

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologie
Schwerpunkt Neurophysiologie
Vorstand: Professor Dr. med. Manfred Heckmann

**„Die Rolle
präsynaptischer Proteine
Aktiver Zonen
bei konditionierten Lernprozessen“**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sandra Gabi Ulzhöfer

aus Grünsfeld

Würzburg, März 2017



Referent: Prof. Dr. med. Manfred Heckmann
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Raabe
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.18

Die Promovendin ist Ärztin.

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Synapse als Kommunikationsstelle	1
1.2	Synaptische Plastizität.....	2
1.3	Aktive Zonen Proteine Bruchpilot, RIM und Fife	4
1.4	<i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus	7
1.5	Appetitives olfaktorisches Lernen in <i>Drosophila melanogaster</i> Larven.....	9
1.6	Fragestellung und Zielsetzung.....	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Versuchstiere.....	13
2.1.1	Haltung	13
2.1.2	Verwendete Genotypen und Stämme.....	13
2.2	Versuchsdurchführung larvales Lernen	14
2.2.1	Das Paradigma	14
2.2.2	Auswertung.....	17
2.3	Immunhistochemie.....	18
2.4	Statistik	21
3	Ergebnisse	23
3.1	Das Expressionsmuster der GAL4-Treiberlinie OK107.....	24
3.2	Die Rolle von Bruchpilot im olfaktorischen assoziativen Lernen von <i>Drosophila melanogaster</i> Larven	28
3.2.1	Herunterregulierung von Bruchpilot mittels RNA-Interferenz	28
3.2.2	Verstärkung durch <i>dicer2</i>	30
3.2.3	BRP-Nullmutante	32
3.2.4	Präferenztest	33
3.3	Die Überexpression von RIM-Punktmutationen hat keinen Einfluss auf das larvale olfaktorische Lernen	35
3.4	Fife scheint notwendig für olfaktorisches Lernen zu sein.....	38
3.4.1	Fife-RNAi	39
3.4.2	Fife-Nullmutante	41

4	Diskussion	43
4.1	Synaptische Plastizität als Grundlage für Lernprozesse im olfaktorischen Pfad	43
4.1.1	Pilzkörper ausreichend und notwendig für olfaktorisches Lernen .	44
4.1.2	Die zeitliche Komponente	47
4.1.3	BRP – zentrales Gerüstprotein Aktiver Zonen	48
4.1.4	RIM – substanzieller Interaktionspartner	51
4.1.5	Fife – vielfältiges Organisationsprotein	52
4.2	Das große Ganze – eine Perspektive	54
5	Zusammenfassung	56
	Referenzen	58

Danksagung

Lebenslauf

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete <i>Drosophila</i> Stämme.....	13
Abb. 1: Vorgänge der Kurzzeitplastizität in der Präsynapse.....	4
Abb. 2: Strukturdomänen von RIM1 α	6
Abb. 3: Paradigma.....	17
Abb. 4: Vereinfachtes Schema Aktiver Zonen Proteine von <i>Drosophila melanogaster</i>	23
Abb. 5: Larvales chemosensorisches System	25
Abb. 6: Expressionsmuster der GAL4-Linie OK107-GAL4	27
Abb. 7: Assoziatives Lernen unter Herunterregulierung der BRP-Menge in OK107-positiven Pilzkörperneuronen via RNAi	29
Abb. 8: Assoziatives Lernen unter Verstärkung des RNAi-Effekts mittels Dicer auf das BRP-Level in Pilzkörperneuronen.....	31
Abb. 9: Assoziatives Lernen der heterozygoten BRP-Nullmutante.....	33
Abb. 10: Präferenztests der <i>brp-RNAi</i> ^{B3C8} - und Nullmutanten-Larven für Amylacetat vs. Octanol	344
Abb. 11: CORD7- Mutation.....	36
Abb. 12: Assoziatives Lernen unter von Larven mit Überexpression von RIM-Punktmutationen in der C ₂ A-Domäne	37
Abb. 13: Interaktionsdomänen von Fife 1 (Isoform 1).....	388
Abb. 14: Assoziatives Lernen unter Verminderung von Fife mittels RNAi	40
Abb. 15: Assoziatives Lernen der heterozygoten und homozygoten <i>fife</i> -Nullmutante	42
Abb. 16: Schema des assoziativen Lernens in der Larve.....	455

Abkürzungsverzeichnis

Aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AC	Adenylatzyklase
AL	Antennallobus
AM	Amylacetat
AN	Antennalnerv
ARM	Anästhesie-resistentes Gedächtnis
ASM	Anästhesie-sensibles Gedächtnis
ATP	Adenosintriphosphat
Aufl.	Auflage
AZ	Aktive Zone
BRP	Bruchpilot
bzw.	beziehungsweise
ca	Kalyx
ca.	circa
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II Serin/Threonin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAZ	Cytomatrix of the Active Zone
CL	Zentrallobus
CS	konditionierter Stimulus
d.h.	das heißt
DA	Dopamin
DAG	Diacylglycerol
DO	dorsales Organ

DOG	dorsales Organ Ganglion
DPS/VPS/ PPS	dorsales/ventrales/posteriores Pharyngealorgan
evtl.	eventuell
GFP	Grün-Fluoreszierende-Protein
ggf.	gegebenenfalls
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
iACT	innerer Antennocerebraler Trakt
IN	Interneuron
KC	Kenyonzelle
LH	Laterales Horn
LI	Lernindex
LN	labral nerve
MB	Pilzkörper
Mio.	Millionen
MN	Maxillarisnerv
NMJ	Neuromuskuläre Endplatte
OA	Octopamin
OCT	Octanol
ORN	olfaktorische Rezeptor-Neurone
PBS	Phosphate buffered saline
Ped	Pedunkel
PFA	Paraformaldehyd
PK	Proteinkinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

PN	Projektionsneuron
RIM	Rab3-interacting molecule
RNAi	RNA Interferenz
RP	Reservepool
RRP	ready releasable pool
s.	siehe
SEG	suboesophagales Ganglion
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
sog.	sogenannt
TO	terminales Organ
US	unkonditionierter Stimulus
usw.	und so weiter
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VO	ventrales Organ
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zinkfinger

1 Einleitung

1.1 Synapse als Kommunikationsstelle

Die Fähigkeit, neue Sachverhalte aufzunehmen und zu verarbeiten, also zu lernen, ist etwas ganz Zentrales im täglichen Leben. Man motiviert sich, nimmt neue Eindrücke und Fakten auf, verknüpft sie und speichert sie im Gedächtnis, um sie später bei Bedarf wieder abzurufen und sich erinnern zu können. Nur so ist man in der Lage, sich weiterzuentwickeln und neue Zusammenhänge zu bilden. Wie wesentlich unser Gedächtnis ist, wird deutlich, wenn es nicht mehr richtig funktioniert. Patienten, die beispielsweise an der Alzheimer Demenz erkranken, haben oft schon in frühen Phasen Probleme, sich neue Fakten zu merken oder sich an persönliche Ereignisse zu erinnern.

Damit Informationen in unserem Gehirn weitergeleitet und verknüpft werden können, muss es zur Kommunikation zwischen einzelnen Neuronen kommen. Dies passiert an zentralen Schaltstellen, den Synapsen. Hier kommuniziert die Präsynapse von Neuron A mit der Postsynapse von Neuron B, sodass die Information über den synaptischen Spalt hinaus weitergegeben werden kann. Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Typen von Synapsen, elektrische und chemische. Bei elektrischen Synapsen fließt der Strom von einer Zelle zur anderen über sog. Connexine bei Vertebraten und Innexine bei Invertebraten. Diese sind unspezifische Kanalproteine in der Membran, die einen schnellen Ionenstrom zwischen benachbarten Zellen erlauben. Bei chemischen Synapsen wird die Depolarisation der Zelle A in ein chemisches Signal umgewandelt und mit Hilfe von Neurotransmittern, welche postsynaptische Kanäle oder Rezeptoren (ionotrop/metabotrop) erregen, weitergegeben (Heckmann und Dudel, 2010). Diese Botenstoffe werden in Vesikeln der Präsynapse gespeichert. Erreicht ein Aktionspotential die präsynaptische Membran führt dies zur Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle, die Ca^{2+} -Konzentration der Zelle nimmt zu und durch Wechselwirkungen präsynaptischer Proteine wird die Fusion der Vesikel mit der Membran vermittelt. Auf diese Weise werden die Transmitter in den synaptischen Spalt freigegeben, welche an der postsynaptischen Membran mit

entsprechenden Rezeptoren oder Kanälen interagieren (Scheller, 1995; Jahn und Fasshauer, 2012).

1.2 Synaptische Plastizität

Die schnelle und effektive Kommunikation zwischen einer Vielzahl von Zell-Netzwerken, stellt das Fundament für höhere Gehirnfunktionen dar, wie z.B. Lernen und Gedächtnisbildung. Um dies zu ermöglichen muss auch eine gewisse Flexibilität der einzelnen Synapsen und deren Übertragungseigenschaften gegeben sein, wodurch Raum für Anpassung und Veränderung entsteht. Ende der 40er Jahre des 20. Jahrhunderts formulierte der kanadische Psychobiologe Donald O. Hebb ein Prinzip, das nach wie vor als zelluläre Grundlage für die Anpassungsvorgänge in unserem Gehirn gilt:

„When an axon of cell A is near enough to excite cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased.“ Hebb 1949

Diese Hebb'sche Lernregel beschreibt, wie sich eine Zelle B durch gezielte, wiederholte Aktionspotenziale von Zelle A beeinflussen lässt, sodass es zu spezifischen Anpassungen kommt, welche die Effektivität der Kommunikation beider Zellen erhöht (Hebb, 2002). Dieses Konzept der Funktionsanpassung ist vermutlich die physiologische Basis von Lernen und Gedächtnisbildung und wird als synaptische Plastizität bezeichnet (Abbott und Nelson, 2000; Martin et al., 2000).

Die molekularen Mechanismen der Plastizität wurden unter anderem von dem amerikanischen Neurobiologen Eric Kandel an der Meeresschnecke *Aplysia* erforscht. Er bestärkte die Aussage von Hebb, dass Lernen eine funktionelle Anpassung der Effektivität und der Übertragungseigenschaften bereits bestehender neuronaler Verknüpfungen darstellt (Kandel et al., 2000).

Hierbei lässt sich zwischen Kurzzeitplastizität und Langzeitplastizität unterscheiden. Unter Kurzzeitplastizität versteht man Veränderungen, die meist

schon nach kurzer Zeit entstehen und für Sekunden oder Minuten anhalten können und vor allem in einer Steigerung oder Senkung der Transmitter-Ausschüttung resultieren. Langzeitpotenzierung kann hingegen entweder Minuten bis Stunden oder sogar Tage bis hin zu Wochen, Monaten und Jahren andauern und manifestiert sich u.a. in der Ausbildung neuer Synapsen (Birbaumer und Schmidt, 2010). Man kann also anhand der Zeit keine klare Trennlinie zwischen Kurz- und Langzeitpotenzierung ziehen. Dementsprechend, gibt es auch Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei den Vorgängen auf molekularer Ebene. Da sich die vorliegende Arbeit mit Mechanismen der Kurzzeitplastizität beschäftigt, sollen diese im Folgenden kurz erläutert werden.

Bei der Kurzzeitplastizität spielen vor allem sog. Interneurone eine Rolle. Aus ihren Endigungen wird ein Transmitter ausgeschüttet, der an dem nachgeschalteten Neuron, zwei verschiedene Arten von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR= G-protein-coupled-receptor) aktiviert (Abb. 1). Dadurch werden in dieser Präsynapse verschiedene Vorgänge in Gang gesetzt und Effektoren aktiviert, wie z.B. die Adenylatzyklase und verschiedene Proteinkinasen (PK). In Zusammenarbeit mit der PKC, fördert die PKA die Mobilisation der Vesikel, öffnet Ca^{2+} -Kanäle und sorgt für die Phosphorylierung verschiedener Proteine. Die Modulation dieses Prozesses, über Ca^{2+} -Einstrom und Proteinphosphorylierung führt zu einer gesteigerten Rekrutierung von Vesikeln und erhöht die Freisetzungswahrscheinlichkeit der Vesikel. Dieser Schritt ist entscheidend für die Effektivität der Informationsweiterleitung und der Gedächtniskonsolidierung (Kandel et al. 2000).

Damit dies möglich wird müssen einige Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Zum einen ist es wichtig, dass sich die Kalziumkanäle in enger Nachbarschaft zu den Vesikeln befinden, um so eine schnelle und effektive Interaktion zu gewährleisten (Neher und Sakaba, 2008; Südhof, 2012a). Zum anderen müssen sich die Vesikel an der präsynaptischen Membran anlagern, fertig bestückt sein und vorbereitet werden für die Verschmelzung („priming“ und „docking“ müssen stattgefunden haben). Diese Schritte werden unter anderem

von den Proteinen der Aktiven Zone (AZ) übernommen (Schoch und Gundelfinger, 2006; Südhof, 2012b).

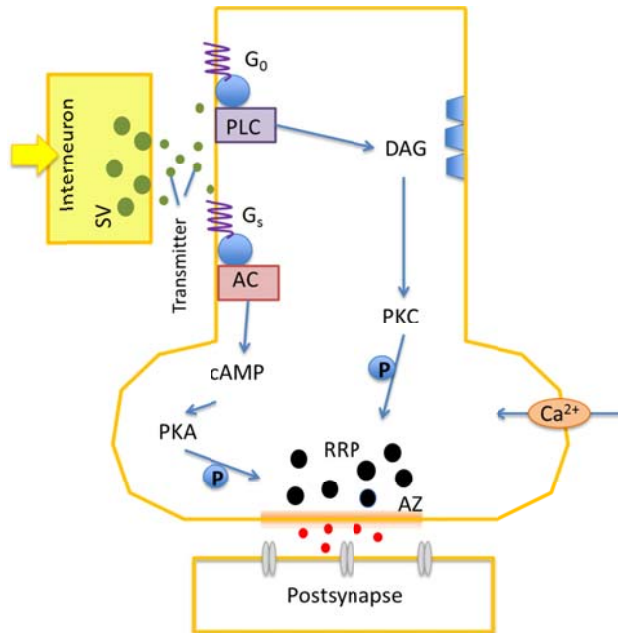


Abb. 1: Vorgänge der Kurzzeitplastizität in der Präsynapse

Auf molekularer Ebene aktiviert der Transmitter aus dem Interneuron zwei verschiedene Arten von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, einen stimulierenden G_s und einen inhibierenden G_o . Der G_s -Rezeptor aktiviert die Adenylatcyclase (AC), die wiederum, unter Verwendung von ATP, cAMP bildet. Dieser Second-Messenger aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die zu einer erhöhten Rekrutierung von transmitter-gefüllten Vesikeln führt. Außerdem werden zusätzlich auch direkt L-Typ Ca^{2+} -Kanäle geöffnet. Der G_o -Rezeptor aktiviert die PLC und dann weiter über DAG die PKC. In Zusammenarbeit mit der PKC, fördert die PKA die Mobilisation der Vesikel, öffnet Ca^{2+} -Kanäle und sorgt für die Phosphorylierung verschiedener weiterer Proteine. SV=synaptische Vesikel, PLC=Phospholipase C, AC=Adenylatzyklase, DAG=Diacylglycerol, PKC=Proteinkinase C, PKA=Proteinkinase A, P=Phosphorylierung, RRP=Ready releasable pool, AZ=Aktive Zone (modifiziert nach Kandel et al., 2000)

1.3 Aktive Zonen Proteine Bruchpilot, RIM und Fife

Der Ort, an dem die Verschmelzung der Vesikel mit der Membran stattfindet, bezeichnet man als Aktive Zone (AZ) (Couteaux und Pécot-Dechavassine,

1970). Sie sorgt mit ihren vielen verschiedenen Proteinen und Interaktionspartnern dafür, dass rechtzeitig genügend Vesikel an der Membran angedockt und „verschmelzungsbereit“ sind, sodass die Fusion und somit der Informationsfluss reibungslos ablaufen können. Den Hauptbestandteil Aktiver Zonen bildet nach heutiger Ansicht ein Protein-Komplex die sog. Zytomatrix Aktiver Zonen (CAZ), bestehend aus einigen wenigen AZ-spezifischen Proteinen: RIM, Munc13, RIM-BP, α -Lipirin und ELKS/CAST-Proteine. Darüber hinaus weiß man, dass in Vertebraten noch weitere Proteine, wie beispielsweise Piccolo und Bassoon mit der Aktiven Zone assoziiert sind (Südhof, 2012b). Abgesehen von einigen Spezialisierungen sind die Aktiven Zonen der Invertebraten in Funktion und Aufbau ähnlich derer in Vertebraten.

Daher fand man zu den meisten AZ-Proteinen ein entsprechendes Korrelat in der *Drosophila melanogaster*. Ein Beispiel hierfür ist Bruchpilot (BRP), welches hohe Homologien zum humanen ELKS/CAST Proteinen aufweist. Es hat seinen Namen von einem älteren Kinderfilm, in dem ein Pilot immer wieder mit seinem Flugzeug abstürzt. Man hat beobachtet, dass die Reduktion von BRP in Fliegen zu Verhaltensauffälligkeiten führt, z.B. sind die betroffenen Tiere nicht mehr in der Lage, konstant zu fliegen (Wagh et al., 2006). Darüber hinaus führen Mutationen und Manipulationen dieses Proteins zu einer erniedrigten evozierten Transmitterausschüttung und zur reduzierten Freisetzung von Vesikeln pro Aktionspotenzial an der neuromuskulären Synapse (Kittel et al., 2006). Bei genaueren strukturellen Untersuchungen konnte man feststellen, dass BRP-Mutanten keine T-Bar besaßen, welche wichtiger Bestandteil Aktiver Zonen in *Drosophila* sind. Diese elektronen-dichte Struktur reicht in das präsynaptische Zytoplasma hinein und ist bislang an der neuromuskulären Endplatte sowie in einigen zentralen Synapsen detektiert worden. Die T-Bar der *Drosophila* ist von synaptischen Vesikeln und Ca^{2+} -Kanälen umgeben und hat vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf aktivitäts-abhängige Änderungen der Synapse (Zhai und Bellen, 2004; Wagh et al., 2006). Mit Hilfe hochauflösender Mikroskopieverfahren erkannte man, dass BRP selbst integraler Bestandteil der T-Bars ist und somit essentiell für deren Zusammensetzung ist (Fouquet et al., 2009). Übereinstimmend damit wurde festgestellt, dass Ca^{2+} -Kanäle in BRP-

Mutanten zwar vorhanden sind, aber in geringerer Zahl und Dichte auftreten (Kittel et al., 2006). Dieser Zusammenhang könnte auch Auswirkungen auf die synaptische Plastizität und Lernen haben.

Auch das AZ-Protein RIM ist in *Drosophila* konserviert. Während Vertebraten vier RIM-Gene mit verschiedenen Isoformen besitzen, hat man bisher in der *Drosophila* nur ein Gen entdeckt. Dieses weist allerdings alle typischen Domänen humaner RIM Proteine auf (Abb. 2) (Wang und Südhof, 2008).



Abb. 2: Strukturdomänen von RIM1 α

RIM1 α besitzt vier strukturelle Domänen: Die N-terminale Zinkfinger-Region (Zn), die zentrale PDZ- und C₂A-Domäne sowie die C-terminale C₂B-Domäne. Jede Domäne dient als spezifischer Interaktionspartner für verschiedene Proteine (modifiziert nach Schoch und Gundelfinger, 2006).

Ursprünglich entdeckt wurde die RIM-Proteinfamilie durch ihre Interaktion mit dem Vesikel-Bindungs-Protein Rab3A (Wang et al., 1997). Später zeigte sich, dass RIM Proteine durch ihre vielen Interaktionsdomänen als wichtige Bindeglieder zwischen den verschiedenen AZ-Proteinen fungieren. RIM Proteine sind für den Reifungsprozess (Priming) der synaptischen Vesikel und damit für die präsynaptische Plastizität wichtig (Koushika et al., 2001; Castillo et al., 2002; Schoch et al., 2002). Unterstützend dafür spricht, dass RIM1 α auch Substrat für die PKA ist (Lonart et al., 2003). Man vermutet aber auch, dass dieses Protein eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisvorgängen spielt. Übereinstimmend damit, wurde 2007 eine Arbeit veröffentlicht, in der ein Zusammenhang zwischen einer Punktmutation im *rim1*-Gen und einer erhöhten verbalen Intelligenz bei Menschen festgestellt wurde (Sisodiya et al., 2007).

Bislang unbekannt war das *Drosophila* Ortholog zu Piccolo, jedoch wurde kürzlich das Protein Fife entdeckt, welches entsprechende Funktion und Struktur aufweist. Fife tritt an Aktiven Zonen kolokalisiert mit BRP auf und ist

somit Bestandteil der AZ. In Fife-Mutanten fand man eine eingeschränkte Transmitterfreisetzungen und strukturelle Veränderungen der Synapse. Diese Defizite spiegeln sich auch in eingeschränktem lokomotorischen Verhalten wider (Bruckner et al., 2012). Darüber hinaus vermutet man, dass auch Einfluss nimmt auf die synaptische Plastizität (Bruckner et al., 2017).

