

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. V. Toyka

Lokalisierung eines Gedächtnisses bei *Drosophila melanogaster*

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Matthias Fischer
aus Würzburg**

Würzburg, Mai 2003

Referent: Professor Dr. K. V. Toyka

1. Koreferent: Professor Dr. A. Warnke

2. Koreferent: Professor Dr. M. Heisenberg

Dekan: Professor Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2004

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
<u>1. 1. Grundlagen des Verhaltens</u>	2
<u>1. 2. Lernen</u>	5
1. 2. 1. Nicht-assoziatives Lernen	5
1. 2. 2. Assoziatives Lernen	6
1. 2. 2. 1. Klassische Konditionierung	7
1. 2. 2. 2. Operante Konditionierung	9
1. 2. 2. 3. Konditionierung als therapeutische Technik	10
<u>1. 3. Gedächtnis</u>	11
1. 3. 1. Grundlagen des Gedächtnisses	11
1. 3. 2. Krankhafte Störungen des Gedächtnisses	12
1. 3. 3. Erkenntnisse auf Grund operativer Entfernung bestimmter Gehirnteile	14
<u>1. 4. Molekulare und zelluläre Mechanismen von Lernen und Gedächtnis</u>	16
1. 4. 1. Die Entdeckung der Bedeutung der cAMP-Kaskade für Lernen und Gedächtnis bei Aplysia	18
1. 4. 2. Molekulare Grundlagen des Langzeitgedächtnisses	23
1. 4. 3. Morphologische Grundlagen der synaptischen Plastizität	26
1. 4. 4. Synaptische Plastizität durch Änderung der Zahl synaptischer Verbindungen	27
1. 4. 5. Langzeitpotenzierung (LTP)	29
1. 4. 6. Die Adenylatzyklase und synaptische Plastizität bei Säugern	31

<u>1. 5. Lernen und Gedächtnis bei Drosophila</u>	33
1. 5. 1. Lernparadigmen	33
1. 5. 2. Pilzkörper und Zentralkomplex: Anatomie und Struktur	35
1. 5. 3. Funktion der Pilzkörper - Störungsmuster pilzkörperloser Fliegen	38
1. 5. 4. Molekulare Mechanismen von Lernen und Gedächtnis bei Drosophila	43
1. 5. 4. 1. Biochemische Lernmutanten	43
1. 5. 4. 2. Speicherung – Wiederabruf – Vergessen	51
1. 5. 4. 3. Molekulare und strukturelle Grundlagen des Langzeitgedächtnisses bei Drosophila	53
<u>1. 6. Fragestellung und Ziel der Arbeit</u>	59
2. Materialien und Methoden	61
2. 1. Fliegen	61
2. 2. Gal4-Technik und UAS _{Gal4} .rut ⁺ -Fliegen	61
2. 3. Immunhistochemie	63
2. 4. Verhaltensexperimente	64
2. 4. 1. Trainingsapparatur	65
2. 4. 2. Standardtraining	67
2. 4. 3. Test des 30 min- und des 4 h- Gedächtnisses	70
2. 4. 4. Test der Geruchsvermeidung	71
2. 4. 5. Test der Vermeidung von Elektroschocks	71
2. 5. Statistik	72
3. Ergebnisse	73
3. 1. Ergebnisse der Lernexperimente und Expressionsmuster der Gal4-Linien	73

3. 2. Langzeitgedächtnis	80
3. 3. Kontrollexperimente	81
4. Diskussion	85
4. 1. Diskussion der Ergebnisse der Lernexperimente und Expressionsmuster der Gal4-Linien	85
4. 2. Vergleich mit den Ergebnissen von J. Connolly (1996) und T. Zars (2000b)	88
4. 3. Diskussion der Ergebnisse von c522 und elav	89
4. 4. 30 min - und 4 h - Gedächtnis	90
4. 5. Aussagekraft und Gültigkeit der Ergebnisse im Gesamt-Kontext	92
5. Resümee, Ausblick und Erörterung der Übertragbarkeit auf menschliches Gedächtnis	93
6. Formale Zusammenfassung	97
7. Literaturverzeichnis	99

Abkürzungsverzeichnis:

Abb. = Abbildung

AC I = adenylyltransferase I

ala = *alpha-lobes absent*

amn = *amnesiac*

AMPA = A-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionate

APV = Aminophosphonovalerat

ARM = anesthesia-resistant memory

BAL = Benzaldehyd

Ca = Calcium

CaM-Kinase = Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase

cAMP = cyclic adenosine-monophosphate

CREB = cAMP-responsive element-binding protein

CS = conditioned stimulus

dCREB = Drosophila CREB

DAB = 3,3'-Diaminobenzidin

ddc = *Dopa-Decarboxylase*

dnc = *dunce*

DKO = double knockout

DPM = dorsal paired medial

f. = folgende

fasII = *fasciclin II*

G-Protein = Guanylnukleotid-bindendes Protein

h = Stunde(n)

HU = Hydroxyurea

KI-MaPKM ζ = dominant negative MaPKM ζ

leo = *leonardo*

LI = Lernindex

LTM = long-term memory

LTP = long-term potentiation

MAPK = mitogen activated protein kinase

MaPKM ζ = dauerhaft aktive atypische Isoform der PKC der Maus

mbd = *mushroom bodies deranged*

mbm = *mushroom body miniature*

MCH = Methylcyclohexanol

min = Minute(n)

MTM = middle-term memory

NMDA = N-Methyl-D-Aspartat

Nf1 = *Neurofibromatose 1*

PACAP = pituitary-adenylyl-cyclase-activating peptide

PBS = phosphate buffered saline

PBT = phosphate buffered triton

PER = proboscis extension reflex

PKA = Proteinkinase A

PKC = Proteinkinase C

PLC = Phospholipase C

rsh = *radish*

rut = *rutabaga*

sec = Sekunde(n)

shi = *shibire*

Tab. = Tabelle

tur = *turnip*

UAS = upstream activating sequence

US = unconditioned stimulus

vol = *volado*

VI = Vermeidungsindex

WT = Wildtyp

1. Einleitung

Seit Beginn der experimentellen Gehirnforschung vor etwa 200 Jahren hat es immer wieder Versuche gegeben, eine der wohl wichtigsten Leistungen des Nervensystems, nämlich die Erinnerungsfähigkeit, zu erklären und im Gehirn zu lokalisieren. Gerade auf dem Gebiet der Gedächtnisforschung sind in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte beim Verständnis der molekularen Mechanismen, die der zeitlichen Struktur des Gedächtnisses zugrundeliegen, erzielt worden. Man ist aber noch sehr weit davon entfernt, mit Sicherheit angeben zu können, *wo* im Gehirn die Erinnerung z. B. an einen Sonntagsspaziergang, ein Gespräch oder auch nur einen Gedanken aufbewahrt sein könnte, ob es dafür spezialisierte Gedächtniszonen gibt, oder ob das Zusammenspiel von Neuronen aus ganz unterschiedlichen Bereichen des Gehirns vonnöten ist.

