminergic Neurons in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 1953-1960.

**Rudolf R, Mongillo M, Rizzuto R & Pozzan T.**(2003). Looking forward to seeing calcium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4(7);579-86.

**Salzberg BM, Davila HV & Cohen LB.** (1973). Optical recording of impulses in individual neurones of an invertebrate central nervous system. *Nature.* 28; 246 (5434), 508-9.

**Sawaguchi T & Goldman-Rakic P.** (1994). The role of D1-Receptors in working memory: Local injections of dopamine antagonists into the prefrontal cortex of Rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. *Jour. Neurophysiol.* 71, 515-528.

**Schultz W.** (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36, 241-263.

**Schultz W & Dickinson A.** (2000). Neuronal coding of prediction errors. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 473-500.

**Schwab S.** (2004). Charakterisierung genetisch kodierter Calcium sensitiver Fluoreszenz Sensoren zur Detektion neuronaler Aktivität in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit.

**Schwärzel M, Heisenberg M & Zars T.** (2002). Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* 35, 951-960.

**Schwärzel 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, Guan H & Van Tol H.** (1993). Dopamine D4 receptors evaluated in schizophrenia. *Nature* 365, 441-445.

**Shimomura O & Johnson FH.** (1978). Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 75(6), 2611-5.

**Shyn SI, Kerr R & Schafer WR.** (2003). Serotonin and GABA modulate functional states of neurons and muscles controlling *C. elegans* egg-laying behavior. *Curr. Biol.* 13, 1910-1905.

**Spall T.** (2004). Optische Visualisierung neuronaler Aktivität: Etablierung des *in vivo* Imaging mit dem genetisch codierten Sensor Yellow Cameleon 2.1 und Untersuchung der olfaktorischen Codierung im Gehirn von *Drosophila melanogaster*. Dissertationsschrift, Fakultät: Biologie, Bayerische Julius Maximilians Universität zu Würzburg.

**Stables J, Mattheakis LC, Chang R & Rees S.** (2000). Recombinant aequorin as reporter of changes in intracellular calcium in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 327, 456-71.

**Stallcup WB.** (1979). Sodium and Calcium fluxes in clonal nerve cell line. *Jour. Physiol.* 286, 525-540.

**Sugamori KS, Demchyshyn LL, Mc Conkey F, Forte MA & Niznik HB.** (1995). A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase linked receptor from *Drosophila melanogaster* displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS Lett.* 362, 131-138.

**Stocker RF, Gendre N & Batterham P.** (1993). Analysis of the antennal phenotype in the *Drosophila* mutant *lozenge*. *Jour. Neurogenet.* 9 (1), 29-53.

**Suzuki H, Kerr R, Bianchi L, Frokjaer-Jensen C, Slone D, Xue J, Gerstbrein B, Driscoll M & Schafer WR.** (2003). In vivo imaging of *C. elegans* mechanosensory neurons demonstrates a specific role for the MEC-4 channel in the process of gentle touch sensation. *Neuron* 39, 1005-1017.

**Tempel BL, Bonini N, Dawson DR & Quinn WG.** (1983). Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 80(5), 1482-6.

**Thorndike EL.** (1911). Animal intelligence: an experimental study of the associative process in animals. *Psych. Rev. Monograph Supplement*, 2(8).

**Testa TJ.** (1975). Effects of similarity of location and temporal intensity pattern of conditioned and unconditioned stimuli on the acquisition of conditioned suppression in rats. *Jour. Of Exp. Psych: Animal Behavior Processes* 1, 114-121.

**Truong K, Sawano A, Mizuno H, Hama H, Tong KI, Mal TK, Miyawaki A & Ikura M.** (2001). FRET-based in vivo Ca<sup>2+</sup> imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat. Struct. Biol.* Dec;8(12), 1069-73.

**Tsien RY.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-44.

**Tully T & Quinn WG.** (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *Jour. Comp. Physiol. [A].* 157 (2), 263-277.

**Völler T.** (2005). Neuronale Grundlagen von Bestrafungslernen: Optical Imaging neuronaler Aktivität dopaminerger Neurone im Gehirn von *Drosophila melanogaster* und ihre Rolle bei assoziativer Plastizität. Diplomarbeit.

**Vosshall LB, Wong AM & Axel R.** (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*. 102(2), 147-59.

**Waddell S & Quinn WG.** (2001). What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends Genet.*, 12, 719-26.

**Wang JW, Wong AM, Flores J, Vosshall LB & Axel R.** (2003). Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell* 112, 271-282.

**Wang Y, Guo HF, Pologruto TA, Hannan F, Hakker I, Svoboda K & Zhong Y.** (2004). Stereotyped odor-evoked activity in the mushroom body of *Drosophila* revealed by green fluorescent protein-based Ca<sup>2+</sup> imaging. *Jour. Neurosci.* 24, 6507-6514.