Die beschriebenen Proteine übernehmen Kernaufgaben der Aktiven Zone: Das Andocken und Vorbereiten der Vesikel, die Rekrutierung von Ca^{2+} -Kanälen in der nahen Umgebung und die Modulation der synaptische Plastizität (Zhai und Bellen, 2004; Südhof, 2012a).

1.4 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Wie kann man nun aber diesen überaus komplexen Prozess der synaptischen Plastizität und der Gedächtnisbildung an Aktiven Zonen näher erforschen? Man hat erkannt, dass sich diese Vorgänge zunächst leichter in einem anderen System als dem Menschen untersuchen lassen, denn so lassen sich die experimentellen Rahmenbedingungen und potenzielle Störfaktoren leichter kontrollieren (Lieberman, 2000a). Darüber hinaus erlauben es sogenannte Modellorganismen gezielte und effiziente genetische Manipulationen durchzuführen. Ihr Genom ist simpler und man kann gezielt einzelne genetischen Konstrukte ein- oder ausschalten, um dann zu überprüfen, welche Veränderungen dadurch hervorgerufen werden. Zusätzlich sind diese Organismen zumeist einfacher aufgebaut, kostengünstig zu halten und lassen sich schnell reproduzieren. Insekten stellen hier eine besonders attraktive Möglichkeit dar, da sie viele Homologien mit Vertebraten aufweisen, allerdings einfacher aufgebaut sind (Hirth und Reichert, 1999; Davis, 2004).

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* stellt seit Jahren ein häufig verwendetes Modell dar. Das binäre Expressionssystem GAL4/UAS ist einer der vielen Faktoren, warum *Drosophila melanogaster* ein geeignetes Versuchstier darstellt (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Dieses erlaubt die binäre Expression genetischer Konstrukte, wobei durch Kreuzung zweier Fliegenstämme eine GAL4- mit einer UAS-Linie zusammengebracht werden. Die GAL4-Komponente bestimmt dabei „wo“ im Körper die Expression der

genetischen Konstrukte stattfindet, also in welchen Zellen (Pilzkörper, Ringneuronen) und das UAS-Transgen „was“ (Mutationen). Des Weiteren kann man diese Konstrukte mit Expressions-Reportern verknüpfen. Ein prominentes Beispiel hierfür ist das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP), das sich nach der Expression mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie darstellen lässt (Yeh et al., 1995). Auf diese Weise kann man die Effektivität und die Genauigkeit der Effektor-Konstrukte überprüfen. Mittlerweile sind große Datenbanken für GAL4 und UAS-Stämme vorhanden (flybase, GETDB, flytrap, Gene Search), welche es ermöglichen nahezu jedes beliebige Gen spezifisch zu beeinflussen. So können ganze Gehirnbereiche oder auch nur eine spezifische Gruppe von Neuronen angesprochen werden, um dort genetische Veränderungen hervorzurufen.

Dieses System kann man zudem mit anderen Effektoren kombinieren, wie zum Beispiel dem RNAi-System (RNA Interferenz). RNAi ermöglicht es, gezielt die Konzentration bestimmter Proteine zu mindern oder gar auszuschalten (Fire et al., 1998; Kuttenkeuler und Boutros, 2004). RNAi beschreibt einen post-transkriptionalen Prozess, bei dem die Umsetzung von mRNA in ein funktionsfähiges Protein unterbrochen wird. Für die Entdeckung dieses Vorgangs erhielten Craig Mello und Andrew Fire 2006 den Nobelpreis.

In dieser Arbeit wurden die Experimente an *Drosophila* Larven durchgeführt. Diese haben 10 – 100 fach weniger Neurone als adulte Fliegen und 10 Millionen mal weniger als der Mensch und sind dennoch zu vielfältigem und komplexem Verhalten fähig, was sie für die Untersuchung neurobiologischer Fragestellungen überaus qualifiziert (Pitman et al., 2009). So wird die Neuromuskuläre Endplatte des larvalen Muskels schon seit Jahren genutzt, um die Vorgänge der synaptischen Plastizität zu verstehen (Koh et al., 2000; Hallermann et al., 2010).

Dass Fruchtfliegen eine hohe Genhomologie mit Vertebraten aufweisen favorisiert deren Verwendung nur noch mehr. Außerdem sind viele molekulare Prozesse zwischen den verschiedenen Spezies konserviert. Dies erleichtert später die Ausweitung der Ergebnisse auf andere Spezies. Vor allem Vorgänge

wie Verhalten oder synaptische Plastizität zeigen auf molekularer Ebene viele Gemeinsamkeiten zwischen Invertebraten und Säugetieren (Pittenger und Kandel, 2003).

1.5 Appetitives olfaktorisches Lernen in *Drosophila melanogaster* Larven

Prinzipiell kann man zwei inhaltliche Gedächtnisformen differenzieren. Das deklarative (oder explizite) Gedächtnis und das nicht-deklarative Gedächtnis (oder implizite). Zu letzteren gehört der Mechanismus des assoziativen Lernens: Werden einem Individuum zwei Reize immer in enger zeitlicher Korrelation miteinander präsentiert (1.Reiz A, 2. Reiz B), lernt man mit der Zeit, dass Reiz B Reiz A folgt. Typische Beispiele sind die klassische Konditionierung nach Pawlow und die operante Konditionierung. Hierbei spielt in Vertebraten die Amygdala eine wichtige Rolle, da häufig Emotionen wie Angst oder Belohnung als biologischer Reiz benutzt werden. Das in dieser Arbeit bei *Drosophila melanogaster* angewandte Paradigma des appetitiven olfaktorischen larvalen Lernens (siehe auch Material und Methoden 2.2.1) ist ein viel verwendetes assoziatives Lernkonzept, basierend auf der klassischen Konditionierung nach Pawlow. Der russische Physiologe stellte fest, dass ein konditionierter Stimulus (CS), wenn er mit einem unkonditionierten Reiz (US) gekoppelt wird, nach einiger Zeit durch Training eine unkonditionierte Reaktion hervorrufen kann (Lieberman, 2000b).

Dass diese Art der Konditionierung auch bei *Drosophila melanogaster* anwendbar ist, zeigten erstmals Tully und Quinn 1985. Sie verbanden die Präsenz von zwei Düften mit Elektroschocks. Die adulten Fliegen sollten dabei lernen, dass der eine Duft CS+ mit einem Schock, etwas Negativem, verknüpft war. Wohingegen sie in der Gegenwart von dem anderen Duft CS- sicher waren. Später wurde dies in einem Testversuch geprüft, in dem die Fliegen gelernt haben sollten, CS+ zu meiden (Tully und Quinn, 1985). Tempel und Kollegen zeigten 1983, dass dieser Lernvorgang ebenfalls mit Belohnung als Verstärker funktioniert (Tempel et al., 1983). Die Grundannahme für dieses Experiment war, dass sich die Fliegen durch die zeitliche Kopplung von Duft

und Zucker, als Belohnung, konditionieren lassen, was dann mit einem Testversuch überprüft werden kann. Über ein Jahrzehnt später entdeckte man dann, dass dieser Versuchsaufbau sich auch auf *Drosophila* Larven übertragen lässt (Dukas, 1998; Scherer et al., 2003), was sich als entscheidender Schritt erwies, da der Gehirnaufbau und somit auch das olfaktorische System hier nochmal einfacher gestaltet sind (Stocker, 2001; Python und Stocker, 2002). Bei *Drosophila* Larven scheint ein Lernvorgang, gekoppelt an einen positiven gustatorischen Stimulus, sogar besonders geeignet, da der gesamte Organismus einer Larve im dritten Stadium auf Futter-Aufnahme ausgelegt ist. Fruktose scheint als Belohnung dafür ausreichend zu sein (Hendel et al., 2005; Gerber et al., 2013). Neuser und Kollegen modifizierten dieses Konzept des appetitiven larvalen Lernens dann weiter. So zeigten sie, dass es möglich ist, die Larven in Gruppen von 30 zu testen, und dass drei Trainingsdurchläufe ausreichend sind, um ein olfaktorisches Gedächtnis zu erzeugen. Dieses etablierte Paradigma, wurde auch in dieser Arbeit verwendet, wobei Fruktose als gustatorischer Verstärker eingesetzt wurde (Neuser et al., 2005).

Um eine Konditionierung im olfaktorischen System zu etablieren, müssen nun an einer Stelle der unkonditionierte Stimulus (in diesem Fall die Fruktose) und der konditionierte Stimulus (der Geruch) aufeinander treffen. Schon früh wurde gezeigt, dass die *second-messenger*-Kaskade des cAMP/PKA-Signalwegs auf molekularer Ebene für Gedächtnis und Lernen von Bedeutung ist. Demgemäß geht man heute davon aus, dass die Adenylatzyklase als sogenannter Koinzidenzdetektor fungiert, der den unkonditionierten Stimulus (US) und den konditionierten Stimulus (CS) bei konditionierten Lernprozessen miteinander verbindet (Heisenberg, 2003; Gervasi et al., 2010). So brachte ein Mutagenese-Screen die ersten Fliegenlinien hervor, welche aberrante Kurzzeitplastizität aufwiesen. Die erste beschriebene Lernmutante war *dunce*. Dieses Gen resultierte in einer beeinträchtigten Aktivität der cAMP Phosphodiesterase, welche cAMP spaltet. Fliegen mit einer *dunce*-Mutation, zeigten eindeutige Defizite in ihrem assoziativen Lernverhalten (Dudai et al., 1976). Als nächstes fand man ein Gen, welches für die Adenylatzyklase Typ-I kodiert, *rutabaga*. Die Mutation stört den cAMP-Signalweg durch eine Veränderung der katalytischen

Aktivität der Adenylatzyklase, welche sowohl auf Ca^{2+} /Calmodulin als auch auf G_s -Proteine reagiert (Livingstone et al., 1984). Man fand außerdem heraus, dass auch die nachfolgenden Moleküle der cAMP-Signalkaskade, wie z.B. die Proteinkinase A, das Lernverhalten beeinflussen. Vor allem die Modifikation der katalytischen Untereinheit der PKA scheint dabei eine kritische Funktion zu haben (Skoulakis et al., 1993).

Die veränderte Phosphorylierung von Proteinen durch den cAMP/PKA-Signalweg scheint also in den Zellen verschiedene Umgestaltungen hervorzurufen, welche die synaptische Plastizität und auch das Lernen beeinflussen. Der nächste Schritt, um die molekularen Vorgänge besser zu verstehen, wäre zu untersuchen, welche genauen Proteine von dieser geänderten Phosphorylierung betroffen sind. Ein Kandidat wäre hier z.B., das Neuronen-spezifische Protein Synapsin, ein Phosphoprotein, das mit synaptischen Vesikeln und Aktin assoziiert ist und für die Aufrechterhaltung der Transmitterausschüttung bei hohen Frequenzen zuständig ist (Greengard et al., 1993; Hilfiker et al., 1999; Sun et al., 2006). Vermutlich erlaubt die Phosphorylierung von Synapsin einigen Vesikeln den Übertritt vom Reserve-Pool zur Aktiven Zone, sodass sie für die Transmitterausschüttung vorbereitet werden können (Pieribone et al., 1995; Sun et al., 2006). Übereinstimmend damit, wurden für Synapsin-Mutanten Beeinträchtigungen des Verhaltens, wie z.B. des olfaktorischen Lernen festgestellt (aversiv: Godenschwege et al., 2004; Knapek et al., 2010; appetitiv: Michels et al., 2011). Man vermutet, dass Synapsin eine Phosphorylierungsstelle für PKA aufweist, und somit auch für die synaptische Plastizität eine Rolle spielt (Michels et al., 2005).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Zusammenhänge bei synaptischer Plastizität und Lernvorgängen und insbesondere die Rolle von drei zentralen Proteinen Aktiver Zonen: Bruchpilot, RIM und Fife, dabei zu differenzieren. Mit Hilfe des gut etablierten Paradigmas des appetitiven olfaktorischen Lernens, wurden Auswirkungen von Mutationen und Manipulationen der Proteine auf assoziatives Lernen und Verhalten in *Drosophila melanogaster* Larven analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Haltung

Die Fliegen wurden auf Standard-*Drosophila*-Medium (Guo et al., 1996) bei einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12/12h und 60% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Aufzuchttemperatur der Fliegen betrug 25°C und 29°C für Fliegen, die für RNAi-Experimente genutzt wurden. Für die Verhaltensexperimente wurden Larven zwischen dem vierten und sechsten Tag nach Eiablage selektiert und bei Raumtemperatur (23°C) gemessen. Dabei wurden, ausgehend von der Größe, Larven für die Verhaltensexperimente selektiert, die sich im dritten Entwicklungsstadium befanden.

2.1.2 Verwendete Genotypen und Stämme

Genotyp	Expressions- muster	Donor	Referenz
$w^{118}; \frac{OK-107-GAL4}{OK-107-GAL4}$	Treibt in Pilkörper- Neuronen	Kirsa Neuser	Lee et al. 1999; Christiansen et al. 2011
$w^{118}; \frac{UAS-brp-RNAi^{B3C8}}{UAS-brp-RNAi^{B3C8}}$	B (CG30337), C (CG30337); 3 und 8 (Insertionen); Brp Herunter- regulierung	VCRC Stock Center	Wagh et al. 2006
$w^{118}; \frac{brp^{69}}{CyO, w, GFP}$	Bruchpilot Nullmutante, homozygot letal	Claudia Wirth	Kittel et al. 2006
$w^{118}; \frac{\alpha HP40 \{ UAS-RIM1(wt)w^+ \} [rim33]}{CyO, GFP, w}; \frac{+}{+}$	RIM52; Überexpression von Wildtyp RIM	Mila Paul	Graf et al. 2012; Paul 2014
$w^{118}; \frac{\alpha HP40 \{ UAS-RIM1(R915H)w^+ \} [rim38]}{CyO, GFP, w}; \frac{+}{+}$	RIM53; Punktmutation	Mila Paul	Paul 2014

	des Arginins an Position 1		
$w^{1118}; \frac{\alpha HP40 \{ UAS - RIM1(R916H)w^+ \} [rim44]}{CyO, GFP, w}; +$	RIM54; Punktmutation des Arginins an Position 2	Mila Paul	Paul 2014
$w^{1118}; \frac{\alpha HP40 \{ UAS - RIM1(R915H, R916H)w^+ \} [rim48]}{CyO, GFP, w}; +$	RIM55; Punktmutation beider Arginine	Mila Paul	Paul 2014
$w^{1118}; \frac{UAS - fife - RNAi}{UAS - fife - RNAi}; ;$	Herrunterregulierung von Fife	Kate O'Connor -Giles	Bruckner et al. 2012
$w^{1118}; \frac{fife - ex^{1027}}{TM6C, Tb}; ;$	Fife-Nullmutante	Kate O'Connor -Giles	Bruckner et al. 2012
$w^{1118}; \frac{UAS - GFP}{UAS - GFP}; \frac{UAS - mcd8 - GFP}{UAS - mcd8 - GFP}$	Treibt GFP	Robert Kittel	Ljaschenko 2013
$w^{1118}; \frac{UAS - dicer2}{UAS - dicer2}; \frac{MB247 - GAL4}{MB247 - GAL4};$	Dicer2 verstärkt RNAi; mb247 treibt in einzelnen Pilzkörper-Neuronen	Dennis Pauls	Zars et al. 2000; Lee et al. 2004; Aso et al. 2009

Tab. 1: Verwendete *Drosophila* Stämme

2.2 Versuchsdurchführung larvales Lernen

2.2.1 Das Paradigma

In den Verhaltensexperimenten wurden zwei Düfte (A und B) als unkonditionierte Stimuli und Fruktose als appetitiver Verstärker verwendet. Es wurden zwei reziproke Versuchsgruppen getestet und im Auswertungsprozess unmittelbar zueinander in Relation gestellt.

Eine Gruppe von Larven wurde in Gegenwart von Duft A mit Fruktose belohnt, aber nicht in Gegenwart von Duft B (A+/B). Die reziproke Gruppe hatte genau umgekehrte Voraussetzungen (A/B+). Pro Gruppe wurden drei

Trainingsvorgänge durchgeführt und anschließend der Lernvorgang anhand eines Testdurchganges überprüft. Hierbei wurden den trainierten Larven zwei Möglichkeiten (Duft A und Duft B) angeboten, zwischen denen sie sich entscheiden konnten. Es wurde antizipiert, dass die (A+/B)- Larven sich eher von A anziehen lassen, da sie gemäß dem Gesetz der klassischen Konditionierung, gelernt haben sollten, dass dieser Duft für sie einen positiven Effekt hat. Bei der reziproken Gruppe (A/B+) sollte der Lerneffekt genau andersherum sein (Abb. 3). Reziproke Gruppen wurden immer alternierend getestet.

Vorgehensweise:

Man führte insgesamt 3 Trainingsvorgänge à 5 Minuten pro Duft durch und nach diesen 6 Durchläufen wurde ein „Testdurchlauf“ mit 3 Minuten durchgeführt.

Als olfaktorische Stimuli wurden den Larven jeweils zwei Düfte, Octanol rein (1-Octanol, Reinheit 99,5 %, Sigma-Aldrich, Deutschland) und Amylacetat (Pentanyl-Acetat, Reinheit 99 %, Sigma-Aldrich, Deutschland) mit der Verdünnung 1:100 in Paraffinöl (Paraffinöl, Sigma-Aldrich, Deutschland) präsentiert. Jeweils 10 µl eines Duftes wurden dafür in einen Teflon-Kontainer (innerer Durchmesser 5 mm) gegeben und anschließend mit einem Deckel verschlossen, in dem sich 15 Luftlöcher (à 1mm) befanden, um die Luftzirkulation zu gewährleisten.

Von Natur aus haben Larven prinzipiell für keinen der beiden Düfte eine Präferenz. Durch Kopplung einer der beiden Düfte mit dem gustatorischen Verstärker Fructose sollte geprüft werden, ob die Larven zu konditioniertem Lernen fähig sind und, ob ein bestimmter Genotyp „besser“ lernt, als ein anderer. Zur Präsentation des gustatorischen Verstärkers wurden Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit einem inneren Durchmesser von 85 mm verwendet und mit Agarose (2 %, Sigma-Aldrich, Deutschland) pur oder versetzt mit Fructose (2 mol, Sigma-Aldrich, Deutschland) in einem 3 mm hohen Film ausgegossen. Die Petrischalen wurden ca. 10 Minuten zum

Aushärten offen stehen gelassen. Danach wurden die Deckel wieder zugeordnet und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden einem Duft, die mit Fructose versetzten Platten zugeordnet, dem anderen Duft die reinen Agaroseplatten. Im Testdurchgang wurden die Düfte mit einer reinen Agaroseplatte präsentiert.

Zu Beginn eines Experiments wurden Larven des 3. Entwicklungsstadiums (4-6 Tage nach Eiablage) anhand ihrer Größe selektiert. Dazu wurde mit einem Spatel etwas Futter, in dem sich die Larven befanden, aus einem Glas entnommen, in eine leere Petrischale gesetzt und mit dH₂O abgespült. 30 Larven wurden mit einem feinen Pinsel selektiert und kurz in einen Tropfen sauberen Wassers gesetzt. Anschließend wurde die erste Trainingsplatte mit Duftcontainern versehen, von denen jeweils zwei gegenüber voneinander und 7 mm vom Petrischalenrand entfernt platziert wurden. Schließlich wurden die Larven in die Mitte der Petrischale gesetzt und die Petrischale mit einem Deckel verschlossen. Dabei befanden sich Luftlöcher (15 Löcher à 1mm) im Deckel, um die Luftzirkulation zu verbessern. Ist der erste Trainingsdurchlauf nach 5 Minuten abgelaufen, werden die Larven vorsichtig mit einem feuchten Pinsel auf die andere Agarplatte transferiert. Das wird insgesamt drei Mal pro Kombination wiederholt (Abb. 3).

Für den Testdurchgang wurde auf eine Test-Agarplatte mit purer 2%-Agarose jeweils ein Duftkontainer mit Octanol (rein) und gegenüber einer mit Amylacetat (1:100) gesetzt. Die trainierten Larven wurden dann in der Mitte aufgesetzt und blieben für 3 Minuten auf der Platte. Nach abgelaufener Zeit wurden die Larven auf der Octanol-, bzw. Amylacetat-Seite gezählt. Dabei war zu beachten, dass Larven, die sich am Deckel befanden, mehr als die Hälfte der Wand der Petrischale hochgekrochen waren oder sich zum Zeitpunkt der Auszählung genau auf dem Mittelstreifen befanden, extra notiert wurden.

Für jeden Duft wurden eigene Pinzetten zum Umsetzen der Duftkontainer und ein eigener Deckel mit Löchern für die Versuchsdurchgänge verwendet, um Restduftspuren des jeweils anderen Geruchs zu vermeiden. Alle Experimente

wurden einfach blind durchgeführt, d.h. der Untersucher wusste nicht, in welchen Petrischalen sich die Fructose als Verstärker befand.