Karl Lashley (1890-1958) entfernte bei Ratten verschiedene Regionen der Großhirnrinde, um den Sitz des Gedächtnisses zu untersuchen. Er kam zu dem Schluß, daß Gedächtnis wohl auf viele Gehirnregionen verteilt sein müsse (Lashley 1929; 1933). Beim Menschen war das Auftreten von Amnesien nach Beschädigung des mittleren Temporallappens und der Hippocampusformation aufschlußreich. Das Kurzzeitgedächtnis blieb intakt, aber das längerzeitige Gedächtnis war zerstört, wogegen wiederum viele Jahre zurückliegende Erinnerungen noch vorhanden waren. Heute besteht die Möglichkeit der Sichtbarmachung von Hirnprozessen durch bildgebende Verfahren wie die Positronenemissionstomographie (PET). Gedächtnisleistungen ließen sich aber bisher damit noch nicht lokalisieren.

Als man erkannt hatte, daß an Drosophila-Fliegen Lernen und Gedächtnis im Labor getestet werden können (Quinn 1974), bestand die Hoffnung, gerade wegen des relativ geringen Komplexitätsgrades des Organismus und seines Gehirns, sowie der vorbestehenden umfangreichen Charakterisierung der genetischen Ausstattung, grundlegende Einsichten in die Organisation von Gedächtnis zu gewinnen, die aber auch zu einem allgemeinen Verständnis von Gehirnen über die Speziesgrenzen hinweg beitragen sollten; dies wegen der genetischen Gemeinsamkeiten und den gleichen

Herausforderungen der selben Umwelt gegenüber (Heisenberg 1990). Ein erster Schritt war die Entdeckung, daß die Pilzkörper, eine schon von der Geometrie her auffällige Struktur des Zentralgehirns bei Insekten, bei olfaktorischem Lernen und Gedächtnis eine Rolle spielen (Heisenberg 1998). Fliegen, deren Pilzkörper durch verschiedene, unabhängige Methoden zerstört oder durch Expression eines Transgens in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden, haben ein gestörtes Erinnerungsvermögen: Die Pilzkörper sind also *notwendig* für das Geruchslernen (Heisenberg 1985; De Belle 1994; Connolly 1996). Das Gen *rutabaga* (*rut*) kodiert für die Adenylatcyclase Typ I (AC I). Fliegen mit einer Mutation im Gen für die AC I (*rut*-Fliegen) haben u. a. ein gestörtes Geruchs-Gedächtnis (siehe S. 44). In der hier vorgelegten Arbeit wird durch die pilzkörperspezifische Wiederherstellung von *rut* in *rut*-Fliegen gezeigt, daß die Pilzkörper, jedenfalls hinsichtlich der Funktionen des *rut*-Gens, auch *hinreichend* für olfaktorisches Lernen und Gedächtnis sind. Damit wurde zum ersten Mal in einem Lebewesen eine Gedächtnisleistung „positiv“ (durch „wieder-anschalten“) einer Gehirnstruktur zugeordnet, entgegen den Annahmen Lashleys.

1. 1. Grundlagen des Verhaltens

Jedes Tier ist **initial aktiv**. Das jeweilige Verhalten wird nicht durch einen externen Stimulus (Reiz) oder einen internen Stimulus (z. B. Hormone) ausgelöst, sondern das von selbst um seiner Konsequenzen willen hervorgebrachte Verhalten wird dadurch nur moduliert, d. h. in seiner Auftretens**wahrscheinlichkeit** verändert. Dieses Modell kommt ohne „an sich“ vorhandene, jedoch uns unbekannte Reize aus. Die „**Verhaltensdisposition**“ ist die Gesamtheit der zu einer bestimmten Zeit als Wahrscheinlichkeiten repräsentierten Verhaltensoptionen, also der *möglichen* Handlungen und Reaktionen, eines Organismus (Heisenberg 1994b). Man kann jeder Verhaltensoption einen bestimmten Wahrscheinlichkeitswert zuweisen. Diese Wahrscheinlichkeiten ändern sich mit der Zeit und bestimmen in ihrer Gesamtheit die Verhaltensdisposition. Die *Veränderung* der Verhaltensdisposition durch Reize ist **Wahrnehmung** (Heisenberg 1992).

Die mögliche Verhaltenseinheit, also z. B. die Abwendung von einem Geruch oder die Zuwendung zum Licht, wird einerseits **zufällig** „angestoßen“, was bedeutet, daß die Entscheidung für eine bestimmte Verhaltensäußerung nicht determiniert, nicht streng vorhersagbar ist; andererseits durch einen Selektionsprozess gefiltert: „**Darwinesches Prinzip**“ (Heisenberg 1984). Das Ziel dieser ständigen Selektion ist, daß möglichst nur die an die jeweilige Situation und Umwelt angepaßten Verhaltensweisen zur Ausführung gelangen. **Angepaßtheit (Adaptation)** definiert sich letztlich durch den Reproduktionserfolg, also den Erfolg, die eigenen Gene in die nächste Generation zu bringen.

Da bei einer unübersehbaren Vielzahl von wechselnden Umwelanforderungen strikt angeborene Verhaltensweisen überfordert wären, ist es für ein Lebewesen lebensnotwendig ausprobieren, immer wieder völlig neue, unvorhersehbare Strategien entwickeln zu können. Man stellt sich vor, daß Kopien der verhaltenssteuernden Befehle an ein sensorisches Zentrum geschickt werden, wo dann eine Bewertung über den Erfolg der Handlung geschehen kann. Die Kopie des motorischen Programms bezeichnet man als „**Efferenzkopie**“. Die Veränderung des sensorischen „Inputs“, die anzeigt, ob die Handlung erfolgreich war, wird zeitlich mit der eigenen Handlung verglichen, und es erfolgt eine Verstärkung oder eine Abschwächung. Diese als „**Reafferenzprinzip**“ (Holst 1950) bezeichnete Verhaltenssteuerung ist die Grundlage von „**operantem Verhalten**“, also selbst-produziertem Verhalten, das durch die Konsequenzen bestimmt ist (siehe auch 1.2.2.2. „Operante Konditionierung“).