**Young P & Feng G.** (2004). Labeling neurons in vivo for morphological and functional studies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 642-646.

**Yu D, Baird GS, Tsien RY & Davis RL.** (2003). Detection of calcium transients in *Drosophila* mushroom body neurons with camgaroo reporters. *Jour. Neurosci.* 23, 64-72.

**Yu D, Ponomarev A & Davis RL.** (2004). Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning; memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron* 42 (3), 437-449.

**Zaccolo M & Pozzan T.** (2000). Imaging signal transduction in living cells with GFP-based probes. *IUBMB Life* 49, 375-379.

**Zars T, Fischer M, Schulz R & Heisenberg M.** (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288, 672-675.

**Zemelman B & Miesenbock G.** (2001). Genetic schemes and schemata in neurophysiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 409-414.

**Zecevic D, Wu JY, Cohen LB, London JA, Hopp HP & Falk CX.** (1989). Hundreds of neurons in the Aplysia abdominal ganglion are active during the gill-withdrawal reflex. *Jour. Neurosci.* Oct;9(10), 3681-9.

## 9. Abkürzungen

$\alpha$	–	anti
$\mu$	–	mikro
$^{\circ}\text{C}$	–	Grad <b>C</b> elsius
<b>Abb.</b>	–	<b>Ab</b> bildung
<b>BEA</b>	–	<b>B</b> enzaldehyd
<b>bzw.</b>	–	<b>b</b> eziehungsweise
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	–	<b>C</b> alcium–ion
<b>Cam2.1</b>	–	<b>Y</b> ellow <b>C</b> ameleon <b>2.1</b>
<b>cAMP</b>	–	zyklisches Adeninmonophosphat
<b>CCD</b>	–	<b>C</b> harge <b>C</b> oupled <b>D</b> evice
<b>cGMP</b>	–	zyklisches Guaninmonophosphat
<b>CLSM</b>	–	<b>C</b> onfokale <b>L</b> aser <b>S</b> canning <b>M</b> icroskopy
<b>cm</b>	–	Zentimeter
<b>CO<sub>2</sub></b>	–	Kohlendioxid
<b>CR</b>	–	<b>c</b> onditioned <b>r</b> esponse
<b>CRE</b>	–	<b>c</b> AMP <b>R</b> esponse <b>E</b> lement
<b>CREB</b>	–	<b>c</b> AMP <b>R</b> esponse <b>E</b> lement <b>B</b> inding <b>P</b> rotein
<b>CRET</b>	–	<b>C</b> hemolumineszenz- <b>R</b> esonanz- <b>E</b> nergie- <b>T</b> ransfer
<b>CS</b>	–	<b>C</b> onditioned <b>S</b> timulus
<b>ECFP</b>	–	<b>E</b> nhanced <b>Y</b> ellow <b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein
<b>ETA</b>	–	<b>E</b> thylacetat
<b>et al.</b>	–	<b>e</b> t <b>a</b> ltri
<b>EYFP</b>	–	<b>E</b> nhanced <b>Y</b> ellow <b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein
<b>FRET</b>	–	<b>F</b> luoreszenz <b>R</b> esonanz <b>E</b> nergie <b>T</b> ransfer
<b>g</b>	–	<b>G</b> ramm
<b>Gal4</b>	–	<b>G</b> alactosidase4
<b>GFP</b>	–	<b>G</b> reen <b>F</b> loureszenz <b>P</b> rotein
<b>h</b>	–	Stunden
<b>H<sub>2</sub>O</b>	–	Wasser



<b>5-HT</b>	–	<b>5-Hydroxytryptophan</b>
<b>Hz</b>	–	<b>Hertz</b>
<b>IAA</b>	–	<b>Isoamylacetat</b>
<b>iACT</b>	–	<b>innerer antennocerebraler Trakt</b>
<b>LPL</b>	–	<b>Laterales Protocerebraler Lobus</b>
<b>LTD</b>	–	<b>Long Term Depression</b>
<b>LTM</b>	–	<b>Long Term Memory</b>
<b>LTP</b>	–	<b>Long Term Potentiation</b>
<b>M</b>	–	<b>Molar</b>
<b>M13</b>	–	Sequenz der Myosin Light Chain Kinase
<b>MCH</b>	–	<b>Methylcyclohexanol</b>
<b>ml</b>	–	<b>Milliliter</b>
<b>nm</b>	–	<b>Nanometer</b>
<b>OA</b>	–	<b>Octopamin</b>
<b>OCT</b>	–	<b>Octanol</b>
<b>ORN</b>	–	<b>Olfaktorisches Rezeptorneuron</b>
<b>p</b>	–	Wahrscheinlichkeit
<b>PKA</b>	–	<b>Proteinkinase A</b>
<b>ROI</b>	–	<b>Region Of Interest</b>
<b>STM</b>	–	<b>Short Term Memory</b>
<b>STP</b>	–	<b>Short Term Potentiation</b>
<b>TnC</b>	–	<b>Troponin C</b>
<b>UAS</b>	–	<b>Upstream Activating Sequence</b>
<b>US</b>	–	<b>Unconditioned Stimulus</b>
<b>UV</b>	–	<b>Ultraviolet</b>
<b>V</b>	–	<b>Volt</b>
<b>YC6.1</b>	–	<b>Yellow Cameleon 6.1</b>