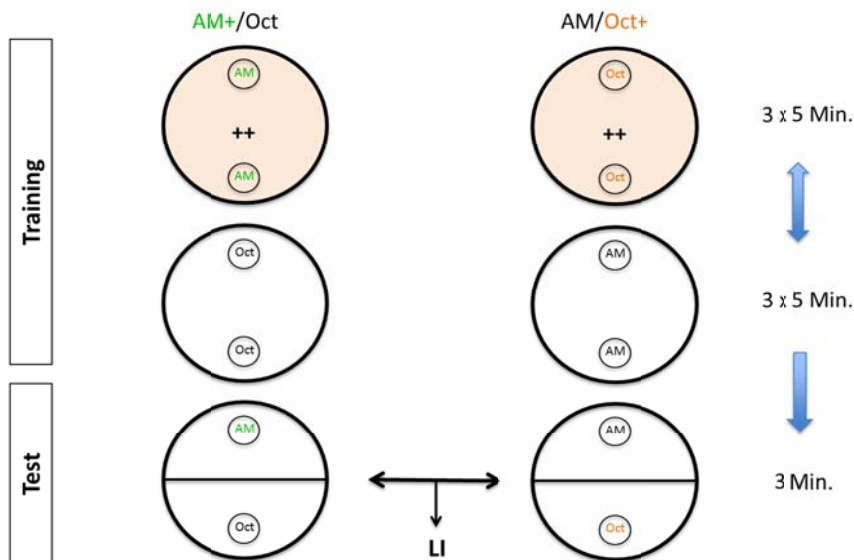


Abb. 3: Paradigma

Gezeigt werden die beiden reziproken Gruppen. Runde Kreise repräsentieren die Petrischalen, rötliche Hinterlegung bedeutet Fructose, gemischt mit Agarose, weißer Hintergrund nur Agarose. Die Fliegen wurden entweder auf Amylacetat (AM) konditioniert (AM+, linke Seite), oder auf Octanol (Oct+, rechte Spalte). Jeweils am Ende von drei Durchläufen pro Duft, wurden die Larven auf ihre Präferenz für entweder AM oder Oct getestet. Aus dem Ergebnis von zwei Testdurchläufen (AM+ und Oct+) wurde ein Lernindex (LI) gebildet (modifiziert nach Neuser et al., 2005).

2.2.2 Auswertung

Der $PREF_{ind}$ gibt die Geruchs-Präferenz an. Man zählte nach dem Test-Versuch die Larven auf der Amylacetat- und auf der Octanol-Seite. Dann subtrahierte man beide voneinander und dividierte sie durch die gesamte Anzahl an Larven, die an dem Testversuch teilgenommen hatten:

$$PREF_{ind} = \frac{Anzahl_{AM} - Anzahl_{Oct}}{Gesamtzahl}$$

Der $PREF_{ind}$ kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Ist er also positiv deutet das eine Präferenz für AM an; ist er hingegen negativ, deutet dies eine Präferenz für Oct an. Ein Wert von 0 bedeutet, dass bei diesem Durchgang gleich viele Larven auf der AM-Seite waren, wie auf der Oct-Hälfte.

LI bedeutet Lernindex. Hiermit will man prüfen, ob das Lernverhalten sich zwischen einzelnen Tests eines Genotyps (AM+ oder Oct+) unterscheidet. Man vergleicht die $PREF_{ind}$'s zweier reziproker Lernversuche: Einer, der mit OCT belohnt wurde, im Verhältnis zu einem Versuch, der mit AM belohnt wurde, und vergleicht das Lernverhalten:

$$LI = \frac{(PREF_{ind} AM+) - (PREF_{ind} Oct+)}{2}$$

Positive LI's deuten auf assoziatives Lernen bei diesen Genotypen hin. Um äußere Einflussfaktoren wie z.B. Tageszeit, Handling und Kondition der Larven möglichst gering zu halten, wurde zur Berechnung des LI's, einem $PREF_{ind}$ AM immer der im nachfolgenden Experiment ermittelte $PREF_{ind}$ Oct zugeordnet. Die Paarung ist legitim, weil die reziproken Gruppen exakt dieselben Bedingungen erfahren haben: Die gleiche Belohnung, die identischen Düfte, die gleiche Versuchsdurchführung, die bestmögliche zeitliche Nähe, da reziproke Gruppen immer alternierend getestet wurden. Demnach sollten Unterschiede im Verhalten auf assoziativem Lernen beruhen.

2.3 Immunhistochemie

Lösungen:

- **PBS:**

10x PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,4 :

1,3 M NaCl

0,07 M $Na_2HPO_4^- \times 7 H_2O$

0,03 M $NaH_2PO_4 \times H_2O$

1x PBS :

100ml 10x PBS + 900 ml H₂O

- **PBT 0,03%:** 1x PBS + 0,03% Triton X 100

- **Ringer-Lösung:**

7,48 g NaCl

0,35 g KCl

0,2 g CaCl₂

0,105 g Na₂HPO₄

0,048 g KH₂PO₄

Volumen anschließend bis 1l auffüllen mit dH₂O

- **4% PFA (in PBS):**

4% Paraformaldehyde (Merck)

300 ml DEPC-H₂O

Aufwärmen bis 55°C

Ein paar Tropfen von 2 N NaOH hinzufügen

Abkühlen lassen auf Raumtemperatur

40 ml 10x PBS

Auffüllen bis 400 ml DEPC-H₂O

pH-Wert auf 7,4 einstellen

Aufbewahrung bei 4°C

Um die Gehirne der Larven freizulegen, wurden Larven im 3. Entwicklungsstadium mit dH₂O aus dem Futterbrei gewaschen und in eisgekühlter Ringer-Lösung präpariert. Kälte vermindert zum einen die schnelle Degeneration der Proteine und zum anderen immobilisiert es die Larven. Die Larven wurden jeweils mit einer kurz geschnittenen Minutiennadel (Durchmesser 0,1 mm, Austerlitz Insect Pins, Slakov u Brna, Tschechien) sowohl am Kopf als auch kaudal auf einer Sylgard-Unterlage (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) mit der dorsalen Seite nach oben festgepinnt. Mit einer feinen Flügelschere wurde dann kurz vor den Minutien jeweils ein kleiner Schnitt quer zur dorsalen Mittellinie gesetzt. Zwischen diesen beiden Schnitten wurde dann die Larve entlang der dorsalen Mittellinie aufgeschnitten. Dabei ist zu beachten, dass der Schnitt nicht zu tief angesetzt wird, um Gewebeverletzungen zu vermeiden. Nun wurden die beiden Körperwandhälften mit jeweils zwei weiteren Nadeln seitlich aufgespannt, sodass das Innere der Larve freiliegt. Vorsichtig wurden dann der Darm und die Tracheen entfernt, so dass der Blick auf das larvale Gehirn frei wurde. Dieses wurde anschließend von den Nervensträngen abgetrennt, in 4% PFA-Lösung in eine Wellplatte mit Netzchen überführt und für 1 ½ Stunden bei 4 °C auf dem Taumler fixiert. Anschließend wurden die Gehirne 3 mal 20 Minuten in 0,3% PBT (PBS inklusive 0,05 % Triton X-100, Sigma-Aldrich, Deutschland) bei Raumtemperatur auf dem Taumler gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen, wurden die Gehirne danach für 1 ½ Stunden in 0,3% PBT mit 4% NGS (normal goat serum, Jackson Immunoresearch, USA) auf dem Taumler bei Raumtemperatur geblockt. Der primäre Antikörper GFP (rabbit, A6455, Invitrogen, Carlsbad, USA) 1:1000 in 0,3% PBT und 4% NGS wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte wieder ein Waschschrift mit 3 mal 20 Minuten in 0,3% PBT bei Raumtemperatur. Dann wurde der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 (A1102, Invitrogen, Carlsbad, USA) 1:1000 wieder über Nacht inkubiert. Am Tag darauf folgte noch ein letzter Waschschrift mit 3 mal 20 Minuten.

Zum Eindeckeln der Gehirne wurden sehr dünne Deckgläser (20x20 mm, Menzel, Braunschweig, Deutschland) mit jeweils zwei Lochverstärkern beklebt

und in der Mitte ein kleiner Tropfen Vector Vectashield Mounting Medium H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, USA) gegeben. Die Gehirne wurden zentral eingebettet und auf die Ecken der Deckgläschen wurden jeweils ein wenig Nagellack gegeben und anschließend wieder ein Deckglas oben darauf gesetzt und angedrückt. Die Aufbewahrung der eingedeckelten Gehirne erfolgte bei 4 °C.

Mikroskop:

Die Bilder der larvalen Gehirne wurden alle an einem aufrechten Mikroskop (Axioskop 2FS Mot, Carl Zeiss AG, Deutschland, Objektiv 20x Plan-Neofluar, NA 0,5, ohne Immersion) und dem Image Browser LSM 5 Pascal (Carl Zeiss AG, Deutschland) aufgenommen.

2.4 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, USA) durchgeführt. Zur Prüfung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, da die Stichprobengröße $n < 50$ war. Hierbei wiesen einige Daten Normalverteilung auf, wohingegen andere sich als nicht-normalverteilt erwiesen. Daher wurde bei der weiteren Auswertung das konservativere Vorgehen anhand nicht-parametrischer Tests durchgeführt. Es handelt sich ausschließlich um nicht-verbundene Daten. Verglichen wurden die LI's der verschiedenen Genotypen.

Der Kruskal-Wallis-Test wurde genutzt, um zu ermitteln, ob mehrere Gruppen sich voneinander unterscheiden, d.h. ob ein signifikanter Unterschied in der Performance vorliegt. Der Mann-Whitney-U-Test/Rank-Sum-Test wurde anschließend verwendet, um zwei Gruppen direkt miteinander zu vergleichen.

Bei der Darstellung der Daten wurden sogenannte Boxplots verwendet, die sich besonders zur Darstellung nicht-normalverteilter Daten eignet, da die Streuung der Datenpunkte erkennbar ist. Dabei umfasst die Box 50% der Daten, die horizontale Linie markiert den Median. Die Ränder der Box kennzeichnen jeweils die 25. und 75. Perzentile. Die Whisker markieren die 10. und die 90.

Perzentile. Ausreißer sind mit Punkten gekennzeichnet. Die Ziffer n beschreibt die jeweilige Anzahl der experimentellen Gruppen.

Die folgende Einteilung für das Signifikanzniveau wurde verwendet:

n.s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

3 Ergebnisse

Um zu ergründen, ob Bestandteile der Aktiven Zone eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen spielen, wurden in dieser Arbeit drei Proteine untersucht. BRP, RIM und Fife sind wichtige Bausteine der AZ (Wagh et al., 2006; Koushika et al., 2001; Bruckner et al., 2012) und könnten auch eine essentielle Rolle bei Lernprozessen, wie dem assoziativen Lernen, übernehmen. In einer Reihe von Experimenten wurde untersucht, ob diese Proteine für die klassische Konditionierung olfaktorischer Reize mit gustatorischem Verstärker in *Drosophila melanogaster* Larven notwendig sind.

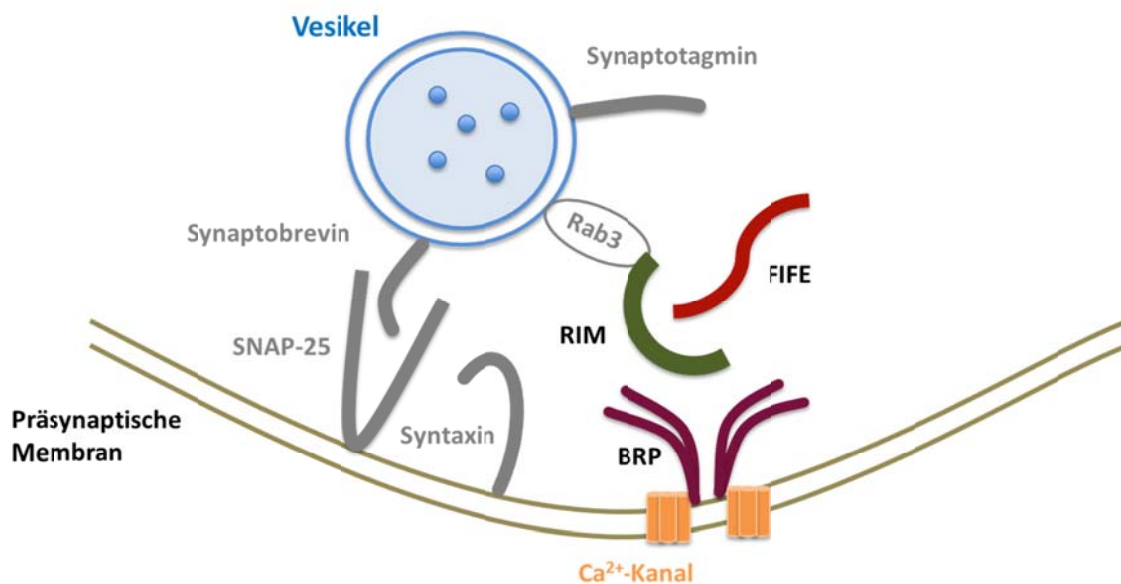


Abb. 4: Vereinfachtes Schema Aktiver Zonen Proteine von *Drosophila melanogaster*

Für die Exozytose synaptischer Vesikel ist die Bildung des SNARE-Komplexes nötig. Hierfür erfolgt eine Konformationsänderung von Syntaxin, welche u.a. von RIM stabilisiert wird. Synaptotagmin ist selbst nicht integraler Bestandteil des SNARE-Komplexes, fungiert als Ca²⁺-Sensor und erleichtert so die Vesikelfreisetzung. Die Ankunft eines Vesikels wird RIM vermutlich durch das Vesikel-gebundene Rab3-Protein mitgeteilt. BRP sorgt u.a. für die Gruppierung der Ca²⁺-Kanäle der AZ, wohingegen Fife u.a. für die Bereitstellung synaptischer Vesikel zuständig ist.

Damit die Exozytose synaptischer Vesikel stattfinden kann, müssen sich die synaptischen Vesikel zunächst an Aktive Zonen anlagern. Hier wird der SNARE-Komplex (englisch: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) gebildet, der aus vesikelgebundenen (Synaptobrevin) und membrangebundenen (SNAP-25, Syntaxin) Proteinen besteht. Dieser unterstützt die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran und interagiert mit Synaptotagmin. Dieses ist nicht selbst Bestandteil des SNARE-Komplexes, wirkt aber eng mit diesem zusammen und fungiert als Ca^{2+} -Sensor (Söllner et al., 1993; Tang et al., 2006).

Die Zytomatrix Aktiver Zonen der *Drosophila* besteht nach heutigen Kenntnissen aus mehreren Proteinen: Bruchpilot, RIM (Rab3-interacting molecule), Rab3, Lipirin- α , Unc-13 und dem kürzlich entdeckten Fife (Abb. 4). Es ist wahrscheinlich, dass die Proteine, die am Aufbau der AZ beteiligt sind, auch Modulatoren der synaptischen Plastizität und damit auch von Lernprozessen sind (del Castillo und Katz, 1954; Zucker und Regehr, 2002).

3.1 Das Expressionsmuster der GAL4-Treiberlinie OK107

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage, ob drei der Aktiven Zonen Proteine notwendig sind für Lern- und Gedächtnisvorgänge, anhand des appetitiven olfaktorischen Lernens von *Drosophila* Larven untersucht. Hierzu ist es wichtig, den prinzipiellen Aufbau des olfaktorischen und gustatorischen Systems der Larve zu kennen. Das larvale chemosensorische System besteht aus drei externen Organen: Dem dorsalen Organ (DO), dem terminalen Organ (TO) und dem ventralen Organ (VO) (Abb. 5). Für den Geruch sind vor allem das DO und teilweise das TO zuständig. Das DO besteht aus einem zentralen olfaktorischen „Dome“ und Geschmacks-Sensillen, um ihn herum. Dabei wird ein Sensillum immer aus einem Haar oder einer Pore gebildet, begleitet von zwei Sinneszellen (Rezeptoren). Die Olfaktorischen Rezeptor-Neurone (ORN's) liegen im DO und teilweise im TO (dorso-laterale Sensillen), haben aber beide ihre Zellkörper im DOG (dorsales Organ Ganglion), wo auch die erste Umschaltung stattfindet. Vom DOG ziehen die olfaktorischen Fasern weiter über den Antennalnerven (AN) zu den Antennalloben (AL). Hier wird das Signal

über GABAerge Interneurone moduliert und schließlich über Projektionsneurone zu den Kenyonzellen (KC) der Pilzkörper (MB) und zum Lateralen Horn (LH) weitergeleitet. Man vermutet, dass der direkte Weg über das LH mehr der Verarbeitung angeborener Reaktionen olfaktorische Signale dient und direkt zum motorischen System weiterleitet, wohingegen der Ast, der zu den Kenyonzellen führt, gelernte Stimuli verarbeitet (Stocker, 1994, 2008). Dass der Pilzkörper eine wichtige Gehirnregion für das olfaktorische Lernen ist, entdeckten Heisenberg und Kollegen 1985 (Heisenberg et al., 1985).

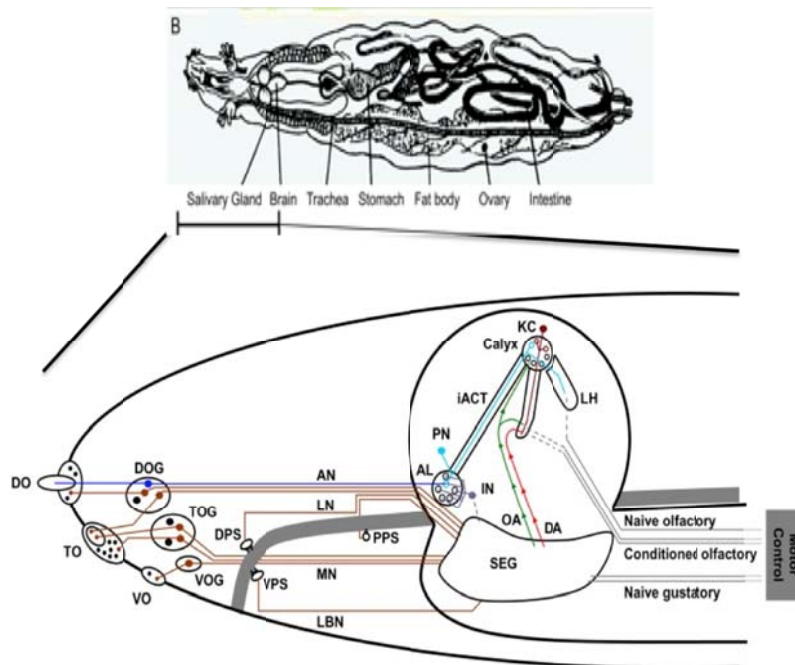


Abb. 5: Larvales chemosensorisches System

Überblick über die wichtigsten zentralen Strukturen: Es gibt 3 externe Organe: Dorsales Organ (DO), terminales Organ (TO) und ventrales Organ (VO). DOG=dorsales Organ Ganglion, AN=Antennal-Nerv, AL= Antennal-Lobus, PN=Projektionsneurone, iACT= innerer Antennocerebraler Trakt, KC= Kenyon-Zellen, LH= laterales Horn, DPS/VPS/PPS= dorsales/ventrales/posteriores Pharyngealorgan, MN= Maxillarinnerv, LN= labral nerve, LBN= Lippennerv, SEG= suboesophageales Ganglion, IN=Interneurone, DA=Dopamin, OA=Octopamin (Gerber und Stocker, 2007. Lizenz erhalten 17.08.16).

Entsprechend ihrer Rolle für die synaptische Plastizität und olfaktorische Lernprozesse, werden die Moleküle cAMP, AC und PKA besonders im Pilzkörper stark exprimiert (Nighorn et al., 1991; Zars et al., 2000; Skoulakis et al., 1993).

Der gustatorische Stimulus wird von 2x 80-90 gustatorischen Neuronen aufgenommen. Diese teilen sich auf das TO, VO und ein Teil des DO, als externe Organe sowie auf drei interne Organe: dorsales, ventrales und posteriores Pharyngealorgan auf. Das Signal verläuft seitlich der Hirnhemisphären zum subesophagalen Ganglion, welches dann die Information weiterleitet, unter anderem zum Pilzkörper und zu den (prä-)motorischen Neuronen, welche konditioniertes Verhalten beeinflussen (Gerber und Stocker, 2007; Vosshall und Stocker, 2007).

Um zu überprüfen, ob die Proteine beim larvalen olfaktorischen Lernen wichtig sind, wurden die Konstrukte im Pilzkörper exprimiert. Um das zu erreichen, wurden die Konstrukte unter der Kontrolle der potenten Pilzkörper-Linie OK107-GAL4 (Lee et al., 1999) exprimiert. Um die Validität dieses Treibers zu verifizieren, wurde das Expressionsmuster dieser Linie anhand der GFP-Expression mittels konfokaler Mikroskopie überprüft.