In höher entwickelten Tieren und bei Menschen muß der Versuch im „**trial and error**“ nach der Aktivierung nicht die Schwelle zur tatsächlichen Ausführung überschreiten, sondern kann als „symbolische Handlung“ (Vorstellung, Denken) intern einer Selektion und Bewertung unterliegen. Das könnte man als Einsichtsfähigkeit bezeichnen. Doch auch bei einfachen Tieren treten die „Versuche“ auf, um die Situation zu verändern bzw. um ein Ziel zu erreichen. Eines der Hauptziele ist die Herstellung und Wahrung von „**Orientiertheit**“ (Heisenberg 1984), ein „Wissen“ über die als Verhaltensdispositionen repräsentierte Umwelt im Sinne der Vorhersagbarkeit und Beeinflußbarkeit. In so fern hat auch eine Fliege schon „Einsicht“.

Obwohl das Verhalten ein ständiger kreativer, neues hervorbringender Prozeß ist, ist es aus wiedererkennbaren Modulen aufgebaut, die aber bei höheren Tieren teilweise so miteinander verschliffen und zu einer Einheit verbunden sind, daß man sie nicht mehr ohne weiteres als solche erkennen kann.

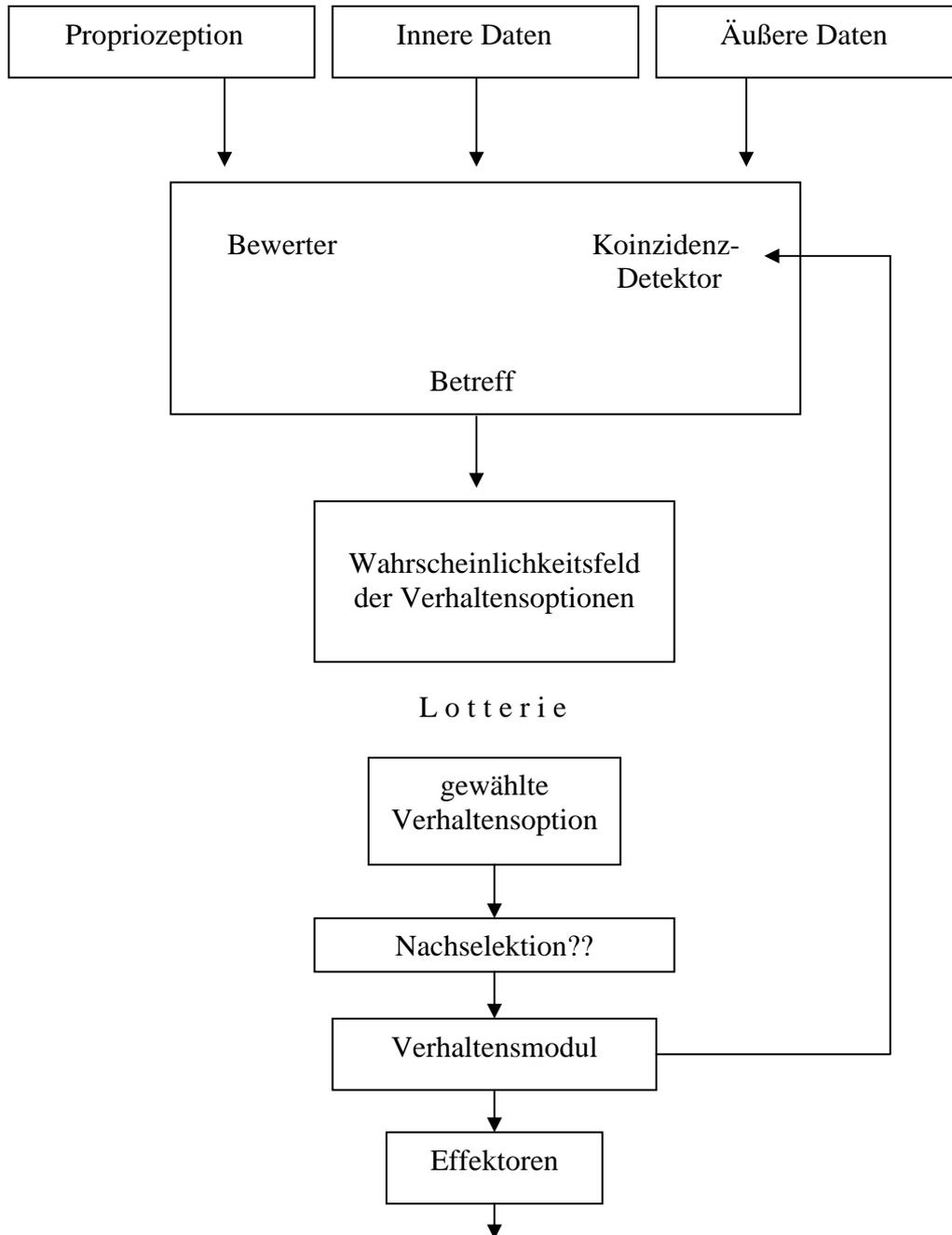


Abb. 1: „Allgemeines Modell zur Beschreibung der probabilistischen Eigenschaft von Verhalten. Das Modell beinhaltet eine Schleife für die Efferenzkopie bezüglich des

operanten Verhaltens und einen Nachselektionsschritt, für dessen Existenz es bei Insekten keine Hinweise gibt“ (Abb. modifiziert nach Heisenberg 1994b; Text ins Deutsche übersetzt)

1. 2. Lernen

Lernen ist die auf Erfahrung basierende Veränderung von Verhaltensweisen oder Verhaltensdispositionen. Lernen setzt eine **Plastizität**, eine Formbarkeit des Verhaltens voraus. Das Verhalten ist plastisch in einer Interaktion zwischen Organismus und Umwelt. Dies hat den Vorteil der besseren Adaptation an Umstände, die im Zeitmaßstab der Evolution instabil, im Zeitmaßstab des Individuums dagegen stabil sind.