## 10. Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

### Publikationen:

**Wagner TU, Renn J, Riemensperger T, Volff JN, Koster RW, Goerlich R, Scharl M & Winkler C.** (2003). *The teleost fish medaka (*Oryzias latipes*) as genetic model to study gravity dependent bone homeostasis in vivo.* Adv Space Res.;32(8):1459-65.

- **Riemensperger T, Völler T, Stock P, Buchner E & Fiala A.** (2005). *Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*.* Curr. Biol; 15, 1953-1960.

**Spall T, Riemensperger T, Fiala A & Buchner E.** *Representation of odour identity and intensity in terminal arborisations of olfactory projection neurons of the *Drosophila* brain.* In revision for resubmission to Eur. Jour. Neurosci. .

- **Riemensperger T, Schwab S, Ruppert N, Buchner E, Nakai J, Ohkura M & Fiala A.** *In vivo optical imaging of central brain activity in *Drosophila*: a comparison of circularly permuted versus FRET-based fluorescent calcium sensors.* In revision for resubmission to Jour. Neurosci. Methods.

**Schroll C, Riemensperger T, Ehmer J, Völler T, Erbguth K, Hendel T, Gerber B, Nagel G, Buchner E & Fiala A.** *Light-induced activation of distinct modulatory neurons substitutes for appetitive or aversive reinforcing stimuli during associative learning in larval *Drosophila*.* Submitted to Curr. Biol. .

(Publikation, die aus dieser Arbeit hervorgingen, sind durch ein • gekennzeichnet)

### Konferenzen:

**Fiala A, Spall T, Diegelmann, S, Riemensperger T, Galizia CG & Buchner E.** (2001). *Neuronal calcium imaging in the *Drosophila* brain.* 5<sup>th</sup> Schloessmann Seminar on optical methods in Biology, Schloss Elmau, Germany, December 16-19, 2001. Poster.

**Fiala A, Spall T, Diegelmann S, Riemensperger T, Sachse S, Eisermann B, Devaud JM, Galizia CG & Buchner E.** (2003). *Optical imaging of odorant representation in the *Drosophila* brain using cameleon.* 29<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen, Germany, June 12-15, 2003. Poster.

**Riemensperger T, Buchner E & Fiala A.** (2004). *Optical calcium imaging of activity in dopaminergic neurons of Drosophila in vivo.* 10<sup>th</sup> European Symposium on Drosophila Neurobiology, Cité Universitaire, Neuchatel, Switzerland, September 4-8, 2004. Poster.

**Fiala A, Spall T, Riemensperger T & Buchner E.** (2004). *Optical imaging of odour evoked activity in higher brain centres of Drosophila.* 10<sup>th</sup> European Symposium on Drosophila Neurobiology, Cité Universitaire, Neuchatel, Switzerland, September 4-8, 2004. Talk (Speaker: Fiala A).

**Riemensperger T, Buchner E & Fiala A.** (2005). *Neuronal activity of dopaminergic cells in the Drosophila brain analyzed by optical calcium imaging.* 30<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen, Germany, February 17-20, 2005. Poster.

**Fiala A, Riemensperger T, Stock P, Völler T & Buchner E.** (2005) *In vivo visualization of odor and reinforcer representation in the Drosophila brain: an imaging approach to olfactory memory traces.* Meeting on imaging neurons & neural activity: new methods, new results, Cold Spring Harbor, New York, USA, March 10-13, 2005. Poster.

**Fiala A, Riemensperger T, Völler T, Stock P & Buchner E.** (2005). *Visualization of odour and reinforcer representation in the Drosophila brain: an imaging approach to olfactory memory traces.* 9<sup>th</sup> European Symposium for insect taste and olfaction (ESITO), Villasimius, Italy, September 24-30. Talk (Speaker: Fiala A).