Die Pilzkörper-Kalyx liegt im dorsoposterioren Kortex des larvalen Gehirns. Die Axone der Kenyonzellen verlaufen medial und posterior zur Kalyx und schließen sich zum Pedunkel des Pilzkörpers zusammen (Abb. 6) (Masuda-Nakagawa et al., 2005). Hieraus gehen der mediale (γ) und die vertikalen Loben (α' und β') hervor. Diese bestehen bei einer Larve im dritten Stadium aus drei Typen von Neuronen: In der Embryonalzeit entstandene γ -Neuronen sowie in der Larvenzeit entwickelte γ -, α' - und β' - Neurone (Lee et al., 1999; Pauls et al., 2010). Die adulten α - und β - Neurone entstehen erst im Puppenstadium (Kurusu et al., 2002).

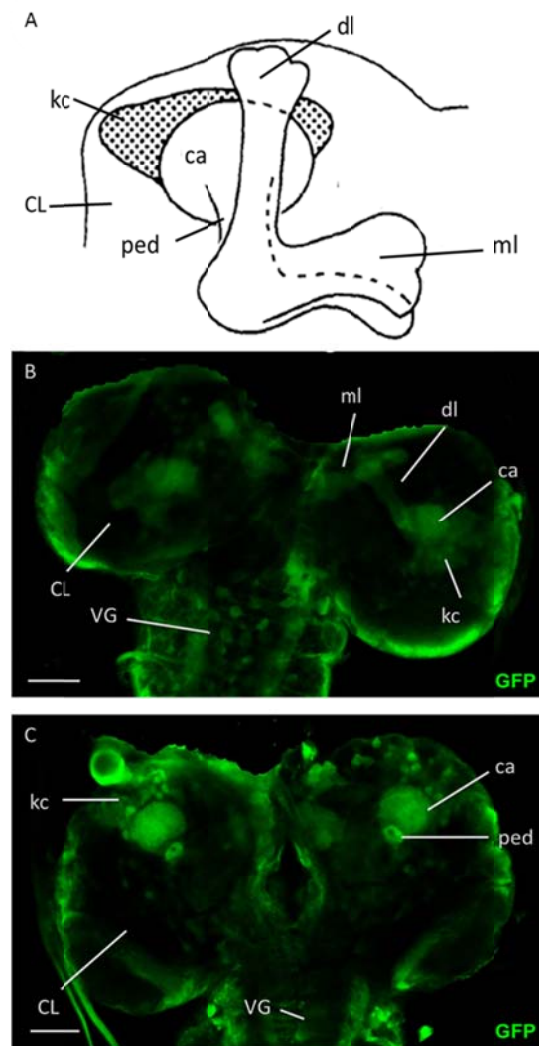


Abb. 6: Expressionsmuster der GAL4-Linie OK107-GAL4

A) Anatomisches Schema des Pilzkörpers. Frontale Darstellung des rechten Zentrallobus. Man sieht die dicht gepackten Kenyonzellen oberhalb und hinter der Kalyx. Dies ist ein dendritisches Feld, das u.a. Input erhält von den Projektionsneuronen des Antennallobus. Die KC-Axone laufen zusammen und bilden eine Art Stiel, den Pedunkel. Dieser teilt sich weiter frontal in dorsale und mediale Loben. (Yang et al., 1995. Lizenz erhalten 17.08.18) **B und C)** Z-Projektion der Gehirne zweier Larven im dritten Stadium mit dem Genotyp $w^{1118}; UAS-GFP/+; UAS-mcd8-GFP/+; OK107-GAL4/+$. GFP-Expression in den Pilzkörpern und im ventralen Ganglion detektierbar. Unspezifische Färbung ist aufgrund von Antikörper-Ansammlung am Geweberand erkennbar. **B)** Darstellung des Pilzkörpers mit Kalyx, Loben und Kenyonzellen. **C)** Darstellung der Kalyx und des Pedunkel. CL=Central Lobus, VG= Ventrales Ganglion, kc= Kenyonzellen, ca= Kalyx, dl= dorsaler Lobus, ml= medialer Lobus, ped= Pedunkel. Maßstab 25µm.

Das Grün-fluoreszierende-Protein (GFP) wird in den Kenyonzellen des Pilzkörpers unter dem GAL4-Treiber OK107 gut erkennbar exprimiert, wobei die Färbungen am Rande des larvalen Gehirns darauf zurückzuführen sind, dass Antikörper nicht ganz ins Gewebe eingedrungen sind.

Da die Expressionsstudie zeigt, dass die Treiberlinie OK107-GAL4 valide in den Pilzkörperneuronen exprimiert, wurde im Folgenden diese Linie verwendet, um genetische Konstrukte Aktiver Zonen Proteine dort zu treiben.

3.2 Die Rolle von Bruchpilot im olfaktorischen assoziativen Lernen von *Drosophila melanogaster* Larven

Bruchpilot ist integraler Bestandteil aktiver Zonen in *Drosophila melanogaster* und besitzt eine wichtige Bedeutung für deren funktionellen Aufbau. Demnach könnte BRP eine notwendige Rolle bei Lernvorgängen und Gedächtnisbildung einnehmen. Tatsächlich ist BRP bei adulten Fliegen in den Pilzkörper-Neuronen notwendig, damit diese ein wildtypisches mittelfristiges Gedächtnis durch olfaktorische Konditionierung bilden können (Knapek et al., 2011). Ob dies auch für das Kurzzeitgedächtnis von *Drosophila* Larven im Zuge appetitiver olfaktorischer Konditionierung zutrifft, ist Gegenstand dieser Arbeit. Hierzu wurden zunächst Larven im Paradigma getestet, in welchen das BRP-Proteinlevel mit Hilfe der RNAi-Methode in den Pilzkörperneuronen herunterreguliert worden war. Nachfolgend wurden die Experimente für heterozygote BRP-Nullmutanten durchgeführt.

3.2.1 Herunterregulierung von Bruchpilot mittels RNA-Interferenz

Mittels RNA-Interferenz gelingt es, die Umsetzung von mRNA in ein funktionsfähiges Protein zu unterbrechen, um so die Konzentration dieses Proteins in Zellen zu vermindern (Fire et al., 1998). Im Folgenden wurden Larven des Genotyps $w^{1118};;UAS-brp-RNAi^{B3C8}/OK107-GAL4$ im Paradigma des appetitiven olfaktorischen Lernens getestet. Zur Kontrolle eventueller Leckexpressionen durch das UAS-Konstrukt sowie potentieller Effekte der genetischen Insertionen wurden zusätzlich Larven des Genotyps $w^{1118};;UAS-brp-RNAi^{B3C8}$ (Wagh et al., 2006) und Larven der GAL4-Linie $w^{1118};;OK107-GAL4$ getestet. Zur Beurteilung der Experimentbedingungen wurden außerdem

Larven, die dem genetischen Hintergrund der verwendeten Genotypen (w^{1118}) entsprechen, getestet. Die Auswahl der Kontrollgruppen wurde in allen nachfolgenden Experimenten, entsprechend angepasst.

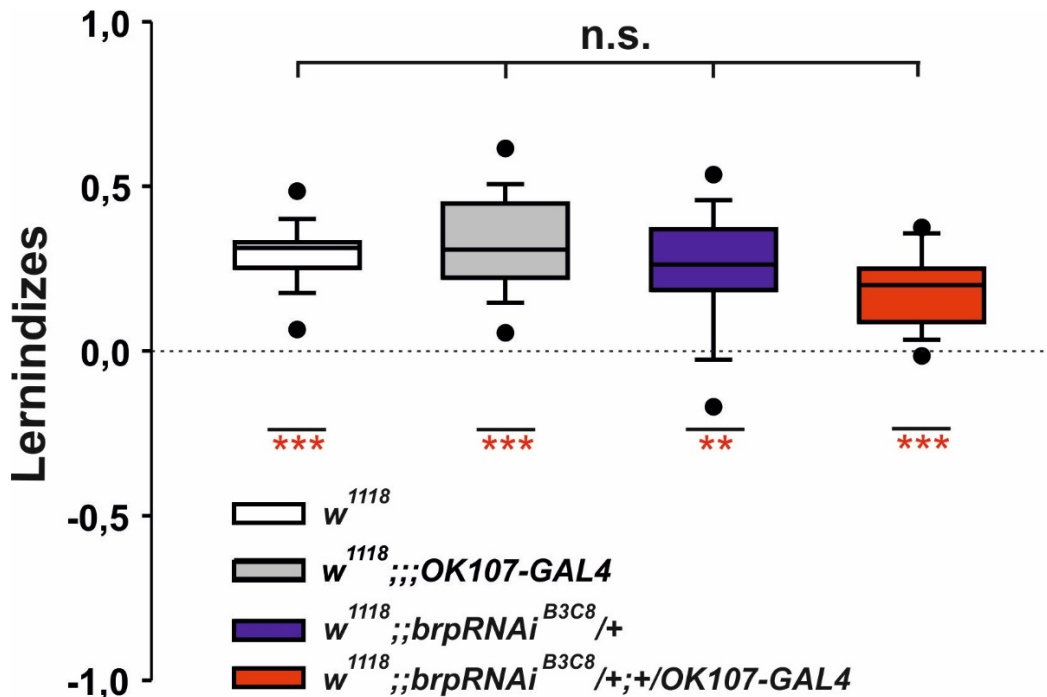


Abb. 7: Assoziatives Lernen unter Herunterregulierung der BRP-Menge in OK107-positiven Pilzkörperneuronen via RNAi

RNAi vermittelte Runterregulierung der BRP-Menge in den Pilzkörperneuronen rief keine signifikante Alteration des assoziativen Lernens hervor (Kruskal-Wallis Test: $H=6,364$, 3 Freiheitsgrade, $p=0,095$), $N(\text{pro Gruppe})=12$. Larven aller drei Genotypen wiesen positives Lernverhalten auf, da ihre Lernindizes signifikant verschieden von 0,0 waren (One Sample Signed Rank Test, $p(w^{1118}) < 0,001$; $p(OK107-GAL4) < 0,001$; $p(brp-RNAi^{B3C8}) = 0,001$; $p(brp-RNAi^{B3C8};OK107-GAL4) < 0,001$).

Die Herunterregulierung des BRP-Levels in den Pilzkörpern durch Expression des RNAi-Konstruktes $UAS-brp-RNAi^{B3C8}$ beeinträchtigte das larvale Lernen nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $H = 6,364$; 3 Freiheitsgrade; $p = 0,095$; $N(\text{pro Gruppe}) = 12$). Auch Vergleiche der gruppenspezifischen Lernleistungen gegen Null zeigten, dass die Larven aller Gruppen fähig waren, assoziativ zu

lernen (One Sample Signed Rank Test: $p(w^{1118}) < 0,001$; $p(OK107-GAL4) < 0,001$; $p(brpRNAi^{B3C8}) = 0,001$; $p(brpRNAi^{B3C8};OK107-GAL4) < 0,001$) (Abb. 7).

Dies könnte zum einen bedeuten, dass BRP nicht notwendig für das appetitive olfaktorische Lernen in *Drosophila melanogaster* Larven ist oder, dass die Menge eventuell verbleibenden BRP's in den Pilzkörperneuronen ausreicht, um zu lernen.

Um zu überprüfen, ob das *brp-RNAi*-Konstrukt potent genug ist, BRP-Level in Zellen ausreichend stark herunter zu regulieren, wurden Fliegen der entsprechenden UAS-Linie mit *Actin5C-GAL4*-Fliegen gekreuzt. Dieser Enhancer bedingt die Expression des GAL4 Transkriptionsfaktors in allen Zellen, nicht nur im Pilzkörper, da Aktin, als Bestandteil des Zytoskeletts, in allen Organismuszellen vorhanden ist. 13 Tage nach Eiablage überlebten keine der adulten Fliegen mit dem Genotypen *UAS-brp-RNAi^{B3C8}/Actin 5C-GAL4*, sondern starben nach dem dritten Larvenstadium. Nur einzelne erreichten das Puppenstadium, aber schlüpfen nicht. Daraus konnte man schließen, dass die verwendete RNAi-Linie potent ist, BRP allerdings erst ab dem dritten larvalen Stadium für die Entwicklung der Fliege unverzichtbar zu sein scheint.

3.2.2 Verstärkung von *dicer2*

Da das Lern-Verhalten der *brp-RNAi*-Fliegen nicht eindeutig auf eine schwächere Lernleistung hinwies, wurde versucht, die Effektivität dieser Linie noch weiter zu stärken. Hierzu wurde die Linie *w¹¹¹⁸;UAS-dicer2;mb247-GAL4* verwendet. Dicer ist ein RNase-Enzym, welches die Spaltung der mRNA fördert oder ihre Translation blockiert (Lee et al., 2004). Auf diese Weise wurde versucht, die Lernfähigkeit der Larven noch weiter einzuschränken. Diesmal wurde das Konstrukt aber unter einem anderen Enhancer (*mb247-GAL4*) exprimiert. Ob die Expressionsmuster der *OK107-GAL4* Treiberlinie und der *mb247-Linie* deckungsgleich sind, ist unbekannt. Wie *OK107-GAL4* treibt *mb247-GAL4* aber in allen basalen Pilzkörperkomponenten: Kalyx, Pedunkel und Loben und umfasst ca. 300 larvale Pilzkörperzellen (Michels et al., 2011). Die *mb247-GAL4*-Treiberlinie wurde in früheren Studien bereits erfolgreich

verwendet, um assoziatives Lernen zu untersuchen (Zars et al., 2000; Krashes et al., 2007; Aso et al., 2009).

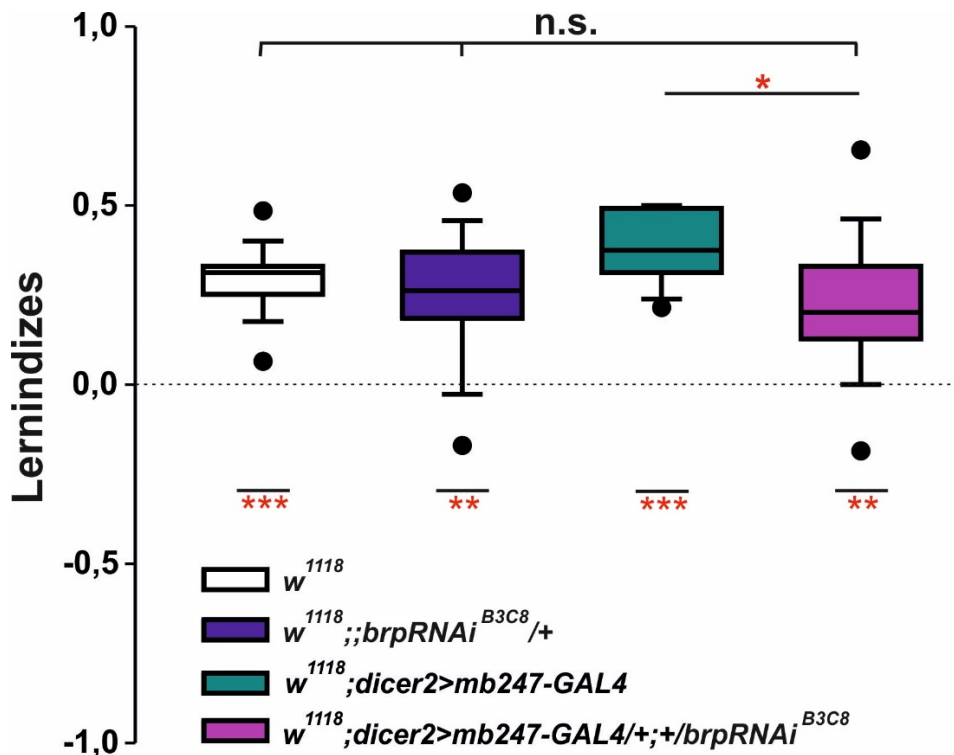


Abb. 8: Assoziatives Lernen unter Verstärkung des RNAi-Effekts mittels Dicer auf das BRP-Level in Pilzkörperneuronen

Die verstärkte RNAi-vermittelte Herunterregulierung der BRP-Menge in den Pilzkörperneuronen rief keine signifikante Alteration des assoziativen Lernens hervor (Kruskal-Wallis Test $H = 6,945$; 2 Freiheitsgrade, $p = 0,031$), $N(\text{pro Gruppe}) = 12$. Larven aller drei Genotypen wiesen positives Lernverhalten auf, da ihre Lernindizes signifikant verschieden von 0,0 waren (One Sample Signed Rank Test: $p(w^{1118}) < 0,001$; $p(w^{1118};brpRNAi^{B3C8}) = 0,001$; $p(w^{1118};dicer2>mb247/+)$ $< 0,001$; $p(w^{1118};dicer2>mb247-GAL4/+;+/brpRNAi^{B3C8}) = 0,007$.

Dementsprechend wurde als nächstes $brp-RNAi^{B3C8}$ unter Kontrolle des $mb247-GAL4$ -Treibers und Verwendung von $dicer$ in den Pilzkörperneuronen exprimiert und die Larven im assoziativen Lernen getestet. Vergleich man die LI's aller Gruppen untereinander, zeigte sich ein signifikanter Unterschied

(Kruskal-Wallis Test: $H = 8,153$; 3 Freiheitsgrade; $p = 0,043$; $N(\text{pro Gruppe}) = 12$), wobei sich die experimentelle Gruppe ($w^{1118};dicer2>mb247-GAL4/+;brp-RNAi^{B3C8}/+$) ausschließlich von der Treiberkontrolle ($w^{1118};dicer2>mb247-GAL4/+$) (Mann-Whitney U-Test: $U = 30,5$; $T = 191,5$; $p = 0,018$; $N(\text{pro Gruppe}) = 12$) und nicht von den anderen Kontrollgruppen (Kruskal-Wallis Test: $H = 1,308$; 2 Freiheitsgrade; $p = 0,520$; $N(\text{pro Gruppe}) = 12$) signifikant unterschied (Abb. 8). Außerdem wiesen alle getesteten Genotypen ein funktionierendes assoziatives Lernverhalten auf, da ihre LI's signifikant von Null verschieden waren (One-Sample Signed Rank Test: $p(w^{1118}) < 0,001$; $p(w^{1118};brp-RNAi^{B3C8}) = 0,001$; $p(w^{1118};dicer2>mb247/+) < 0,001$; $p(w^{1118};dicer2>mb247-GAL4/+;+brpRNAi^{B3C8}) = 0,007$).

Insgesamt lässt also sich für die unmittelbare Herunterregulierung von BRP mittels RNAi weder in den OK107-, noch in den mb247-positiven Pilzkörperneuronen ein signifikanter Effekt auf das zuckerbelohnte assoziative Lernverhalten feststellen. Dass die Treiberkontrolle, im Verhältnis zu den anderen beiden Kontrollen (w^{1118} und $w^{1118};brp-RNAi^{B3C8}/+$), insgesamt positivere LI's aufweist, könnte ein vermindertes Lernverhalten der experimentellen Gruppe verschleiern und so den Effekt mindern.

3.2.3 BRP-Nullmutante

Da man bei der Expression des RNAi-Konstruktes die genaue Rest-Menge des Proteins nicht kennt, wäre es interessant, das assoziative Lernverhalten in Larven zu beobachten, die komplett BRP-depriviert sind. Homozygote Bruchpilot Nullmutanten ($brp^{69}/dfbc29$) erreichen zwar das Larvenstadium, allerdings in relativ geringer Anzahl und eingeschränkter Vitalität (Kittel et al., 2006). Deswegen wurde für die larvalen Lernversuche eine heterozygote Bruchpilot-Nullmutante $w^{1118};brp^{69}/CyP,wGFP$ verwendet und mit w^{1118} -Jungfrauen gekreuzt, um die Balancer und Marker zu entfernen.

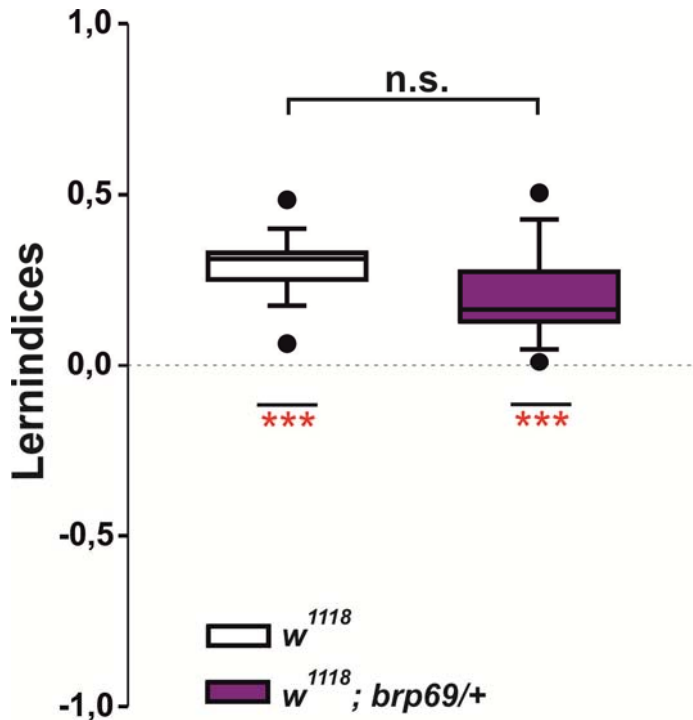


Abb. 9: Assoziatives Lernen der heterozygoten BRP-Nullmutante

Das assoziative Lernverhalten der heterozygoten BRP-Nullmutante war nicht signifikant verschieden von der w^{1118} -Kontrollgruppe ($p = 0,057$; $T = 183,5$; $N(\text{pro Genotyp}) = 12$). Beide Gruppen zeigten von Null signifikant verschiedene LI's und sind demnach in der Lage ein assoziatives Gedächtnis auszubilden.