Erlernete Verhaltensweisen sind **erworbene** Verhaltensweisen. Dem erworbenen Verhalten stellt man klassischerweise das **angeborene** Verhalten gegenüber. Dieses läßt sich daran erkennen, daß das Lebewesen zu seiner Ausführung keine Erfahrung benötigt. Z. B. kann man Fliegenweibchen isoliert aufziehen und dann feststellen, daß sie mit Männchen der eigenen Spezies bevorzugt kopulieren. Die conspezifischen Männchen haben besser passende „angeborene Auslösemechanismen“ für das Paarungsverhalten als Männchen anderer Arten (Tarpy 1997; S. 2/3). Die Spinne, die beim ersten Versuch ihr Netz perfekt zu spinnen vermag, ist auch ein typisches Beispiel. Häufig muß jedoch das angeborene Verhaltensrepertoire durch Erfahrung reifen.

1. 2. 1. Nicht-assoziatives Lernen

In der Lerntheorie unterscheidet man nicht-assoziatives und assoziatives Lernen (Squire 1999). Nicht-assoziatives Lernen bedeutet eine Veränderung der Reaktionsintensität oder -häufigkeit auf einen einzelnen Reiz, der z. B. mehrfach wiederholt wird. Bei der **Habituation** führt wiederholtes Auftreten eines *harmlosen* Reizes zu einer Verringerung der Reaktion auf ihn. So kann man bei *Drosophila* durch ein

expandierendes visuelles Muster vor der Fliege die Landereaktion, bei der die Beine ausgebreitet werden, hervorrufen. Doch wenn der Fliege nicht die Möglichkeit zur tatsächlichen Landung gegeben wird, d. h. wenn die Beine keinen Kontakt mit dem Untergrund aufnehmen können, wird sie mit der Zeit immer seltener diese Reaktion zeigen. Die Landereaktion ist habituiert. Das ist auch vorteilhaft, denn sinnlose Reaktionen würden unnötig Energie verbrauchen. Damit ist dieser Vorgang eine Anpassung an die Umwelt, also Lernen. Allerdings noch eine einfache Form.

Komplexer ist die zweite Form des nicht-assoziativen Lernens, die **Sensitivierung** („sensitization“ oder auch „pseudoconditioning“): Ein meist *schädlicher* Reiz, z. B. ein elektrischer Schlag, führt dazu, daß ein Versuchstier, z. B. eine Maus, stärker als gewöhnlich auch auf **andere** schwache oder neutrale Stimuli reagiert, etwa auf ein Geräusch. Die Verhaltensänderung ist nicht, wie bei der Habituation, auf den auslösenden Stimulus beschränkt. Das Tier ist alarmiert und die allgemeine Reaktionsbereitschaft gesteigert. Durch einen solchen Reiz kann z. B. auch die oben erwähnte Habituation der Landereaktion wieder rückgängig gemacht werden. Dies bezeichnet man als **Dishabituation**. Bei *Drosophila* konnte gezeigt werden, daß Sensitivierung und Dishabituation unterschiedliche Vorgänge sind (unveröffentlichtes Ergebnis von Z. Asztalos; persönliche Mitteilung M. Heisenberg).

1. 2. 2. Assoziatives Lernen

Beim assoziativen Lernen tritt nicht nur eine einfache Modulation der Verhaltensreaktion auf, sondern hier wird eine Verknüpfung, eine Assoziation zwischen zwei Reizen oder aber einem Reiz und einem selbstproduzierten, zielgerichteten Verhalten hergestellt. Dies führt dazu, daß fortan Reize mit neuen Reaktionen gekoppelt sind bzw. daß das eigene Verhalten reizbezogen moduliert wird. Je nachdem ob das Verhalten des Tieres mit dem Reiz in einer Wechselwirkung steht, oder ob dieser Reiz ganz unabhängig vom Verhalten des Tieres, aber erkennbar mit einem anderen Reiz (Verstärker) gekoppelt ist, spricht man einerseits von **operanter** oder andererseits von **klassischer Konditionierung** (Tarpy 1997).

1. 2. 2. 1. Klassische Konditionierung

Die klassische Konditionierung wurde von dem russischen Physiologen Iwan Pawlow (1849-1936) beschrieben. Bei einem seiner Experimente ließ er z. B. bei Hunden gleichzeitig mit der Futtergabe eine Glocke ertönen und stellte fest, daß nach diesem „Training“ die Glocke alleine ausreichend war, um Speichelfluß auszulösen. Der Ton wurde mit Futter assoziiert und hat die Fähigkeit erlangt, in der „Testsituation“ selbst die Reaktion hervorzurufen, die vorher nur durch das Futter ausgelöst worden war. Allgemein kann man sagen, daß bei der klassischen Konditionierung die zeitliche Paarung von einem **neutralen Stimulus** (z. B. Ton; Duft; Umgebung) und einem nicht-neutralen Stimulus (z. B. Elektroschock; Futter-Belohnung), den man im Gegensatz zu dem zu konditionierenden neutralen Stimulus **als un konditionierten Stimulus (US; unconditioned stimulus)** bezeichnet, erkannt und gespeichert wird. Das Verhalten des Tieres hat während des Trainings keinen Einfluß auf die auftretenden Stimuli.

Der US (z. B. Futter) löst eine unkonditionierte Reaktion aus (z. B. Speichelfluß), die angeboren ist oder zumindest nicht erlernt werden muß und die von dem neutralen Stimulus (Glocke) zunächst nicht hervorgerufen wird. Aber durch die Konditionierung wird der neutrale Stimulus zum Prädiktor des US und löst auch ohne US-Präsentation die unkonditionierte Reaktion aus. Der neutrale Stimulus ist zu einem **konditionierten Stimulus** geworden (**CS; conditioned stimulus**; Glocke im obigen Beispiel). Der US, der auch als Verstärker bezeichnet wird, kann ein negativer Verstärker mit noxischer, also schädigender Wirkung sein, beispielsweise ein Elektroschock. Man spricht dann von **konditionierter Aversion**. Ein solcher negativer Verstärker wird im folgenden als „**Bestrafung**“ oder „**Strafreiz**“ bezeichnet. Oder der US kann ein positiver Verstärker, wie z. B. Futter oder die Entfernung eines unangenehmen Reizes sein. Man spricht dann von **konditionierter Appetenz**. Im folgenden wird ein solcher Verstärker als „**Belohnung**“ bezeichnet. Der Verstärker ist normalerweise von biologischer Relevanz für das Tier und löst vorhersagbar eine starke Reaktion aus, wogegen der CS alleine eventuell nur eine schwache Orientierungsreaktion auslöst.