## 11. Curriculum Vitae:



**Name:** Thomas Dieter Riemensperger  
**Residence:** Friedrichstraße 18,  
97082 Würzburg,  
Germany  
**Date of Birth:** 01/22/1977  
**Place of Birth:** 97941 Tauberbischofsheim, Germany  
**Parents:** Rainer Riemensperger (09/18/1943), teacher  
Ingeborg Riemensperger née Hoppe (5/25/1948), window dresser  
**Brother:** Michael Riemensperger (04/06/1974), teacher  
**Nationality:** German  
**Family Status:** unmarried  
**Languages:** German native, English fluent, Spanish fluent, Italian fluent, French understanding fair  
**Hobbies:** reading, playing guitar, diving, painting and writing

### School Education:

September 1983 – July 1987:

Primary School in Werbach-Wenkheim

September 1987 – July 1996:

Matthias-Grünewald-Gymnasium in Tauberbischofsheim

**Grade:** high-school

### University Career:

November 1996 – July 1998:

**Julius-Maximilians Universität, Würzburg, Germany**

Course of studies: biology and chemistry for teaching profession

October 1998 – July 1999:

**Universita di Catania, Italy**

European Erasmus exchange programme for biology:

Studies of marine biology & practical courses in marine biology, e.g. photoidentification of marine mammals

Diving license: CMAS/ ANIS \* Diver

November 1999 – April 2001:

**Julius-Maximilians Universität, Würzburg, Germany**

Change of career to biology as diploma studies

September 2000: intermediate examination

May – June 2001: **Universidad Autonoma de Madrid, Spain**

Practical course in genetics at the laboratory of Prof. Immaculada Canal

July 2001 – June 2003:

**Julius-Maximilians Universität, Würzburg, Germany**

May – June 2002:

Diploma exams in:   Animal Ecology & Tropical Biology  
                                  Genetics & Neurobiology  
                                  Physiological Chemistry

August 2002 – May 2003:

Diploma thesis in Genetics and Neurobiology in the laboratory of Dr. Erich Buchner under the supervision of Dr. André Fiala

Title:

*“Construction of transgenic flies expressing fluorescence sensors to elucidate neuronal activity”*

July – September 2003:

**Tata-Institute for Fundamental Research of Mumbai, India**

Practical course: “Two-Photon-Microscopy” in the laboratory of Prof. Veronica Rodrigues, under supervision Dr. Sudipta Maiti.

Since October 2003:

**Julius-Maximilians Universität, Würzburg, Germany**

Ph.D. thesis in Genetics and Neurobiology in the laboratory of Dr. Erich Buchner under the supervision of Dr. André Fiala

Title:

*“Analysis of predictive features of the dopaminergic system of Drosophila melanogaster using genetically encoded calcium sensors.”*

April 2005:

**HYDRA Institute for Marine Science, Isla d’Elba, Italy**

Practical course: “Introduction to Marine Biology” by Dipl. Biol. Christian Lott

# *Let's be realistic – try the impossible*

*Che Guevara*

***Danke, dass Ihr geholfen habt, wahr zu machen, was mir unmöglich zu sein schien!***

*Meinen Dank möchte ich zu aller erst meinem Doktorvater Professor Erich Buchner aussprechen, für das Thema dieser Arbeit, die interessanten Diskussionen, die Möglichkeit meine Ideen frei umsetzen zu können und dafür, dass die Tür immer für mich offen stand und ihm nicht nur die wissenschaftlichen Probleme wichtig waren.*

*Weiterhin möchte ich Professor Wolfgang Rössler für die Erstellung des Zweitgutachtens dieser Arbeit danken.*

*Ganz besonderer Dank gilt natürlich Doktor André Fiala, für die super Betreuung, die gemeinsamen Ausarbeitungen der Ideen zu dieser Arbeit, die echt gute Arbeitsatmosphäre an sich, sein fundiertes Wissen über alles was mit Gehirnen zu tun hat und für immerhin fast vier Jahre, die wir im DK40 gemeinsam durch dick und dünn gegangen sind, und, wenn es auch hin und wieder mal zu Turbulenzen kam, es echt tolle vier Jahre waren.*

*Natürlich möchte ich auch meinen Eltern und meinem Bruder danken, dass sie immer an mich geglaubt und mich immer unterstützt haben und immer für mich da waren, wenn ich manchmal gedacht habe es geht nicht mehr.*

*Ein dickes Merci und Hallo natürlich auch an Tom Junior ( jetzt bald Tom Senior) und Jan für die Hilfen bei der Korrektur, Karen, Patchy, Christian, Mirjam, Andi und Ron, Henrike, Chitti, Burkhard, Vanessa, Steffi, Yvonne und Dan (the man), Arnim, Ruth, Ceci, Sarah, Schmitti, Claudi, Sabine, Sonja (Frostbeulen, Danzig, Saure Pommes und jede Menge Fliegeneier) , Chris, die Leo-Gang, an die Red Pearls und an Sabrina, Nadine (wir waren schon ein tolles Team) und natürlich auch an die TA's, die Mannschaft aus der Werkstatt und an alle Angehörigen des Lehrstuhls und Nicht-angehörigen, die jetzt hier nicht stehen, aber eigentlich stehen sollten!*

*Euer Tom*