Das olfaktorische appetitive Lernverhalten der heterozygoten BRP-Nullmutanten Larven war nicht signifikant verschieden von der w^{1118} -Kontrollgruppe ($p = 0,057$; $T = 183,5$; $N(\text{pro Genotyp}) = 12$). Auch der Vergleich gegen Null zeigte, dass beide Larven-Gruppen zu assoziativem Lernverhalten fähig sind (One Sample Signed Rank Test: $p(\text{pro Gruppe}) < 0,001$) (Abb. 9).

3.2.4 Präferenztest

Im Verlauf der Verhaltensexperimente erhob sich der Verdacht, dass die BRP-Mutanten eventuell eine angeborene Vorliebe für AM gegenüber Oct haben. Aus diesem Grund wurden Präferenztests für w^{1118} -, $brp\text{-RNAi}^{B3C8}$ - und brp^{69} -Larven durchgeführt. Dafür wurden die verwendeten Düfte (Oct und AM) ohne Verstärker präsentiert und nach 3 Minuten ausgezählt, wie viele Larven sich auf der jeweiligen Duftseite befanden. Würde eine Präferenz für einen der beiden

Düfte vorliegen, sollte diese Seite bevorzugt werden. Dabei würden Werte der $PREF_{ind}$'s von +1 auf einer absolute Vorliebe der Larven von AM gegenüber Oct sprechen, d.h. 100 % der Tiere würden sich nach 3 Minuten auf der AM-Seite befinden. Im Gegenzug würden Werte der $PREF_{ind}$'s von -1 bedeuten, dass die Larven Oct gegenüber AM bevorzugen. Schwanken die Werte um Null, haben die Larven keine Präferenz für einen der dargebotenen Düfte (Abb. 10). Wie in den Lernversuchen wurde Oct unverdünnt und AM in Paraffinöl (Verdünnung 1:100) verwendet.

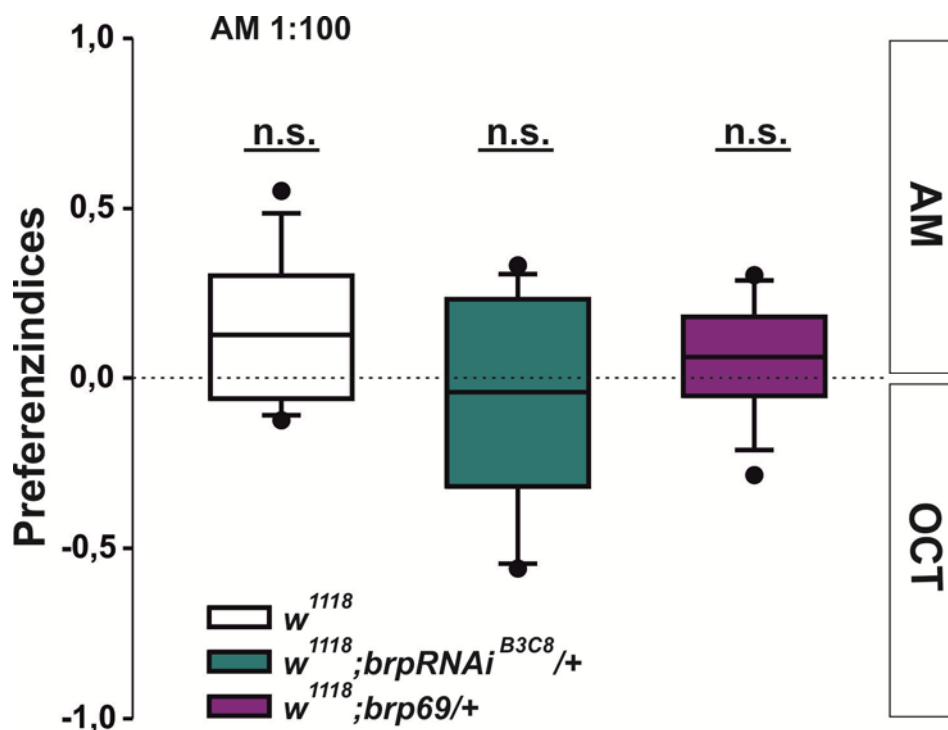


Abb. 10: Präferenztests der $brp-RNAi^{B3C8}$ - und Nullmutanten-Larven für Amylacetat vs. Octanol

Das assoziative Lernverhalten der Larven zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Präferenz für Amylacetat oder Octanol, da die gruppenspezifischen Lernleistungen nicht signifikant verschieden von Null waren (One Sample Signed Rank Test: $p(w^{1118}) = 0,109$; $N = 8$; $p(brp-RNAi^{B3C8}) = 0,652$; $N = 9$; $p(brp^{69}) = 0,426$; $N = 9$).

Der Präferenztest zeigte, dass keiner der getesteten Genotypen einen der dargebotenen Düfte signifikant bevorzugt (One Sample Signed Rank Test: $p(w^{1118}) = 0,109$; $N = 8$; $p(brp-RNAi^{B3C8}) = 0,652$; $N = 9$; $p(brp^{69}) = 0,426$; $N = 9$).

Zusammenfassend scheint Bruchpilot nicht notwendig für das olfaktorische Lernen in der Larve zu sein. Nichtsdestotrotz ist es, für die Entwicklung der larvalen Tiere zu Imagos von Bedeutung. Die *brp-RNAi^{B3C8}*- und *brp⁶⁹*-Mutation dieses Proteins führt nicht zu einer signifikant geringeren Lernperformance, oder verändert die Präferenzeigenschaften für einen der beiden Düfte.

3.3 Die Überexpression von RIM-Punktmutationen hat keinen Einfluss auf das larvale olfaktorische Lernen

Sisodiya und Kollegen haben 2007 eine Arbeit veröffentlicht, indem sie verschiedene Mitglieder einer Familie im Hinblick auf verbale Intelligenz untersucht haben (Sisodiya et al., 2007). Diese Familie ist von einer Form der Zapfen- und Stäbchen-Dystrophie betroffen, der CORD7-Mutation (cone rod dystrophy type 7). Allgemein ist die Zapfen- und Stäbchen-Dystrophie eine heterogene Gruppe hereditärer Pigmentretinopathien bei der es zunächst zu Farbsinnesstörungen, Photophobie und schließlich zur Einschränkung des Sehvermögens kommt. Besonders betroffen ist hiervon die Makula, der Ort des schärfsten Sehens, denn hier ist die Zapfen-Dichte am höchsten (Hamel, 2007). Sisodiya et al. haben einen interessanten Zusammenhang aufgezeigt: Sie stellten fest, dass Mitglieder dieser Familie mit der CORD7-Mutation zwar im Laufe ihres Lebens erblinden, aber gleichzeitig eine höhere verbale Intelligenz aufweisen, als ihre gesunden Verwandten (Sisodiya et al., 2007). Genetisch liegt dieser speziellen Form der Zapfen- und Stäbchen-Dystrophie eine Punktmutation im *rim1*-Gen zugrunde. Diese sog. CORD7-Mutation hat zur Folge, dass im RIM1-Protein in der C₂A-Domäne ein Arginin gegen ein Histidin ausgetauscht wird (Abb. 11).

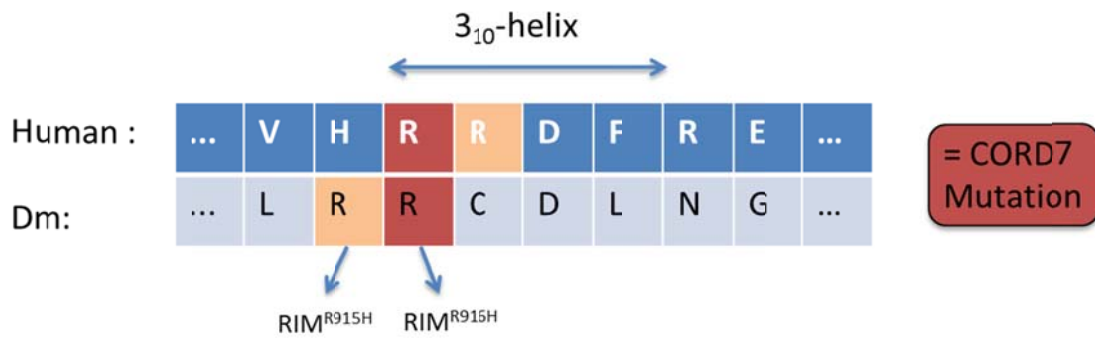


Abb. 11: CORD7- Mutation

Ausschnitt aus der C₂A-Domäne von Mensch und *Drosophila* (Dm). Die CORD7- Mutation im Mensch ist rot hinterlegt. Die anzunehmende Stelle der Mutation in Dm wäre das zweite Arginin (rot) in Dm (R916H). Allerdings kommt es zu einer Rasterverschiebung, sodass auch das erste Arginin (orange, R915H), der Mutation im Menschen entsprechen könnte. V=Valin, H=Histidin, R=Arginin, D=Asparaginsäure, F=Phenylalanin, E=Glutaminsäure, L=Leucin, C=Cystein, N=Asparagin, G=Glycin (nach Paul 2014).

In Anlehnung an die Arbeit von Sisodiya et al. 2007 wurde nun geprüft, ob diese Punktmutation im *rim*-Gen an der zentralen *Drosophila*-Synapse Einfluss auf die synaptische Plastizität hat und, ob *Drosophila*-Larven mit diesem Aminosäure-Austausch eine gesteigerte assoziative Lernfähigkeit aufweisen. Da aber der genetische Code zwischen *Homo sapiens* und *Drosophila melanogaster* hier gegeneinander verschoben ist und an dieser Stelle zwei Arginin hintereinander auftreten, gibt es zwei mögliche Lokalisationen der Punktmutation in *Drosophila* (Abb. 11). Im Paradigma des assoziativen olfaktorischen Lernens wurden deshalb Larven mit einer Überexpression des Wildtyp-RIM's (RIM^{wt}), einer Punktmutation an der ersten möglichen (RIM^{915H}) und der zweiten denkbaren Stelle (RIM^{916H}) sowie mit einer Kombination beider Mutationsstellen ($RIM^{915H,916H}$) getestet. Dafür wurden die genetischen Konstrukte wieder im Pilzkörper (OK107-GAL4) getrieben.

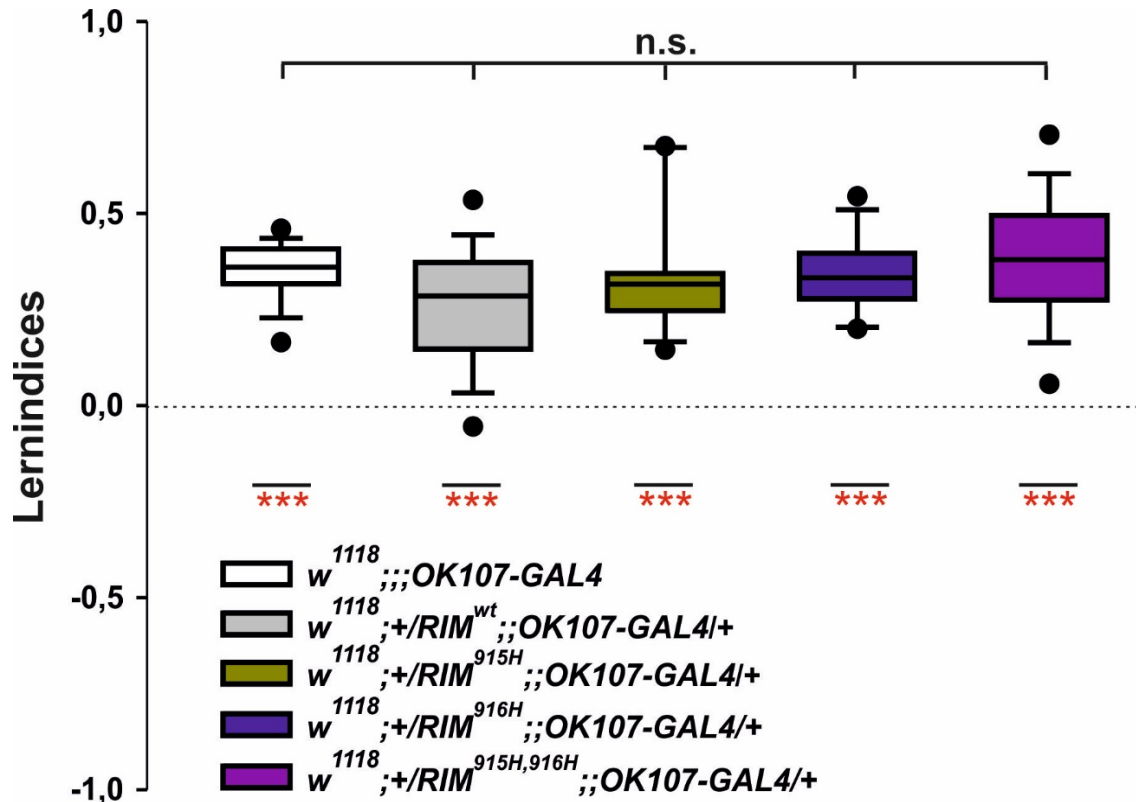


Abb. 12: Assoziatives Lernen unter von Larven mit Überexpression von RIM-Punktmutationen in der C₂A-Domäne

Weder die Überexpression einzelner Punktmutationen der C₂A-Domäne von *rim* (RIM^{915H} , RIM^{916H}), noch deren Kombination ($RIM^{915H,916H}$) führte zu einer Änderung der larvalen Lernfähigkeit verglichen mit der Lernfähigkeit nach Überexpression des Wildtyp-RIMs (RIM^{wt}) und der Treiberkontrolle (*OK107-GAL4*) (Kruskal-Wallis Test: $H = 4,587$; 4 Freiheitsgrade; $p = 0,33$; $N(\text{pro Genotyp}) = 12$). Alle Genotypen zeigten statistisch hoch signifikantes assoziatives Lernen (One Sampled Signed Rank Test gegen Null: $p(\text{pro Gruppe}) < 0,001$). Die LI-Mediane der einzelnen Gruppen betragen bei $w^{1118};;OK107-GAL4 = 0,36$; bei $RIM^{wt} = 0,29$; bei $RIM^{915H} = 0,32$; bei $RIM^{916H} = 0,33$; bei $RIM^{915H,916H} = 0,38$.

Alle getesteten Larvengruppen zeigten positives assoziatives Lernverhalten, da ihre LI's signifikant verschiedenen von Null waren (One Sample Rank Sum Test, $p(\text{pro Gruppe}) < 0,001$). Außerdem konnte zwischen der Kontrollgruppe $w^{1118};;OK107$ und den anderen vier experimentellen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test: $H = 4,587$; 4 Freiheitsgrade; $p = 0,332$; $N(\text{pro Genotyp}) = 12$) (Abb. 12).

Die Punktmutation von *rim* in der C₂A-Domäne oder eine Überexpression des Wildtyp-RIM in den larvalen Pilzkörpern führten nicht zu einer signifikanten Zunahme im assoziativen olfaktorischen Lernverhalten.

3.4 Fife scheint notwendig für olfaktorisches Lernen zu sein

Das Protein Fife wurde bei der genaueren Untersuchung der Piccolo-PDZ-Domäne in der *Drosophila* entdeckt (Bruckner et al., 2012). Dabei wurde eine Gen-Sequenz gefunden, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Zinkfinger (ZF) - und PDZ-Domäne von Piccolo hat. Bei der weiteren Untersuchung, entdeckte man zwei weitere Gene mit einer Sequenzähnlichkeit zu den C-terminalen C₂A- und C₂B-Domänen, wie die der RIM-Piccolo-Proteine. Es wurde gezeigt, dass es sich hierbei um ein einzelnes Transkript handelt, das für ein Protein kodiert, das große Ähnlichkeit mit den Piccolo- und RIM- Proteinen hat.

Fife enthält die wichtigsten Domänen der Piccolo-RIM-Familie: Zinkfinger (ZF), PDZ, C₂A und C₂B (Abb. 13). Allerdings fehlt die Coil-Coil-Domäne (CC) von Piccolo. Da Fife jedoch an der Aktiven Zone mit Bruchpilot kolokalisiert auftritt, könnte man sich vorstellen, dass Fife die Funktion der CC-Domäne in *Drosophila* an Bruchpilot abgegeben hat. Denn hier hat BRP eine viel größere CC-Sequenz als sein vertebrales Ortholog ELKS/CAST. Der evolutionäre Druck für Fife die CC-Domäne zu behalten, wurde eventuell aufgegeben, weil Bruchpilot diese Rolle übernommen hat. Eine eindeutige Zuordnung war strukturell bisher nicht möglich (Bruckner et al., 2012).



Abb. 13: Interaktionsdomänen von Fife 1 (Isoform 1)

Die Fife Isoform 1 weist vier Strukturdomänen auf: Die N-terminale Zinkfinger-Region (Zn), die zentrale PDZ- und C₂A-Domäne und die C-terminale C₂B-Domäne. Alternativen Isoformen fehlt entweder die C₂B-Domäne (Isoform 2) oder beide C₂-Regionen (modifiziert nach Bruckner et al., 2012).

Fife scheint für eine normale Entwicklung der Aktiven Zone oder ihren prinzipiellen Aufbau keine Rolle zu spielen. Man konnte aber nachweisen, dass die Architektur Aktiver Zonen in *fife*-Mutanten verändert ist. Es wurden Unterbrechungen und Aufrauungen an der präsynaptischen Membran gefunden, sowie eine Trennung von prä- und postsynaptischer Membran. Das könnte auch ein Grund sein, warum die Gruppierung der Vesikel um 20% geringer, als bei Wildtypen ausfällt. Auch an der neuromuskulären Endplatte konnten verringerte Transmitter-Freisetzung und eingeschränkte Exozytose nachgewiesen werden. Kürzlich wurde die These aufgestellt, dass Fife Interaktion zwischen gedockten Vesikel und anderen Proteinen der CAZ steuert, vermutlich durch eine Wechselwirkung mit RIM. Diese molekularen Veränderungen an der Aktiven Zone haben sich auch im Verhalten der *fife*-Mutanten wiedergespiegelt. Das motorische Verhalten ist um 60% niedriger und auch lokomotorische zeigten die Fliegen Einschränkungen (Bruckner et al., 2012; Bruckner et al., 2017).

3.4.1 Fife-RNAi

Getestet wurden Larven im dritten Stadium, bei denen das Konzentrationslevel von Fife mit Hilfe der RNAi-Methode herabgesetzt wurde. Zum Vergleich wurden die Kontrollgruppen der Genotypen w^{1118} , *OK107-GAL4* und *UAS-fife-RNAi* herangezogen.

Beim Vergleich der LI's aller getesteten Genotypen untereinander zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied in der assoziativen Lernfähigkeit (Kruskal-Wallis Test: $H = 18,784$, 3 Freiheitsgrade, $p < 0,001$, $N(\text{pro Gruppe}) = 12$) (Abb. 14). Die Kontrollgruppen unterschieden sich zwar signifikant voneinander (Kruskal-Wallis Test: $H = 7,096$; 2 Freiheitsgrade; $p = 0,029$), was vermutlich durch Leckexpression des UAS-Konstruktes oder einem Insertionsphänotyp desselbigen bedingt ist, aber alle Kontrollgruppen wiesen von Null hoch signifikant verschiedene Lis auf (One Sampled Signed Rank Test, $p(\text{pro Kontrollgruppe}) < 0,0001$).