Entscheidend ist, daß die beiden zu assoziierenden Reize gleichzeitig auftreten, wogegen es bei der Sensitivierung nicht auf die Gleichzeitigkeit der beiden verschiedenen Reize ankommt. Dadurch kann der CS aus der Fülle der Reize, die ständig vorhanden sind und als Kontext bezeichnet werden, herausgehoben und als bedeutsam erkannt werden. Bei Konditionierungsexperimenten mit Ratten kam es jedoch nicht so sehr darauf an, daß *jeder* CS (Ton) mit einem US (Elektroschock) gepaart war, aber wenn Elektroschocks ohne zeitliche Paarung mit einem Ton gegeben wurden, sank die Stärke der Konditionierung (Rescorla 1968). Allerdings führt die *längerzeitige* Präsentation des CS ohne US zur Auslöschung (**Extinktion**) der erlernten Reaktion, da der CS nicht mehr zur Vorhersage des US geeignet ist. D. h. das Tier wird nach dem Vorgang der Extinktion seltener mit der unconditionierten Reaktion auf die alleinige CS-Präsentation reagieren als vorher. Ob Extinktion eine Abschwächung der ursprünglichen Koppelung oder ein neuer Lernvorgang ist, der das zuvor gelernte übertrumpft, wurde bislang kontrovers diskutiert. Das Ergebnis einer neueren Arbeit über Extinktion bei *Drosophila* spricht für die erstere These (Schwaerzel 2002).

Wesentlich ist die *Reihenfolge* von CS und US: Es ist erwiesen, daß der CS vor dem US auftreten muß, um gelernt zu werden. Bei umgekehrter Reihenfolge findet kein Lernen statt. Das ist auch biologisch sinnvoll, da der CS als Prädiktor für den als wichtig oder gefährlich erachteten US dienen soll (Tarpy 1997). Außerdem muß der zeitliche Abstand von CS und US innerhalb gewisser Grenzen liegen: Bei der Konditionierung des Lidschlagreflexes des Kaninchens erwies sich ein Intervall von 0.2 - 0.4 sec als optimal, wogegen schon ein Abstand von weniger als 0.06 sec und mehr als 0.7 sec das Lernen verschlechterte (Coleman 1971).

Nicht alle Reize werden gleich gut miteinander assoziiert: Beim „Futter-Vermeidungs-Lernen“ wird die pharmakologisch ausgelöste Übelkeit, die auf die Nahrungsaufnahme folgt, auch dann noch mit dem spezifischen Geschmack der Nahrung assoziiert, wenn zwischen den beiden Reizen ein Zeitraum von bis zu mehreren Stunden liegt. Man könnte sich vorstellen, daß zur Überbrückung dieses Zeitraumes ein latentes „Arbeitsgedächtnis“ (siehe S. 11) gebildet wird, dem dann rückwirkend Bedeutung beigemessen wird, wenn die Übelkeit eintritt (wobei das eigentliche assoziative

Gedächtnis definitionsgemäß erst mit dem Auftreten der Übelkeit gebildet wird). Es wird *nur* Übelkeit, nicht eine andere „Bestrafung“, als US, bzw. *nur* der Geschmack, nicht ein anderer CS, auf den Übelkeit folgt, als CS gelernt. Hier liegt also ein *angeborenes* Prinzip vor, das das Lernen in eine bestimmte für das Überleben sinnvolle Richtung lenkt (Squire 1999).

1. 2. 2. 2. Operante Konditionierung

Die operante oder instrumentelle Konditionierung, die auch Lernen am Erfolg genannt werden kann, wurde von Edward Thorndike (1874-1949) entdeckt und systematisch von B. F. Skinner (1904-1990) untersucht. Sie basiert auf operantem Verhalten (siehe 1.1.). Thorndike sperrte eine Katze in einen Käfig. Außerhalb des Käfigs befand sich eine Futterquelle. Durch Berührung eines Riegels konnte eine Türe zum Futter geöffnet werden. Wenn die Katze auf der Suche nach einer Möglichkeit, das Futter zu erreichen den Riegel berührte, öffnete sich die Türe. Die Koinzidenz von Riegelbetätigung und offener Türe wurde erkannt, und mit der Zahl der Trainingsperioden verkürzte sich die Zeit bis zum Öffnen der Türe. Die Katze hat also gelernt, daß durch den Riegel die Türe geöffnet werden kann und das Verhalten nun aktiv zur Erreichung des Ziels eingesetzt (Thorndike 1911; Tarpay 1997; S. 220). Hier wird ein spontan produziertes eigenes Verhalten mit dem US (Erreichen des Futters; Erfolg) verknüpft.

Allerdings hat Thorndike noch mehr Wert auf die Assoziation von Reiz (räumliche Nähe zum Hebel) und Reaktion (Drücken des Hebels) gelegt, wogegen Skinner die Assoziation zwischen dem operanten Verhalten und dem Verstärker sah. Er hat den Versuchsaufbau in der „Skinner-Box“, in der z. B. Ratten und Vögel operant konditioniert werden können, so erweitert, daß das zu lernende Verhalten nicht immer zum Erfolg führt, sondern nur dann, wenn es gleichzeitig mit einem zusätzlichen Stimulus, etwa dem Aufleuchten eines bestimmten Lichts, erfolgt, welcher anzeigt, daß die Bedingung für eine *erfolgreiche* Handlung gegeben ist. Diese Art des CS bezeichnet man als *diskriminativen Stimulus*, und damit liegt der Schwerpunkt auf der Assoziation von Verhalten und Verstärker (Skinner 1966). Allerdings geschieht sowohl bei den

soeben beschriebenen Experimenten das erste oder zweite Berühren des Riegels nicht, indem das Versuchstier durch einen Ausrutscher anstößt: „...das Tier löst ein Problem, das nie vorher von diesem Tier oder einem seiner Vorfahren gelöst worden war...es hält den Hebel nicht für eine Wurzel, unter der es graben möchte und es betätigt ihn nicht aus Versehen, z. B. indem es auf diese Seite des Käfigs fällt. Es gehört zur Natur der Ratte, nach unkonventionellen Lösungen für neue Probleme zu suchen.“ (Übersetzung aus Heisenberg 1984; S. 223).