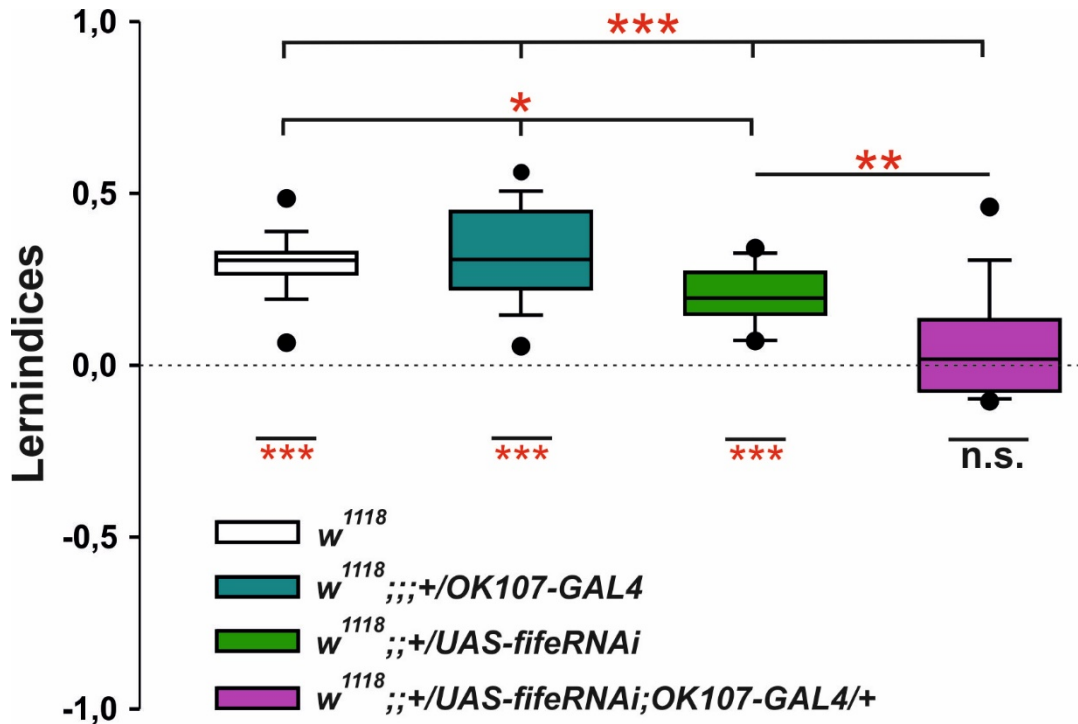


Abb. 14: Assoziatives Lernen unter Verminderung von Fife mittels RNAi

Die LI's aller getesteten Genotypen wiesen einen höchstsignifikanten Unterschied in der assoziativen Lernfähigkeit auf (Kruskall-Wallis Test: $H = 18,784$; 3 Freiheitsgrade; $p < 0,001$, $N(\text{pro Gruppe}) = 12$). Kontrollgruppen unterschieden sich zwar signifikant voneinander (Kruskal-Wallis Test: $H = 7,096$; 2 Freiheitsgrade; $p = 0,029$), aber alle Kontrollgruppen wiesen von Null hoch signifikant verschiedene LIs auf (One Sampled Signed Rank Test, $p(w^{1118}) < 0,0001$; $p(w^{1118};;+ / OK107-GAL4) < 0,001$; $p(w^{1118};;+ / UAS-fife-RNAi) < 0,001$). Im Gegensatz dazu waren die LIs der Larven der experimentellen Gruppe nicht signifikant verschieden von Null (One Sampled Signed Rank Test, $p(w^{1118};;+ / UAS-fife-RNAi; OK107-GAL4/+) = 0,424$) und hoch signifikant verschieden von denen der UAS-Kontrolle (Mann Whitney U Test: $U = 25,5$; $T = 196,5$; $p = 0,008$).

Demzufolge waren die Larven aller drei Kontrollgenotypen in der Lage ein olfaktorisches assoziatives Gedächtnis auszubilden. Im Gegensatz dazu waren Larven der experimentellen Gruppe nicht in der Lage assoziativ zu lernen (One Sampled Signed Rank Test, $p(w^{1118};;+ / UAS-fife-RNAi; OK107-GAL4/+) = 0,424$) und ihre Lernfähigkeit unterschied sich hoch signifikant von der der Kontrollgruppen (Mann Whitney U Test: $U = 25,5$; $T = 196,5$; $p = 0,008$).

Da die UAS-*fife*-RNAi-Linie nachgewiesenermaßen keine Off-Targets hat (Vienna Drosophila Resource Center, URL: http://stockcenter.vdrc.at/control/product/~VIEW_INDEX=0/~VIEW_SIZE=100/~product_id=103267; 12.01.17), ist davon auszugehen, dass die hoch signifikant eingeschränkte Lernfähigkeit der experimentellen Larvengruppe durch das verminderte Fife-Level in den Pilzkörperneuronen zu erklären ist. Dies zeigt, dass das erst kürzlich entdeckte Protein Fife notwendig für das olfaktorische assoziative Lernen von *Drosophila melanogaster* Larven ist.

3.4.2 *fife*-Nullmutante

Weil man auch bei dem Fife-RNAi-Konstrukt die Rest-Menge des Proteins in den Zellen nicht ganz klar ist, wurden im nächsten Schritt Larven mit einer Nullmutante von *fife* im Paradigma des olfaktorischen assoziativen Lernens geprüft. Hierzu wurden eine homozygote ($w^{1118};;fife^{ex1027}/fife^{ex1027}$) und eine heterozygote Nullmutante ($w^{1118};;fife^{ex1027}/+$) von *fife* verwendet. Für die Heterozygotie wurden Jungfrauen des homozygoten Stammes mit w^{1118} -Männchen gekreuzt.

Alle getesteten Gruppen wiesen von Null höchst signifikant verschiedene LI's (One Sample Signed Rank Test: $p(\text{alle Genotypen}) < 0,001$) und somit positives assoziatives Lernverhalten auf. Dabei unterschieden sich auch die einzelnen Genotypen nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis Test: $H=5,123$; 2 Freiheitsgrade; $p = 0,077$; $N(w^{1118}) = 12$; $N(w^{1118};;fife^{ex1027}/+) = 8$; $N(w^{1118};;fife^{ex1027}/fife^{ex1027}) = 9$) (Abb. 15). Sowohl die homozygoten, also auch die heterozygoten *fife*-Nullmutanten-Larven wiesen keine Einschränkung im olfaktorischen assoziativen Lernen auf, dies könnte darin begründet sein, dass das absolute Fehlen von Fife in den Neuronen zu einer Art Kompensationsmechanismus im Laufe der Entwicklung geführt hat.

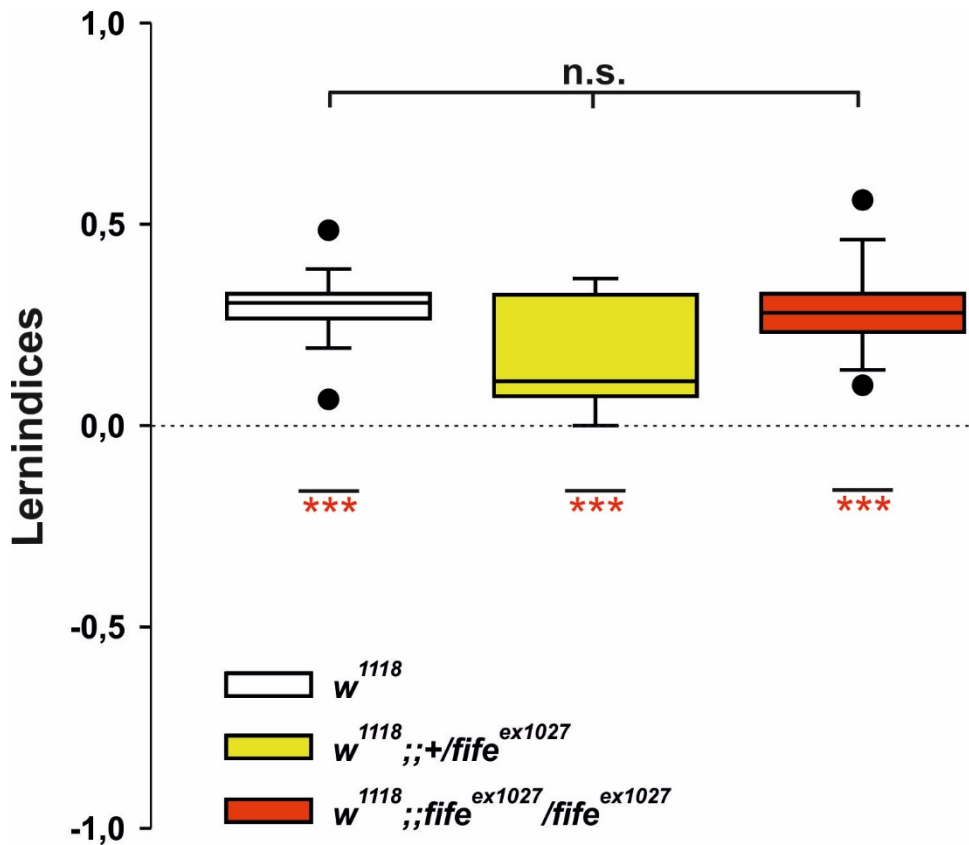


Abb. 15: Assoziatives Lernen der heterozygoten und homozygoten *fife*-Nullmutante

Larven, die heterozygot oder homozygot nullmutant für das *fife*-Gen waren, zeigten keine Alteration der Lernfähigkeit. (Kruskal-Wallis Test: $H = 5,123$; 2 Freiheitsgrade; $p = 0,077$; $N(w^{1118}) = 12$; $N(w^{1118};;+/fife^{ex1027}) = 8$; $N(w^{1118};;fife^{ex1027}/fife^{ex1027}) = 9$). Beim Vergleich gegen Null wiesen alle Genotypen höchst signifikante Verteilung ihrer LI's auf (One Sampled Signed Rank Test: $p(\text{alle Gruppen}) < 0,001$)

Bei den RNAi-Larven hingegen, ist nicht ganz klar, wann in die Fife-Homöostase eingegriffen wird. Allerdings ist hierbei noch ein Rest an Protein vorhanden, sodass eventuell die alternative Maschinerie erst gar nicht in Gang gesetzt wird. Alle Ergebnisse zusammengenommen scheinen darauf hin zu deuten, dass Fife eine akute Rolle beim larvalen olfaktorischen Lernen einnimmt und, dass ein vollständiges Fehlen des Proteins durch kompensatorische Mechanismen ausgeglichen wird.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Proteine der Aktiven Zone herausgegriffen und ihre Bedeutung bei der präsynaptischen Plastizität im Gehirn geprüft. Um diese Fragestellung zu verfolgen, wurde das einfache aber dennoch repräsentative System der *Drosophila melanogaster* Larve zur Hilfe genommen. Es wurde geprüft, ob und wie sich spezifische genetische Manipulationen der Proteine Bruchpilot, RIM und Fife in Pilzkörperneuronen auf ihre Funktion im olfaktorischen appetitiven Lernverhalten der Larven auswirken. Die Phänotypen der Bruchpilot- und RIM-Mutanten zeigten dabei keine signifikanten Beeinträchtigungen im Lernverhalten der Geruchskonditionierung. Wohingegen man bei der Reduzierung von Fife in den Pilzkörperneuronen mittels RNAi, feststellen konnte, dass ihre Lernfähigkeit im Vergleich mit den Kontrollgruppen signifikant vermindert war. Erstaunlicherweise ließ sich dieser Sachverhalt in der Fife-Nullmutante nicht reproduzieren.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Veränderung einzelner Proteine Aktiver Zonen derartig komplexe Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung beeinflussen kann? Wo findet Plastizität und Lernen überhaupt statt? Und wie wirkt sich die Veränderung der Struktur eines Proteins auf seine Funktion aus? Im Folgenden sollen diese Fragestellungen im Kontext der aktuellen Forschungslage betrachtet und die Ergebnisse dieser Dissertation damit in Zusammenhang gebracht werden.

4.1 Synaptische Plastizität als Grundlage für Lernprozesse im olfaktorischen Pfad

Die synaptische Plastizität wird als Grundlage für jedwede Form von Lernvorgängen gesehen, so auch für das assoziative Lernen, bei dem eine Verknüpfung zwischen zwei wahrgenommenen Ereignissen hergestellt wird, wodurch in den dazugehörigen Synapsen aktivitätsabhängige Adaptionen hervorgerufen werden (Lechner und Byrne, 1996; Martin et al., 2000). Das olfaktorische Lernen, bei dem die Fliege lernen soll, einen Geruch mit einer gleichzeitig auftretenden gustatorischen Belohnung zu koppeln, ist ein Beispiel für solch eine Lernform (Gerber und Stocker, 2007). Das in dieser Arbeit

verwendete Paradigma des appetitiven olfaktorischen Lernens hat sich bereits in der Vergangenheit bewiesen, um assoziatives Lernverhalten in *Drosophila* Larven erfolgreich zu prüfen (Scherer et al., 2003; Hendel et al., 2005; Neuser et al., 2005; Michels et al., 2005).

4.1.1 Pilzkörper ausreichend und notwendig für olfaktorisches Lernen

Seit der Pilzkörper bei Insekten 1850 das erste Mal beschrieben wurde, barg er großes Potenzial für die Neurowissenschaften. Diese paarige Struktur mit ihren 2500 Kenyonzellen in der Fliege ist der Sitz der synaptischen Plastizität bei assoziativem Lernen von olfaktorischen Stimuli (Gerber et al., 2004; Heisenberg, 2003; Wang et al., 2008).

Unterdrückt man beispielsweise die synaptische Transmission während des Lernvorgangs und der Speicherung zwischen Kenyonzelle und ihrem Ausgangsneuron, und erlaubt sie nur beim Abruf dieser Information, bleibt das olfaktorische Gedächtnis unbeeinflusst (Dubnau et al., 2001; McGuire et al., 2001). Das deutet darauf hin, dass die Kenyonzelle durchaus selbständig in der Lage ist, sich plastisch zu verändern, sodass Lernen stattfinden kann. Zunächst geschieht dies ohne Kommunikation mit anderen Zellen. Es bedeutet aber auch, dass später bei der Abfrage der Information die Kenyonzell-Ausgangsneurone durchaus benötigt werden, um konditioniertes Verhalten zu erzeugen (Schwaerzel et al., 2002; Krashes et al., 2007). Darüber hinaus konnte man feststellen, dass die appetitive olfaktorische Gedächtnisbildung auf embryonal gebildeten Kenyonzellen beruht und dass diese ausreichend sind für adäquates Lernverhalten in der Larve (Pauls et al., 2010). Dies bedeutet, dass in der Larve alle Strukturen vorhanden sind, um olfaktorisches Lernen zu provozieren. Nimmt man noch hinzu, dass das Geruchssystem in der Larve dem der Adulten zwar sehr ähnlich, aber viel simpler strukturiert ist, scheint es verständlich, dass man sich die komplexen Vorgänge der Gedächtnisbildung in dem einfacheren System anschaut. So findet bei der Larve von den 21 olfaktorischen Rezeptorneuronen über die 21 Antennalglomeruli bis zu den 21 Projektionsneuronen, eine 1:1:1 Übertragung statt (Ramaekers et al., 2005).

Wobei man wenig Redundanz oder Divergenz bzw. Konvergenz feststellen kann.

Alles scheint darauf hin zu deuten, dass die Kenyonzelle des Pilzkörpers der Ort der Gedächtnisbildung ist. Man geht davon aus, dass dort die beiden Vorgänge (CS und US) über synaptische Plastizität miteinander verknüpft werden, wobei die Adenylatzyklase als Koinzidenzdetektor zu fungieren scheint und so spezifische Veränderungen in der Zelle hervorgerufen werden, welche dann im Testversuch in konditioniertem Verhalten resultieren (Abb. 16) (Gerber et al., 2004; Zars et al., 2000).

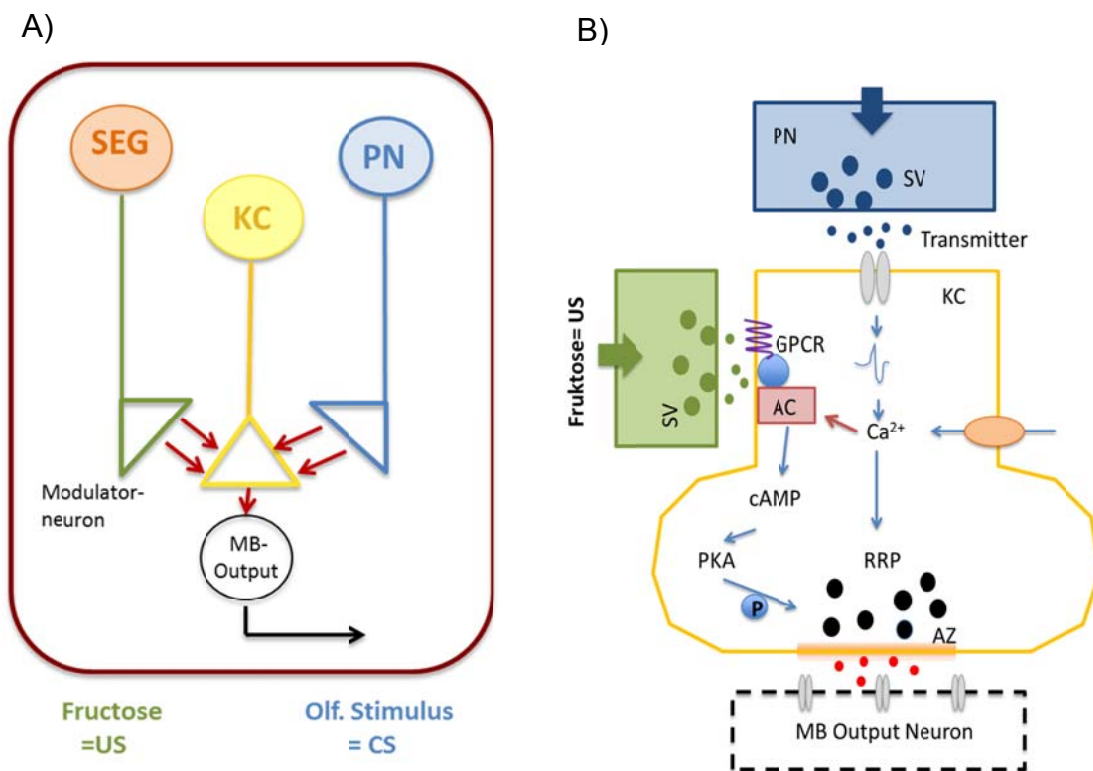


Abb. 16: Schema des assoziativen Lernens in der Larve

A) In der klassischen Konditionierung wird die Verhaltensantwort eines Tieres auf einen CS, verändert und zwar durch das gleichzeitige oder in kurzem Abstand folgende Auftreten eines US. Die PN leiten den CS (Duft) zu den KC's weiter. Wird der Larve simultan ein US (Fruktose) präsentiert, übermittelt vom SEG, ruft dies spezifische Anpassungen in der KC hervor, sodass das Ausgangssignal von der KC zu seinem nachfolgenden Neuron verstärkt wird

(rote Pfeile). Auf diese Weise ist, bei Abruf des konditionierten Verhaltens, der Signalweg des CS erleichtert und resultiert in einem spezifischen Verhalten. **B)** Das Schema zeigt eine Kenyon-Zelle (gelb) mit vorgeschalteten Projektionsneuron (blau) und dem Interneuron (grün), das das Signal des unkonditionierten Reizes leitet sowie das nachgeschalteten Ausgangsneuron (schwarz), welches das Signal zu motorischen Neuronen sendet. Kommen nun sowohl ein Signal vom Geruch (CS), als auch die Belohnung Fruktose (US) an der Kenyonzelle an, aktiviert der CS in der präsynaptischen Kenyonzelle spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, was in einem Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} resultiert. Das führt einerseits zur Freisetzung von Vesikeln aus dem Ready Releasable Pool (RRP), andererseits aktiviert es die Adenylatzyklase (AC). Dieser Vorgang kann verstärkt werden, wenn die AC gleichzeitig ein Signal von einem G-Protein-gekoppelten-Rezeptor (GPCR) erreicht. Dies geschieht durch den unkonditionierten Reiz aus dem Interneuron. Jetzt wandelt die AC ATP in den second-messenger cAMP (cyklisches Adenosinmonophosphat) um, welches die PKA aktiviert. Diese sorgt nun für eine veränderte Phosphorylierung (P) von Proteinen, unter anderem an der Aktiven Zone (AZ). Dies geschieht während der Trainingsversuche, wodurch die Konnektivität der beteiligten Synapsen verstärkt wird. Im Testversuch resultieren diese Anpassungen in einer vermehrten Transmitterfreisetzung aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt, was sich makroskopisch in konditioniertem Verhalten widerspiegelt. SV=Synaptische Vesikel, CS=konditionierter Stimulus, PN= Projektionsneuron, MB=Pilzkörper, SEG= Subesophagales Ganglion, KC= Kenyonzelle, US=unkonditionierter Stimulus. (modifiziert nach Diegelmann et al., 2013).

Allerdings wurde für appetitives Lernen gezeigt, dass in Pilzkörper-Mutanten die Reexpression von *rut* sowohl in den Pilzkörpern, als auch in den Projektionsneuronen ausreichend ist, um normales konditioniertes Verhalten hervorzurufen (Thum et al., 2007). Wohingegen für aversives Lernen eine Rettung ausschließlich bei einer Reexpression in den Kenyonzellen stattfindet. Dass Schock-Lernen und Belohnungs-Lernen durchaus Unterschiede haben, ist bekannt: So wird das aversive Lernen von Dopamin und das appetitive Lernen von Octopamin moduliert (Schwaerzel et al., 2003). Übereinstimmend damit, wird Octopamin spezifisch in den Kenyonzellen für appetitives assoziatives Lernen benötigt und moduliert damit die synaptische Plastizität (Kim et al., 2013). Aber diese wird nicht nur von Katecholaminen mit beeinflusst, sondern

neueste Daten weisen darauf hin, dass auch innerhalb des Geflechts der Kenyonzellen Modulationen untereinander stattfinden (Christiansen et al., 2011).