1. 2. 2. 3. Konditionierung als therapeutische Technik

Die Technik der *systematischen Desensitivierung* nutzt das Phänomen der Extinktion. In der therapeutischen Situation tritt Extinktion dann auf, wenn etwa die bisher vermiedene Situation (der CS) oder das eigene unerwünschte Verhalten (z. B. Erröten in Gesellschaft) nicht von einem Verstärker begleitet wird. Bei Patienten mit phobischer Angst, z. B. Tierphobien, wurde die systematische Desensitivierung besonders häufig angewandt. Die Patienten sollen in entspanntem Zustand zuerst für sie wenig bedrohliche Situationen in der Vorstellung durchspielen, etwa die allmähliche Annäherung an ein Spinnennetz, dann die Bedrohlichkeit steigern und schließlich nach dem selben Schema an wirkliche Situationen herangehen. Dadurch, daß bei einer wenig bedrohlichen oder nur vorgestellten Situation keine Angst (US) oder keine Ursache auftritt, die vielleicht ursprünglich die Angst ausgelöst hatte, wird die Verknüpfung mit dem CS (bedrohliche Situation) gelockert oder „extingiert“.

Das „*Biofeedback*“ beruht auf operanter Konditionierung. Unbewußt erzeugte Veränderungen z. B. der Muskelspannung werden dem Patienten sichtbar gemacht, so daß eine Verstärkung oder Abschwächung erfolgen kann (Kandel 1996; S. 680).

1. 3. Gedächtnis

1. 3. 1. Grundlagen des Gedächtnisses

Gedächtnis ist das Resultat von Lernen. Man unterscheidet verschiedene Phasen des Gedächtnisses. Der amerikanische Philosoph William James (1841-1910) machte als erster die Unterscheidung zwischen **Kurz-** und **Langzeitgedächtnis**. Das Kurzzeitgedächtnis, das er als „primäres Gedächtnis“ bezeichnete, dauere Sekunden bis Minuten an. Das Langzeitgedächtnis, von ihm „sekundäres Gedächtnis“ genannt, kann Wochen, Monate oder das ganze Leben lang bestehen (James 1890). Später wurde noch weiter differenziert: Kognitive Psychologen unterscheiden zwei Komponenten des Kurzzeitgedächtnisses: Das **unmittelbare Gedächtnis** („immediate memory“) und das **Arbeitsgedächtnis** („working memory“). Das unmittelbare Gedächtnis (manchmal auch als „Ultrakurzzeitgedächtnis“ bezeichnet) dauert nur wenige Sekunden an und kann ungefähr sieben Posten, also z. B. sieben Zahlen aufnehmen und behalten. Wenn man es nicht aktiv durch ständiges Wiederholen aufrecht erhält, verschwindet es innerhalb von maximal 30 Sekunden. Man kann es aber durch aktives Wiederholen ausdehnen, was dann als „Arbeitsgedächtnis“ (Baddeley 1974) bezeichnet wird. Der Begriff „Kurzzeitgedächtnis“ bezieht sich aber auch auf spätere Konsolidierungsphasen, bis zur Ausbildung von Langzeitgedächtnis. „In diesem Sinne können Kurzzeiterinnerungen viele Minuten lang - vielleicht sogar eine Stunde oder länger – und damit weit über den Punkt hinaus überdauern, bis zu dem Information aktiv im Gedächtnis behalten wird“ (Squire 1999; S. 93).

Man unterscheidet außerdem 4 Phasen der Gedächtnisverarbeitung: Die **Kodierung**, also die Aufnahme der Information ins frühe Kurzzeitgedächtnis, die **Konsolidierung**, die **Speicherung** und den **Wiederabruf** (Kandel 2000; S.1237). Man könnte auch noch die „Phase“ des **Vergessens** hinzufügen.

Der Übergang von einer instabilen, kurzlebigen Form in eine stabilere langlebige Form wird als **Konsolidierung** bezeichnet. Vor Abschluß der Konsolidierungsphase ist das Gedächtnis anfällig gegenüber Störfaktoren wie z. B. Elektroschocks oder Hypoxie.

Nach der Konsolidierung wird die Erinnerung im Langzeitgedächtnis **gespeichert**, ist dort jedoch nicht für immer gesichert: Zum Gedächtnis gehört auch das **Vergessen**. Hier kann man unterscheiden zwischen der Auslöschung des Gedächtnisinhalts, also dem unwiederbringlichen Verlust der Gedächtnisinformation, und der schlichten Unfähigkeit, das nach wie vor gespeicherte Material **wieder abzurufen** („retrieval“). Daß Gedächtnisverlust nicht die völlige Auslöschung der Information bedeuten muß, kann man z. B. daran sehen, daß der Gedächtnisverlust nach Hirnverletzungen teilweise reversibel ist. Das Wiederabrufen kann ungenau sein und ist als konstruktiver Prozess anzusehen, bei dem verschiedene Arten von Informationen aus verschiedenen Gehirnbereichen kombiniert werden (Kandel 2000; S. 1238). Das Vergessen kann beschleunigt werden durch Interferenz mit neuer Information („proactive interference“): Etwas schon gelerntes behindert die Neuaufnahme und Speicherung einer Information in der Zukunft; oder durch Interferenz mit früherer Information („retroactive interference“): Neu erlerntes verursacht das Vergessen älterer Erinnerungen. Das Vergessen kann auch durch Extinktion (siehe S. 8 und S. 52) beschleunigt werden, indem der CS auftritt, ohne daß ein US auf ihn folgt (DeZazzo 1995; Tarpay 1997; Squire 1999; Eichenbaum 2002).

1. 3. 2. Krankhafte Störungen des Gedächtnisses

Wie so oft hat man auch in der Gedächtnisforschung Einblicke in die normale Funktion durch das Studium von beeinträchtigtem oder *krankhaft verändertem Gedächtnis* (Amnesien) erhalten. 1882 hat der französische Philosoph und Psychologe Theodore Ribot festgestellt, daß bei Patienten mit *Schädel-Hirn-Trauma* oder anderen Hirnschädigungen, bei denen das Gedächtnis gestört war, weit zurückliegende Erinnerungen in geringerem Maße betroffen waren als erst kürzlich erworbene. Das **Ribot'sche Gesetz** („Ribot's law“; „law of regression“) besagt, daß sich der Gedächtnisverlust umgekehrt zur Zeitdauer zwischen zu erinnerndem Ereignis und Zeitpunkt der Verletzung verhält. Weiter zurückliegende Ereignisse werden besser erinnert. Ein Befund, der für die unterschiedliche Organisation verschiedener Gedächtnisphasen spricht (Eichenbaum 2002; S.21). Den Gedächtnisverlust für

Ereignisse vor dem Unfall bezeichnet man als **retrograde Amnesie**, die Schwierigkeit beim Speichern neuer Inhalte (nach dem Unfall) als **anterograde Amnesie**. Die retrograde Amnesie umfaßt in der Regel einen kurzen Zeitabschnitt, verglichen mit der wesentlich länger andauernden anterograden Amnesie, was ebenso für die unterschiedliche Organisation der Gedächtnisphasen spricht.