Alle Ergebnisse berücksichtigt, spricht jedoch einiges dafür, dass die Kenyonzellen des Pilzkörpers der Ort der synaptischen Plastizität und damit auch der Gedächtnisbildung ist. Im Rückschluss sollte dies bedeuten, dass die gezielte Expression von Protein-Mutanten in dieser Struktur mithilfe der GAL4-Linien OK107 und MB247, durchaus zu Beeinträchtigungen im Lernverhalten führen könnte. So wird OK107-GAL4 in nahezu allen Loben des Pilzkörpers exprimiert und MB247 vor allem in den α -, β -, γ -Loben und weniger in den α' - und β' -Loben (Schwaerzel et al., 2002; Aso et al., 2009). Da man aber vermutlich die α' - und β' -Neurone insbesondere beim Gedächtniserwerb braucht, wohingegen die α - und β -Zellen eher beim Abrufen der Lerninhalte gebraucht werden, sollte eine Expression der Bruchpilot-Mutante über MB247-GAL4 dennoch ausreichend sein, um ein beeinträchtigtes Lernverhalten zu erzeugen (Krashes et al., 2007). Die γ -Neurone hingegen könnten, für die *rutabaga*-abhängige Kurzzeitplastizität wichtig sein (Zars et al., 2000).

4.1.2 Die zeitliche Komponente

Die Exo- und Endozytose der Vesikel spielt eine zentrale Rolle bei der Informationsvermittlung in unserem Gehirn und damit auch bei der synaptischen Plastizität. Man könnte nun vermuten, dass derartig komplexen Veränderungen des Membranflusses sehr lange dauern, bis sie vollzogen sind. Allerdings fand man heraus, dass sie auch kurzfristig, also innerhalb von Minuten, möglich sind (Weyhersmüller et al., 2011; Hallermann und Silver, 2013). Gleichzeitig konnte man mit Hilfe der hochauflösende Mikroskopie beobachten, dass es während der präsynaptischen Bahnung an der Neuromuskulären Endplatte innerhalb kurzer Zeit zu einem gesteigerten Level von Bruchpilot kommt (Weyhersmüller et al., 2011). Was daraufhin deutet, dass es in Kürze zur Modulation der Zusammensetzung der Zytomatrix der Aktiven Zone kommen kann. Auch für RIM wurde kürzlich gezeigt, dass es an der neuromuskulären Endplatte wichtig ist für synaptische Plastizität, da es sowohl

die Vesikel im „Ready Releasable Pool“ beeinflusst, als auch den Ca^{2+} -Einstrom beeinflusst (Müller et al., 2012). Um eine effiziente Transmitterausschüttung an der präsynaptischen Membran zu gewährleisten, geht man mittlerweile davon aus, dass es mindestens drei Pools von Vesikeln gibt. Ein sogenannter „Ready Releasable Pool“ (RRP), der mit der präsynaptischen Membran in Verbindung steht und für die schnelle Vesikelfreisetzung zuständig ist, einen Reservepool (RP), der den schnellen Speicher wieder auffüllt bei einer anhaltenden Stimulation der Zelle und einen Ruhepool (Hallermann et al., 2010; Alabi und Tsien, 2012). Alle Vesikel eines Pools haben jeweils unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten mit der Membran zu verschmelzen. Das Signal dafür kommt unter anderem von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen, deren Dichte und Lokalisation in der AZ ebenfalls essentiell ist, für die Wahrscheinlichkeit der Transmitterausschüttung (Südhof, 2012a). Veränderungen dieser Wahrscheinlichkeit scheinen also ein ganz essentieller Punkt zu sein, bei der Kommunikation der Zellen und somit auch bei der synaptischen Plastizität.

Allerdings gibt es bisher wenige Daten für diese Proteine an zentralen Aktiven Zonen. Gleichzeitig weiß man, dass das appetitive olfaktorische Gedächtnis mindestens 30 Minuten nach dem Training stabil bleibt (Neuser et al., 2005). Es ist also durchaus möglich, dass innerhalb eines ca. 30 minütigen Trainingsversuchs der Larven synaptische Anpassungen vorgenommen werden bzw. diese durch genetische Veränderungen der CAZ-Proteine gehemmt werden können.

4.1.3 BRP – zentrales Gerüstprotein Aktiver Zonen

Bruchpilot ist eine Schlüsselkomponente der *Drosophila* T-Bar und an der neuromuskulären Endplatte schon intensiv studiert, was seine Funktion und Struktur betrifft (Wagh et al., 2006). In dieser Arbeit wurde dieses Protein an zentralen Synapsen der *Drosophila* Larve untersucht und auf seine Rolle bei olfaktorischen appetitiven Lernprozessen getestet. Überraschenderweise zeigte die RNAi-Mutation in den Pilzkörperneuronen keine signifikante Beeinträchtigung des Lernverhaltens.

Es stellt sich nun die Frage, ob der ausbleibende Effekt eine Folge von fehlerhaften genetischen Konstrukten sein könnte. Beispielsweise wäre es möglich, dass der verbleibende Gehalt an BRP in der Zelle bei RNAi-Expression noch ausreichend ist, um synaptische Anpassungen vorzunehmen. Kürzlich wurde hierzu eine Arbeit veröffentlicht, in dem die Herabregulierung von BRP in den Pilzkörpern durch *brp-RNA^{B3C8}* quantifiziert wurde. Demnach führt diese genetische Veränderung zu einer 22%igen Reduktion von BRP in den Kalyces gemessen anhand der Quantifizierung von BRP-Immunhistochemie mittels des Nc82-Antikörpers in konfokalen Aufnahmen. Das BRP-Level in den Makroglomeruli (Verbindung von Projektionsneuronen auf Kenyonzellen) war hingegen normwertig (Christiansen et al., 2011). Angenommen es gibt im appetitiven Lernen tatsächlich noch einen weiteren Ort oder Weg der synaptischen Plastizität, könnte dies eine mögliche Erklärung sein, dass Bruchpilot im larvalen olfaktorischen Lernen keinen erkennbaren Effekt zeigte. Oder alternativ, dass die erzielte Reduktion von BRP nicht ausreichend ist. Dies ließe sich auch auf die BRP-Nullmutante übertragen, da man hier auch nur die heterozygote Variante verwenden kann, weil die Homozygoten nicht testbar sind (Kittel et al., 2006). Mit der *brp-RNAi/dicer2*-Mutante sollte hier diesem Problem begegnet werden. Da die Kontrollgruppen allerdings schon überdurchschnittlich positive Lernindices aufzeigten, könnte der genetische Hintergrund zu insgesamt besserer Lernleistung führen und so die gewollte Verstärkung der RNAi-Wirkung wieder ausgeglichen werden. Darüber hinaus hat man bei der Verwendung von RNAi-Konstrukten immer das Risiko der „Off-Targets“. Das heißt, dass nicht nur die BRP-Konzentration in den Zellen erniedrigt wird, sondern dass es auch zu unerwünschten Veränderungen an anderen Gensequenzen kommen kann (Seinen et al., 2011). Dieser Umstand könnte den Effekt von Bruchpilot verschleiern.

Weiterhin könnte auch eine insuffiziente oder Fehl-Expression in den Ziel-Neuronen durch den Treiber OK107-GAL4 die fehlenden Auswirkungen auf das Lernverhalten erklären. Allerdings ist diese Treiberlinie schon häufig zur Umsetzung ähnlicher Fragestellungen herangezogen und erfolgreich eingesetzt worden, was einen solchen Expressionsfehler eher unwahrscheinlich macht

(Connolly et al., 1996). So nutzte auch die Forschungsgruppe um Hiromu Tanimoto (Knapek et al., 2011) diese Treiberlinie, um das Lernverhalten von Bruchpilot zu untersuchen. Allerdings prüften sie adulte Fliegen auf aversives Lernen nach drei Stunden. Wie oben schon erwähnt, scheint es durchaus Unterschiede in den verschiedenen Lernformen zu geben (vgl. 4.1.1). Dennoch fanden sie für Bruchpilot-Mutanten ein eingeschränktes olfaktorisches Lernverhalten, vor allem bei Anästhesie-resistenten Gedächtnis (ARM) und weniger bei Anästhesie-sensiblen (ASM) (Knapek et al., 2011). Berücksichtigt man die Tatsache, dass das Kurzzeitgedächtnis hauptsächlich aus Anästhesie-empfindlichem Gedächtnis (ASM) besteht, scheint das vorliegende Ergebnis durchaus kongruent dazu. Darüber hinaus hat man entdeckt, dass es auch *rutabaga*-unabhängige Formen der Plastizität gibt. Es könnte also sein, dass wenn eine Art der Anpassung nicht genutzt werden kann, weil sie blockiert ist, das Fliegenhirn in der Lage ist eine Alternative zu nutzen (Livingstone et al., 1984; Dudai, 1985; Gerber et al., 2004). In summa, scheint es ohnehin nicht unwahrscheinlich, dass verschiedene Formen von Lernen verschiedene Formen der Plastizität hervorrufen (Morris et al., 1989). So könnte es in dem Fall von Bruchpilot auch sein, dass der Ausfall von präsynaptischer Bahnung eventuell von einer anderen Art der Plastizität der postsynaptischen Membran übernommen wird.

Nichtsdestotrotz scheint Bruchpilot eng verknüpft zu sein mit synaptischer Stärke und Umbauvorgängen an der Synapse, zumindest an der Neuromuskulären Endplatte. So fand man erst kürzlich eine Korrelation zwischen präsynaptischer Plastizität und strukturellen Anpassungsvorgängen an der Aktiven Zone: Während kurzfristiger präsynaptischer Bahnung an der Neuromuskulären Endplatte kommt es nicht nur zu einer gesteigerten Anzahl an „Ready-Releasable-Vesicles“ oder zu einer Beeinflussung der Größe der AZ sondern während dieses Vorgangs lässt sich auch ein Anstieg der BRP-Menge beobachten (Weyhersmüller et al., 2011). Ein analoger Effekt konnte mit den hier vorgestellten Ergebnissen für die zentrale Synapse nicht bewiesen werden.

4.1.4 RIM – substanzieller Interaktionspartner

RIM ist ein zentrales Protein Aktiver Zonen, das wichtig ist für die basale Neurotransmission (Han et al., 2011; Kaeser et al., 2011). Somit wäre es ein exzellenter Kandidat, um auch bei der synaptischen Plastizität und beim Lernen eine Rolle zu spielen. Gleichwohl fand sich in den hier durchgeführten Experimenten weder durch eine Steigerung des Wildtyp-RIM's, noch durch eine Punktmutation in der C₂A-Domäne eine signifikante Verbesserung des olfaktorischen Lernverhaltens.

RIM fungiert durch seine diversen Interaktionsdomänen als Bindeglied zwischen verschiedenen Effektoren. Ein Beispiel ist Munc-13, ein weiteres Protein der Aktiven Zone, welches für die regelrechte Vorbereitung der Vesikel für den Verschmelzungsschritt (sogenanntes „priming“) zuständig ist. RIM beeinflusst Munc-13 über seine Zinkfingerdomäne und reguliert auf diese Weise den wichtigen Schritt des Vesikel-„Primings“ und der Exozytose (Deng et al., 2011; Dulubova et al., 2005). Passend dazu fand man in RIM1 α -Knockout-Mäusen eine Reduktion des „Priming“-Vorgangs um 50% (Calakos et al., 2004). So hat man zwar mittlerweile schon viele Vermutungen, welche Domänen mit welchen Proteinen interagieren, aber noch wenig Beweise. Ebenso ist man sich über die physiologische Bedeutung dieser Nahtstellen noch längst nicht ganz im Klaren (Schoch und Gundelfinger, 2006; Südhof, 2012b). Man vermutet aber, zum Beispiel für die PDZ-Domäne von RIM eine Funktion bei der normalen Anreicherung von Ca²⁺-Kanälen an der Aktiven Zone. Bei einer RIM-Mutante bei der unter anderem die PDZ-Domäne ausgeschnitten ist, sah man in den Neuronen eine Reduktion der P-/Q-Calcium-Kanäle um ca. 40 % (Graf et al., 2012). Die Interaktionspartner der C₂A-Domäne von RIM sind aber bisher noch unbekannt. Zunächst glaubte man, dass sie mit spannungsabhängigen Calcium-Kanälen, Synaptotagmin und SNAP-25 in Wechselwirkung steht, was sich allerdings bisher nicht eindeutig nachweisen ließ (Dai et al., 2005). In ihrer Gesamtheit betrachtet, lassen diese Daten die Vermutung zu, dass RIM über die vielfältigen Bindungspartner auch Einfluss nehmen könnte, auf die synaptische Plastizität.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, dass die CORD7-Mutation in der C₂A-Domäne des Proteins, aber auch die Überexpression des Wildtyp-RIMs keine positiven Auswirkungen auf die olfaktorische Lernfähigkeit der Larve haben, unterstützt die These, dass RIM zwar allgemein plastizitätsfördernd wirkt, eine Punktmutation in der C₂A-Domäne diesen Vorgang aber nicht zu beeinflussen vermag. Dennoch kann es sein, dass RIM auf bestimmte Lernformen Einfluss nimmt. Übereinstimmend damit, wurde zumindest für *rim*-Mutante-Mäuse bereits eine signifikante Beeinträchtigung des assoziativen Lernverhaltens gefunden. So zeigten RIM1 α ^{-/-}-Mäuse beim Angstlernen und dem räumlichen Lernen, geprüft durch das Morrison-Wasserlabyrinth, eine verminderte Lernfähigkeit (Powell et al., 2004). Das den hier durchgeführten Experimenten zu Grunde gelegte Paper (Sisodiya et al., 2007), hat den Verbalen IQ bei Betroffenen der CORD7-Mutation geprüft, eine Lernform, die bei Fliegenlarven reichlich schwierig zu prüfen ist.

Vielleicht reicht eine „einfache“ Punktmutation in der C₂A-Domäne des Proteins nicht aus, um die wichtigen Interaktionen zu den verschiedenen Partnern in *Drosophila* zu beeinflussen und auf diese Weise in den Prozess des olfaktorischen Lernens einzugreifen. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass RIM mit seinen zahlreichen Verbindungspartnern auch in *Drosophila* wichtige Aufgaben bei verschiedensten Lernprozessen übernimmt und somit Spezies-übergreifend Einfluss auf synaptische Plastizität nimmt.

4.1.5 Fife – vielfältiges Organisationsprotein

Wie in der Einleitung erwähnt, ist Fife ein erst kürzlich entdecktes Protein der Aktiven Zone, das vermutlich ein *Drosophila* Piccolo-RIM-Ortholog darstellt. Piccolo ist ein sehr großes CAZ Protein, das viele strukturellen Eigenschaften und Funktionen mit Bassoon teilt (Fenster et al., 2000). Es wird vermutet, dass diese beiden Proteine nicht direkt an der Neurotransmitterausschüttung beteiligt sind, sondern vielmehr für das Anhäufen („clustering“) der Vesikel in der Präsynapse zuständig sind (Mukherjee et al., 2010). In Doppelmutanten sah man keine elektrophysiologischen oder offensichtliche strukturelle Störungen der Vesikelfreisetzung.

Dennoch stellt sich die Frage, ob Fife eher ein weiteres RIM-Protein ist oder ein Ortholog von Piccolo. Wenn man allein die Größe betrachtet, hat Fife eher Ähnlichkeit mit RIM (Fife:1300aa, Piccolo:>5000aa, RIM: 1350-1700aa). Vergleicht man allerdings die gut konservierte PDZ-Domäne, erscheint die Verwandtschaft zu Piccolo allzu deutlich. Eine eindeutige Zuordnung war aber strukturell bisher nicht möglich (Bruckner et al., 2012).

Angenommen Fife ist tatsächlich ein Piccolo-Ortholog und ist demnach nicht direkt an der Transmitterausschüttung beteiligt, wie können sie dann Einfluss nehmen auf die synaptische Homöostase? Vor allem da man für Piccolo bisher eigentlich keine Funktion darin gesehen hat (Mukherjee et al., 2010). Waites und Kollegen haben herausgefunden, dass Piccolo und Bassoon Doppelmutanten zu einem vermehrten Abbau von anderen Proteinen in der Präsynapse führen, was letztendlich zu einer Degeneration der Zelle führt. Sie erklärten das damit, dass diese beiden großen Proteine wahrscheinlich über ihre Zinkfinger-Domäne die E3 Ligase Siah1 regulieren. Dieses Enzym führt zu einer Ubiquitinierung von Proteinen, eine Markierung, welche zum Abbau dieser Proteine führt. Übereinstimmend damit, fand man in Doppelmutanten eine verminderte Expression von präsynaptischen Proteinen wie SNAP-25, Synapsin1a und VAMP2 sowie abnorme synaptische Vesikel (Waites et al., 2013).

Werden Piccolo-äquivalente Aufgaben in der *Drosophila* von Fife übernommen, könnte dieser Eingriff in die Vesikel- und Protein Homöostase auch der Grund für die beeinträchtigte Lernfähigkeit der *fife-RNAi*-Larven sein. Da die *UAS-fife-RNAi*-Linie bisher keine bekannten Off-Targets hat (Vienna Drosophila Resource Center, URL: http://stockcenter.vdrc.at/control/product/~VIEW_INDEX=0/~VIEW_SIZE=100/~product_id=103267; 12.01.17), ist die verminderte assoziative Lernverhalten allein auf die Reduktion des Fife-Levels in den Pilzkörperneuronen zurückzuführen. Dass die *UAS-fife-RNAi*-Kontrollgruppe ebenfalls schon eine geringer Lernperformance zeigte, könnte auf eine lecke Expression der Linie

auch ohne GAL4-Treiber schließen lassen oder auf eventuelle Insertionseffekte durch das UAS-Konstrukt zurück zu führen sein.

Interessanterweise ließ sich dieser Sachverhalt bei der Nullmutante von Fife nicht reproduzieren, dies könnte daran liegen, dass RNAi immer ein akuter Knockdown des Proteins im Laufe der Entwicklung des Organismus ist. Die Zelle hat keine Zeit in der Entwicklung den Defekt zu beheben. Wohingegen die Nullmutante direkt und unwiderruflich an der DNA, dem Erbgut der Zelle, angreift.

4.2 Das große Ganze – eine Perspektive

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass von der Struktur eines Proteins nicht direkt auf die Funktion und den Phänotyp geschlossen werden kann. Auf einer konsekutiven Stufe wäre es deswegen nötig zu prüfen, ob und in welcher Konzentration die veränderten Gene in den Mutanten tatsächlich in den Kenyonzellen exprimiert werden. Und darüber hinaus welche Auswirkungen auf das Protein-Level durch die RNAi-Methode genau erzielt werden können. Ferner stellt sich auch die Frage, wie ausgereift Aktive Zonen in der Larve tatsächlich schon sind? Und ob das larvale Lernen dementsprechend das passende Instrument ist, um die Rolle Aktiver Zonen Proteine bei synaptischer Plastizität zu untersuchen.

Überdies könnte es Aufgabe künftiger Forschung sein, das bisher erworbene Grundlagenwissen, das man sich mit Hilfe von Modellorganismen erarbeitet hat, auf dessen Relevanz für den Menschen zu prüfen. Immerhin erlaubt es die bewiesene hohe Homologie und Konservierung der molekularen Determinanten der Aktiven Zone durchaus theoretische Rückschlüsse von *Drosophila* auf den Menschen zu ziehen, welche natürlich im Anschluss wissenschaftlich fundiert werden müssten (Sigrist und Schmitz, 2011; Ackermann et al., 2015).

Denn die einzelnen Vorgänge und Komponenten der synaptischen Übertragung zu kennen, ist der erste Schritt die Krankheiten nachzuvollziehen, die als Folge von Fehlfunktionen an dieser Stelle entstehen. Aktuelle Studien zeigten, dass Defekte der präsynaptischen Plastizität und Transmitterauschüttung zu

neurodegenerativen Erkrankungen führen können. Wie zum Beispiel zur Alzheimer-Erkrankung, Schizophrenie und Autismus (van Spronsen und Hoogenraad, 2010; Waites und Garner, 2011). Weiteres Wissen über die Rolle der Aktiven Zonen Proteine für Lern- und Gedächtnisvorgänge könnten zu gezielten Therapieansätzen führen (Pandey und Nichols, 2011).

Für weitere Forschung in diesem Bereich müssen zum einen die anderen Aktiven Zone Proteine und deren Interaktionen im larvalen olfaktorischen Lernen untersucht werden und zum anderen der Detaillierungsgrad erhöht werden. So müssen die einzelnen Schritte vom Genotyp zum Phänotyp genauer analysiert werden. Dabei werden vermutlich die neuen Technologien im Bereich der bildgebenden Verfahren entscheidend sein. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass Lernen ein hochkomplexer neurophysiologischer Vorgang ist, der nicht nur an einer einzelnen Synapse stattfindet, sondern in einem neuronalen Netzwerk lokalisiert ist (Ensemble). Neue Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion eines Proteins aufzudecken, wird in der Zukunft mit Sicherheit weiterhin wichtiger Gegenstand der neurophysiologischen Grundlagenforschung bleiben.

Zusammenfassung

Synaptische Plastizität wird als Grundlage für Lern- und Gedächtnisprozesse in unserem Gehirn angesehen. Aktive Zonen (AZ) und ihre spezifischen Proteine modulieren diesen Prozess und bahnen essentielle Vorgänge der synaptischen Transmission. In dieser Arbeit wurden drei zentrale Proteine Aktiver Zonen - Bruchpilot, RIM (Rab3 interacting molecule) und Fife - untersucht und ihre Rolle bei konditionierten Lernprozessen in *Drosophila melanogaster* Larven geprüft. Hierzu wurde das etablierte Paradigma des larvalen appetitiven olfaktorischen Lernens genutzt, bei dem eine Gruppe von Larven lernt, einen Duft mit einem gustatorischen Verstärker zu koppeln. Durch die vielfältigen genetischen Manipulationsmöglichkeiten des Modellorganismus war es möglich, die Funktion der Proteine bei assoziativen Lernvorgängen selektiv zu betrachten.