Das *Korsakow-Syndrom*, das auch den Namen „amnestisches Psychosyndrom“ trägt, wurde 1887 von Sergei Korsakoff beschrieben (Eichenbaum 2002; S.22). Diese Form der Amnesie, auf die auch das Ribot'sche Gesetz zutrifft, kommt im Rahmen von „exogenen“ Psychosen, besonders bei Alkoholismus, aber auch beim Malabsorptionssyndrom vor. Man findet häufig beidseitige Atrophien von Strukturen des Zwischenhirns (Thalamus, Hypothalamus, Corpora Mamillaria), was auf deren Bedeutung für das Gedächtnis hinweist. Schädigungen dieser limbischen Gehirnregionen sowie des Hippocampus durch Schlaganfälle (bilaterale Thalamusinfarkte), Infektionen (Herpesenzephalitis) oder Tumoren können gleichartige Amnesien erzeugen, jedoch in der Regel nur, wenn die Schädigung bilateral vorliegt. Bilaterale Schädigungen sind für systemische Beeinträchtigungen, z. B. die Hypoxie typisch, die im übrigen den Hippocampus wegen seiner besonderen Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffmangel als eine der ersten Hirnregionen betrifft. Einseitige Schädigungen führen zu weniger ausgeprägten Störungen, die, je nach Gehirnhälfte, sprachbezogen oder nicht sprachbezogen sind.

Beim *Morbus Alzheimer* finden sich Degenerationen vor allem im Frontal- und Temporallappen, sind also kortikal lokalisiert. Deswegen wird die Alzheimer-Amnesie auch als *kortikale* Amnesie bezeichnet, im Gegensatz zur *axialen* oder *subkortikalen* Amnesie bei Zwischenhirnschädigungen (Korsakow-Syndrom; siehe oben) oder subkortikalen Demenzen wie dem Morbus Parkinson. Bei der kortikalen Amnesie ist der Gedächtnisverlust meist schwerer ausgeprägt als bei der subkortikalen. Betroffen sind vor allem der Wortschatz und das abstrakte Denken. Bei der subkortikalen Amnesie ist der Defekt meist nicht komplett. Bestimmte Einzelheiten können erinnert werden. Die Erinnerungslücken werden jedoch durch erfundenes Material ergänzt, was man als Konfabulation bezeichnet. Meist ist auch die zeitliche Reihenfolge der

Ereignisse nicht korrekt. Außerdem kann dem Ereignis kein situativer und zeitlicher Kontext zugeordnet werden, was man als „**Quellenamnesie**“ bezeichnet. Der aktive Abruf und die Rekonstruktion autobiographischer Ereignisse ist gestört. Eigene Vorhaben werden vergessen: Störung des „**prospektiven**“ Gedächtnisses. Im Gegensatz zur Alzheimer-Amnesie sind das Wortgedächtnis, soziale Gewohnheiten, automatisierte Bewegungen, also der Komplex des „impliziten“ Gedächtnisses (siehe unten) gut erhalten. Apraxie und Agnosie, typische kortikale Störungen, sind nicht vorhanden. Dagegen sind die Orientierung zur eigenen Person, die Aufmerksamkeit und die Geschwindigkeit des Denkens stärker beeinträchtigt als bei der kortikalen Amnesie. Die Alzheimer-Amnesie ist durch ein Vorwiegen der anterograden Amnesie-Komponente zu Beginn der Erkrankung mit späterem Hinzutreten der retrograden Komponente gekennzeichnet. (Adams 2001, S. 447-457; Rahmann 1988, S. 288-292; Schmidt 1991, S. 127-136; Squire 1999; Kunze 1999).

Eine besondere und harmlose Form der Amnesie ist die „*transiente globale Amnesie*“, ein vorübergehender (ca. 24 h andauernder) Ausfall der Gedächtnisfunktion, der in der Regel völlig reversibel ist. Die Pathogenese ist unklar, Ischämien der Temporallappen stehen zur Debatte. (Kunze 1999, S. 800).

1. 3. 3. Erkenntnisse auf Grund operativer Entfernung bestimmter Gehirnteile

Weitere Schritte zur Lokalisation des Gedächtnisses gingen soweit, Gehirnareale gezielt operativ auszuschalten, um feststellen zu können, wie sich dies auf das Lernverhalten auswirkt. In den zwanziger Jahren trainierte Karl Lashley Ratten, durch ein einfaches Labyrinth zu laufen. Danach entfernte er Teile des Cortex und testete nach 20 Tagen das Erinnerungsvermögen im Labyrinth. Er kam zu dem Schluß, daß die Abnahme des Gedächtnisses nicht vom spezifischen Ort, sondern von der Gesamtgröße des kortikalen Bereichs abhängt, der entfernt worden war. Diesen Zusammenhang bezeichnete er als **Massenwirkung**. Er vermutete auch, daß verschiedene Hirnregionen sich funktionell gegenseitig vertreten könnten: Prinzip der **Äquipotentialität**. Diese Ergebnisse wurden allerdings kritisiert, da nicht nur Areale des Cortex, sondern auch Bereiche des

Hirnstamms für das Gedächtnis notwendig sein könnten, und da sich in diesem speziellen Verhaltensexperiment unterschiedliche Informationskanäle (visuelle, olfaktorische und kinästhetische Orientierung) gegenseitig vertreten könnten, die möglicherweise an bestimmte Gehirnregionen gebunden sind (Lashley 1929; 1933; 1950; Squire 1999).