Bruchpilot wird für den funktionellen Aufbau Aktiver Zonen in *Drosophila* benötigt und ist wichtig für die Akkumulation von Calcium-Kanälen in der Nähe von AZ. Durch gentechnische Veränderungen dieses Proteins ließ sich jedoch keine Beeinträchtigung im olfaktorischen Lernverhalten von *Drosophila* Larven beobachten. RIM fungiert durch seine Interaktionsdomänen als Bindeglied zwischen verschiedensten Effektoren und hat Einfluss auf synaptische Plastizität. Es wurde gezeigt, dass eine Punktmutation in der C₂A-Domäne von RIM beim Menschen gleichzeitig zur Retinadegeneration und zu einem gesteigert verbalen IQ (Intelligenzquotient) führt. Eine durch die hohe Homologie vergleichbare Mutation im *Drosophila*-Genom resultierte nicht in einem veränderten Phänotyp im olfaktorischen Lernen. Fife ist ein Protein, das für eine funktionsfähige Architektur von AZ und damit u.a. für den reibungslosen Vesikelverkehr zuständig ist. Es zeigte sich, dass dieses Protein auch synaptische Plastizität und Lernvorgänge beeinflusst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind ein Beitrag, um die Zusammenhänge der synaptischen Plastizität und die Funktion Aktiver Zonen Proteine besser begreifen zu können. Hervorzuheben dabei ist, dass die Bruchpilot- und RIM-Mutanten-Larven keinen veränderten Phänotyp, bzw. bei Fife nur teilweise einen eingeschränkten Phänotyp im olfaktorischen larvalen

Lernen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen zeigten. Gleichwohl man früher schon signifikante strukturelle Veränderungen an Aktiven Zonen dieser Mutanten an der neuromuskulären Endplatte und auch Effekte auf das Verhalten in adulten *Drosophila* gefunden hat. Es wird entscheidend sein, den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion Aktiver Zonen Proteine weiter zu konkretisieren.

Referenzen

- Abbott LF, Nelson SB. 2000. Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci* 3 Suppl:1178–1183.
- Ackermann F, Waites CL, Garner CC. 2015. Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. *EMBO reports* 16:923–938.
- Alabi AA, Tsien RW. 2012. Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a013680.
- Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H. 2009. The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet* 23:156–172.
- Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–415.
- Bruckner JJ, Gratz SJ, Slind JK, Geske RR, Cummings AM, Galindo SE, Donohue LK, O'Connor-Giles KM. 2012. Fife, a *Drosophila* Piccolo-RIM homolog, promotes active zone organization and neurotransmitter release. *J Neurosci* 32:17048–17058.
- Bruckner JJ, Zhan H, Gratz SJ, Rao M, Ukken F, Zilberg G, O'Connor-Giles KM. 2017. Fife organizes synaptic vesicles and calcium channels for high-probability neurotransmitter release. *J Cell Biol* 216:231–246.
- Calakos N, Schoch S, Südhof TC, Malenka RC. 2004. Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release. *Neuron* 42:889–896.
- Castillo PE, Schoch S, Schmitz F, Südhof TC, Malenka RC. 2002. RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature* 415:327–330.
- Christiansen F, Zube C, Andlauer, Till F M, Wichmann C, Fouquet W, Oswald D, Mertel S, Leiss F, Tavosanis G, Luna, Abud J Farca et al. 2011. Presynapses in Kenyon cell dendrites in the mushroom body calyx of *Drosophila*. *J Neurosci* 31:9696–9707.
- Connolly JB, Roberts IJ, Armstrong JD, Kaiser K, Forte M, Tully T, O'Kane CJ. 1996. Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science* 274:2104–2107.
- Couteaux R, Pécot-Dechavassine M. 1970. Vésicules synaptiques et poches au niveau des "zones actives" de la jonction neuromusculaire. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 271:2346–2349.

- Dai H, Tomchick DR, García J, Südhof TC, Machius M, Rizo J. 2005. Crystal structure of the RIM2 C2A-domain at 1.4 Å resolution. *Biochemistry* 44:13533–13542.
- Davis RL. 2004. Olfactory learning. *Neuron* 44:31–48.
- Del Castillo J, Katz B. 1954. Changes in end-plate activity produced by presynaptic polarization. *J Physiol* 124:586–604.
- Deng L, Kaeser PS, Xu W, Südhof TC. 2011. RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. *Neuron* 69:317–331.
- Diegelmann S, Klagges B, Michels B, Schleyer M, Gerber B. 2013. Maggot learning and Synapsin function. *J Exp Biol* 216:939–951.
- Dubnau J, Grady L, Kitamoto T, Tully T. 2001. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411:476–480.
- Dudai Y. 1985. Some properties of adenylate cyclase which might be important for memory formation. *FEBS Lett* 191:165–170.
- Dudai Y, Jan Y, Byers D, Quinn WG, Benzer S. 1976. *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient learning. *Proc Natl Acad Sci* 5:1654–1658.
- Duffy JB. 2002. GAL4 System in *Drosophila*: A fly Geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34:1–15.
- Dukas R. 1998. Ecological relevance of associative learning in fruit fly larvae. *Behav Ecol Sociobiol* 19:195–200.
- Dulubova I, Lou X, Lu J, Huryeva I, Alam A, Schneggenburger R, Südhof TC, Rizo J. 2005. A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J* 24:2839–2850.
- Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempfer U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC. 2000. Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* 25:203–214.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
- Fouquet W, Oswald D, Wichmann C, Mertel S, Depner H, Dyba M, Hallermann S, Kittel RJ, Eimer S, Sigrist SJ. 2009. Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. *J Cell Biol* 186:129–145.

- Gerber B, Biernacki R, Thum J. 2013. Odor-taste learning assays in *Drosophila* larvae. *Cold Spring Harb Protoc*; doi: 10.1101/pdb.prot071639v.
- Gerber B, Tanimoto H, Heisenberg M. 2004. AN engram found? Evaluation the evidence from fruit flies. *Curr Opin Neurobiol* 14:737–744.
- Gerber B, Stocker RF. 2007. The *Drosophila* larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: a review. *Chem Senses* 32:65–89.
- Gervasi N, Tchénio P, Preat T. 2010. PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron* 65:516–529.
- Godenschwege TA, Reisch D, Diegelmann S, Eberle K, Funk N, Heisenberg M, Hoppe V, Hoppe J, Klagges, Bert R E, Martin J et al. 2004. Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour. *Eur J Neurosci* 20:611–622.
- Graf ER, Valakh V, Wright CM, Wu C, Liu Z, Zhang YQ, DiAntonio A. 2012. RIM promotes calcium channel accumulation at active zones of the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* 32:16586–16596.
- Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. 1993. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259:780–785.
- Guo A, Li L, Xia SZ, Feng CH, Wolf R, Heisenberg M. 1996. Conditioned visual flight orientation in *Drosophila*: dependence on age, practice, and diet. *Learn Mem* 3:49–59.
- Hallermann S, Heckmann M, Kittel RJ. 2010. Mechanisms of short-term plasticity at neuromuscular active zones of *Drosophila*. *HFSP J* 4:72–84.
- Hallermann S, Silver RA. 2012. Sustaining rapid vesicular release at active zones: potential roles for vesicle tethering. *Trends Neurosci* 3:185-194.
- Hamel CP. 2007. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* 2:7.
- Han Y, Kaeser PS, Südhof TC, Schneggenburger R. 2011. RIM determines Ca²⁺ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron* 69:304–316.
- Hebb D. 1949. *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. New York: John Wiley & Sons.

- Heckmann M, Dudel J. 2010. Synaptische Übertragung. In: Physiologie des Menschen (Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, 31. Auflage) pp76-95. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Heisenberg M. 2003. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* 4:266–275.
- Heisenberg M, Bost A, Wagner S., Byers D. 1985. *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* 2:1–30.
- Hendel T, Michels B, Neuser K, Schipanski A, Kaun K, Sokolowski MB, Marohn F, Michel R, Heisenberg M, Gerber B. 2005. The carrot, not the stick: appetitive rather than aversive gustatory stimuli support associative olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191:265–279.
- Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P. 1999. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:269–279.
- Hirth F, Reichert H. 1999. Conserved genetic programs in insect and mammalian brain development. *Bioessays* 21:677–684.
- Jahn R, Fasshauer D. 2012. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 490:201–207.
- Kaesler PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof TC. 2011. RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144:282–295.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. Principles of neural science. 4. Ausgabe New York: Elsevier.
- Kim Y, Lee H, Lim J, Han K. 2013. Appetitive learning requires the alpha1-like octopamine receptor OAMB in the *Drosophila* mushroom body neurons. *J Neurosci* 33:1672–1677.
- Kittel R, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ. 2006. Bruchpilot pomotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* 312:1051–1054.
- Knapek S, Gerber B, Tanimoto H. 2010. Synapsin is selectively required for anesthesia-sensitive memory. *Learn Mem* 17:76–79.
- Knapek S, Sigrist SJ, Tanimoto H. 2011. Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. *J Neurosci* 31:3453–3458.

- Koh YH, Gramates LS, Budnik V. 2000. *Drosophila* larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. *Microsc Res Tech* 49:14–25.
- Koushika SP, Richmond JE, Hadwiger G, Weimer RM, Jorgensen EM, Nonet ML. 2001. A post-docking role for active zone protein Rim. *Nat Neurosci* 4:997–1005.
- Krashes MJ, Keene AC, Leung B, Armstrong JD, Waddell S. 2007. Sequential use of mushroom body neuron subsets during *drosophila* odor memory processing. *Neuron* 53:103–115.
- Kurusu M, Awasaki T, Masuda-Nakagawa LM, Kawauchi H, Ito K, Furukubo-Tokunaga K. 2002. Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II. *Development* 129:409–419.
- Kuttenkeuler D, Boutros M. 2004. Genome-wide RNAi as route to gene function in *Drosophila*. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3:168–176.
- Lee T, Lee A, Luo L. 1999. Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126:4065–4076.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW. 2004. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117:69–81.
- Lieberman DA. 2000a. The Use of Animals. In: *Learning: Behavior and cognition*. 3. Auflage. Belmont, CA: Wadsworth/Thomson.
- Lieberman DA. 2000b. An Overview of Associative Learning. In: *Learning: Behavior and cognition*. 3. Auflage. Belmont, CA: Wadsworth/Thomson.
- Livingstone MS, Sziber PP, Quinn WG. 1984. Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* 37:205–215.
- Ljaschenko D. 2013. Hebbian plasticity at neuromuscular synapses of *Drosophila*, Dissertation, Universität Würzburg, S. 28.
- Lonart G, Schoch S, Kaeser PS, Larkin CJ, Südhof TC, Linden DJ. 2003. Phosphorylation of RIM1alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses. *Cell* 115:49–60.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649–711.

- Masuda-Nakagawa LM, Tanaka NK, O'Kane CJ. 2005. Stereotypic and random patterns of connectivity in the larval mushroom body calyx of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:19027–19032.
- McGuire SE, Le PT, Davis RL. 2001. The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* 293:1330–1333.
- Michels B, Chen Y, Saumweber T, Mishra D, Tanimoto H, Schmid B, Engmann O, Gerber B. 2011. Cellular site and molecular mode of synapsin action in associative learning. *Learn Mem* 18:332–344.
- Michels B, Diegelmann S, Tanimoto H, Schwenkert I, Buchner E, Gerber B. 2005. A role for Synapsin in associative learning: the *Drosophila* larva as a study case. *Learn Mem* 12:224–231.
- Morris RG, Halliwell RF, Bowery N. 1989. Synaptic plasticity and learning. II: Do different kinds of plasticity underlie different kinds of learning? *Neuropsychologia* 27:41–59.
- Mukherjee K, Yang X, Gerber SH, Kwon H, Ho A, Castillo PE, Liu X, Südhof TC. 2010. Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6504–6509.
- Müller M, Liu, Karen Suk Yin, Sigrist SJ, Davis GW. 2012. RIM controls homeostatic plasticity through modulation of the readily-releasable vesicle pool. *J Neurosci* 32:16574–16585.
- Neher E, Sakaba T. 2008. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59:861–872.
- Neuser K, Husse J, Stock P, Gerber B. 2005. Appetitive olfactory learning in *Drosophila* larvae: effects of repetition, reward strength, age, gender, assay type and memory span. *Anim Behav* 69:891–898.
- Nighorn A, Healy MJ, Davis RL. 1991. The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* 6:455–467.
- Pandey UB, Nichols CD. 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev* 63:411–436.
- Paul MM. 2014. Vesikelverkehr in Aktiven Zonen, unv. Dissertation, Universität Würzburg, S. 25

- Pauls D, Selcho M, Gendre N, Stocker RF, Thum AS. 2010. *Drosophila* larvae establish appetitive olfactory memories via mushroom body neurons of embryonic origin. *J Neurosci* 30:10655–10666.
- Pieribone VA, Shupliakov O, Brodin L, Hilfiker-Rothenfluh S, Czernik AJ, Greengard P. 1995. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature* 375:493–497.
- Pitman JL, DasGupta S, Krashes MJ, Leung B, Perrat PN, Waddell S. 2009. There are many ways to train a fly. *Fly (Austin)* 3:3–9.
- Pittenger C, Kandel ER. 2003. In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: *Aplysia* and the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:757–763.
- Powell CM, Schoch S, Monteggia L, Barrot M, Matos MF, Feldmann N, Südhof TC, Nestler EJ. 2004. The presynaptic active zone protein RIM1alpha is critical for normal learning and memory. *Neuron* 42:143–153.
- Python F, Stocker RF. 2002. Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *J Comp Neurol* 445:374–387.
- Ramaekers A, Magnenat E, Marin EC, Gendre N, Jefferis GS, Luo L, Stocker RF. 2005. Glomerular maps without cellular redundancy at successive levels of the *Drosophila* larval olfactory circuit. *Curr Biol* 15:982–992.
- Scheller RH. 1995. Membrane trafficking in the presynaptic nerve terminal. *Neuron* 14:893–897.
- Scherer S, Stocker RF, Gerber B. 2003. Olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae. *Learn Mem* 10:217–225.
- Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, Schmitz F, Malenka RC, Südhof TC. 2002. RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* 415:321–326.
- Schoch S, Gundelfinger ED. 2006. Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* 326:379–391.
- Schwaerzel M, Heisenberg M, Zars T. 2002. Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* 35:951–960.
- Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S, Heisenberg M. 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* 23:10495–10502.

- Seinen E, Burgerhof, Johannes G M, Jansen RC, Sibon, Ody C M. 2011. RNAi-induced off-target effects in *Drosophila melanogaster*: frequencies and solutions. *Brief Funct Genomics* 10:206–214.
- Sigrist SJ, Schmitz D. 2011. Structural and functional plasticity of the cytoplasmic active zone. *Curr Opin Neurobiol* 21:144–150.
- Sisodiya SM, Thompson PJ, Need A, Harris SE, Weale ME, Wilkie SE, Michaelides M, Free SL, Walley N, Gumbs C et al. 2007. Genetic enhancement of cognition in a kindred with cone-rod dystrophy due to RIMS1 mutation. *J Med Genet* 44:373–380.
- Skoulakis EM, Kalderon D, Davis RL. 1993. Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron* 11:197–208.
- Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409–418.
- Stocker RF. 1994. The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275:3–26.
- Stocker RF. 2001. *Drosophila* as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microsc Res Tech* 55:284–296.
- Stocker RF. 2008. Design of the larval chemosensory system. *Adv Exp Med Biol* 628:628–669.
- Südhof TC. 2012a. Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a011353.
- Südhof TC. 2012b. The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11–25.
- Sun J, Bronk P, Liu X, Han W, Südhof TC. 2006. Synapsins regulate use-dependent synaptic plasticity in the calyx of Held by a Ca²⁺/calmodulin-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2880–2885.
- Tang J, Maximov A, Shin O, Dai H, Rizo J, Südhof TC. 2006. A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* 126:1175–1187.
- Tempel BL, Bonini N, Dawson DR, Quinn WG. 1983. Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 80:1482–1486.

- Thum AS, Jenett A, Ito K, Heisenberg M, Tanimoto H. 2007. Multiple memory traces for olfactory reward learning in *Drosophila*. *J Neurosci* 27:11132–11138.
- Tully T, Quinn W. 1985. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 157:263–277.
- van Spronsen M, Hoogenraad CC. 2010. Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 10:207–214.
- Vosshall LB, Stocker RF. 2007. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci* 30:505–533.
- Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrbeck H, Buchner S, Dabauvalle M, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E. 2006. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* 49:833–844.
- Waites CL, Garner CC. 2011. Presynaptic function in health and disease. *Trends Neurosci* 34:326–337.
- Waites CL, Leal-Ortiz SA, Okerlund N, Dalke H, Fejtova A, Altroch WD, Gundelfinger ED, Garner CC. 2013. Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation. *EMBO J* 32:954–969.
- Wang Y, Mamiya A, Chiang A, Zhong Y. 2008. Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body. *J Neurosci* 28:4368–4376.
- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC. 1997. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593–598.
- Wang Y, Südhof TC. 2003. Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins. *Genomics* 81:126–137.
- Weyhersmüller A, Hallermann S, Wagner N, Eilers J. 2011. Rapid active zone remodeling during synaptic plasticity. *J Neurosci* 31:6041–6052.
- Yang MY, Armstrong JD, Vilinsky I, Strausfeld NJ, Kaiser K. 1995. Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. *Neuron* 15:45–54.
- Yeh E, Gustafson K, Boulianne GL. 1995. Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7036–7040.

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

Zhai RG, Bellen HJ. 2004. The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology Bethesda* 19:262–270.

Zucker RS, Regehr WG. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355–405.

Danksagung

Als erstes gilt mein Dank Prof. Dr. Manfred Heckmann, der mich auf dem Weg zur Forschung begleitet und durch anregende Fragestellungen und Diskussionen gefördert hat. Und der mir verdeutlicht hat, was professionelles und konsequentes wissenschaftliches Arbeiten ausmacht.

Herr Prof. Dr. Thomas Raabe danke ich herzlich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Ich danke Frau Dr. Kirska Neuser für ihre umfassende Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit, für die Etablierung und Einführung in die Verhaltensexperimente sowie für die Hilfestellung bei wissenschaftlichen Fragestellungen und darüber hinaus.

Bei Herr Dr. Martin Pauli bedanke ich mich für den ermutigenden Start am Physiologischen Institut in Würzburg sowie die immerwährende Unterstützungen in technischen Belangen und für die freundliche Unterweisung in die bildgebenden Verfahren. Ebenso danke ich Frau Tanja Trnetschek für die Hilfe bei der Pflege der *Drosophila*-Stämme und für die aufmunternden Gespräche. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts Würzburg für die anhaltende Unterstützung und Hilfestellung in den verschiedensten Gebieten bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets auf meinem Weg begleitet, motiviert und in allem unterstützt haben. Ohne sie, stünde ich heute nicht da, wo ich bin. Meiner Schwester danke ich für ihr kritisches und konstruktives Hinterfragen und dafür, dass sie mich so gut kennt. Bei meinem Mann möchte ich mich für seine wertvollen Ratschläge und seine Geduld beim Erstellen dieser Arbeit bedanken, aber vor allem auch für sein Vertrauen.

Ohne das Zusammenwirken all dieser Personen, wäre diese Arbeit in der jetzigen Form nicht möglich gewesen. Danke!

Lebenslauf

SANDRA GABI JUNGBAUER

Geboren: 05.02.1990 in Bad Mergentheim
Geburtsname: Ulzhöfer

AUSBILDUNG UND BERUF

09/2016 – heute Weiterbildung zur Fachärztin Neurologie, Klinikum Augsburg
06/2016 Staatsexamen und Approbation als Ärztin
10/2009 – 06/2016 Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians Universität Würzburg
09/2000 – 06/2009 Allgemeine Hochschulreife, Martin-Schleyer-Gymnasium, Lauda-Königshofen

PRAKTISCHE ERFAHRUNGEN

04/2015 – 04/2016 Praktisches Jahr

- Innere Medizin, Uniklinikum Würzburg
- Neurologie, Uniklinikum Würzburg
- Chirurgie, Missionsärztliche Klinik Würzburg

09/2011 – 02/2014 Famulaturen

- 02/2014: Kardiologie, Gemeinschaftspraxis Dres. Camerer, Strömer und Drösch, Würzburg
- 08/2013: Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik, Würzburg
- 03/2013: Anästhesiologie, Tagesklinik Ringparkcenter, Würzburg
- 09/2011: Neurologie, Allgemeines Krankenhaus, Wien

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT & LEHRE

04/2012 – 06/2016 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Physiologie- Schwerpunkt Neurophysiologie, Würzburg
10/2011 – 03/2014 Betreuung des Physiologie-Praktikums für Mediziner