Die bahnbrechenden Arbeiten des Neurochirurgen Wilder Penfield (Penfield 1959) am eröffneten Gehirn von Epilepsiepatienten lenkten die Aufmerksamkeit auf den medialen Temporallappen und den Hippocampus. Penfield, der zur Behandlung schwerer Epilepsien Teile des Temporallappens entfernte, reizte vorher am schmerzunempfindlichen Gehirn des wachen Patienten Teile des Cortex elektrisch, um sprachrelevante Gehirnareale nicht mitzuentfernen. Dabei konnte der Patient die Wahrnehmungen, die dabei entstanden, sprachlich mitteilen. Reizung im Temporallappen führte mitunter zu zusammenhängenden Erinnerungen und Vorstellungen aus der Vergangenheit. Reizungen an der gleichen Stelle führten immer wieder zu den selben Rückblenden, die sich teilweise durch großen Detailreichtum auszeichneten. In anderen Cortexarealen konnten keine solchen Empfindungen erzeugt werden.

Eine weitere Bestätigung der Bedeutung des Temporallappens waren die Befunde am Patienten „H. M.“, dem wegen einer schweren Epilepsie ein Teil des Temporallappens einschließlich der vorderen zwei Drittel des Hippocampus *beidseits* entfernt wurde. Die Folge war, daß zwar das Kurzzeitgedächtnis erhalten blieb, aber Inhalte nicht länger als wenige Minuten gespeichert werden konnten. Z. B. konnte er Zahlenreihen genau so gut nachsprechen wie normale Kontrollpersonen, vergaß aber schon nach kurzer Ablenkung die Zahlen und auch die Tatsache, daß er schon eine Zahlenreihe nachgesprochen hatte. Gleichzeitig war die Erinnerung an Ereignisse aus der Kindheit und lange vor der Operation erhalten. Offenbar ist die Hippocampusregion für den Transfer des Kurzzeitgedächtnisses ins Langzeitgedächtnis notwendig, aber selbst nicht der Sitz des Langzeitgedächtnisses. Allerdings konnte „H. M.“ seine Fähigkeit, die Umrisse eines Sterns nachzuzeichnen, den er nur im Spiegel sehen konnte, durch Übung von Tag zu Tag verbessern. Er konnte sich aber nicht daran erinnern, die Übung schon einmal

gemacht zu haben. D. h. bewußtes und sprachlich ausdrückbares „Wissen“ benötigt den Hippocampus als Relaisstation für das Langzeitgedächtnis, das langfristige Erlernen von Fähigkeiten und Bewegungen ist Hippocampus-unabhängig. Ersteres bezeichnet man als **deklaratives** oder **explizites Gedächtnis**, letzteres als **prozedurales** oder **implizites Gedächtnis**. Beim deklarativen Gedächtnis unterscheidet man noch das **semantische Gedächtnis** (Faktenwissen): die Kenntnis allgemeiner Sachverhalte wie geschichtlicher Daten oder des sprachlichen Wortschatzes; sowie die Erinnerung an Fakten aus der eigenen Biographie: **episodisches Gedächtnis**. Letzteres ist bei Hippocampusschädigungen schwerer betroffen als das semantische Gedächtnis. Die Beeinträchtigung des semantischen Gedächtnisses gilt als typisches Merkmal der Alzheimer-Amnesie (Milner 1966; Tulving 1972; Kunze 1999; S. 800).

Bald nach dem Bekanntwerden des Falles „H. M.“ wurden Versuche unternommen, Amnesien im Tiermodell künstlich zu erzeugen (nach „H. M.“ wurden Hippocampektomien bei Menschen in dieser Form natürlich nicht mehr durchgeführt). Bei Affen wurde gezeigt, daß die bilaterale Entfernung von Hippocampus und Amygdala eine anterograde Amnesie im Objektunterscheidungslernen bewirkt. Das Erlernen motorischer Fähigkeiten war dagegen, wie bei „H. M.“ unbeeinträchtigt. Das Ribot'sche Gesetz, also die bessere Erinnerung an weiter zurückliegende Ereignisse, welche bei den Versuchstieren natürlich besser kontrollierbar und besser bekannt waren als bei zufällig verunfallten oder bei hippocampektomierten Patienten, traf auch auf die Amnesien der operierten Affen zu (Mishkin 1987; Eichenbaum 2002).

Die zuletzt genannten Befunde sprechen insgesamt gegen die „Massenwirkung“ von Lashley: Die Hippocampusregion zeichnet sich vor anderen Hirnarealen durch ihre Unentbehrlichkeit bei der Formierung von Langzeitgedächtnis aus.

1. 4. Molekulare und zelluläre Mechanismen von Lernen und Gedächtnis

Ende des 19. Jahrhunderts formulierte der Neuroanatom Ramón y Cajal (1852-1934) eine revolutionäre Hypothese, die heute als Hypothese der synaptischen Plastizität

bezeichnet wird. Diese besagt, daß die Stärke der synaptischen Verbindung zwischen den Neuronen modifizierbar ist, d. h. daß sich die Effizienz ändern kann, mit der ein präsynaptisches Neuron ein postsynaptisches Neuron aktiviert (oder hemmt). Diese Änderung sei von der Aktivität der Neurone abhängig und die Grundlage für Lernvorgänge. Cajal hat diese Hypothese unter anderem auf Grund der Beobachtung aufgestellt, daß in Gehirnen höher entwickelter Spezies mehr synaptische Verbindungen zwischen den Nervenzellen bestehen als bei weniger hochentwickelten. Er schloß, daß dies die Basis für die höheren „intellektuellen“ Fähigkeiten der höher entwickelten Spezies sei, und vermutete, daß Übung die Zahl und Stärke solcher Verbindungen steigern könne (Eichenbaum 2002; S. 9). Die Entstehung zusätzlicher Neurone zur Speicherung von Erlerntem schien lange Zeit nicht in Frage zu kommen, da Neurone im adulten Organismus ihre Teilungsfähigkeit in der Regel verloren haben, jedoch konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß Neubildung von Neuronen aus neuronalen Stammzellen (Neuroblasten) im Hippocampus von Ratten, Mäusen und Menschen in geringem Maße vorkommt (Cameron 1999; Kempermann 1998; Eriksson 1998).

Inzwischen sind die molekularen Mechanismen, die mit synaptischer Plastizität einhergehen, teilweise bekannt. Sie sind bei *Drosophila*, Mäusen und *Aplysia* sehr ähnlich. Sie werden zunächst bei *Aplysia*, wo sie entdeckt wurden, erläutert. Dann wird auf molekulare und zelluläre Mechanismen des Gedächtnisses bei Mäusen eingegangen. Nach dieser allgemeinen Einführung wird in Kapitel 1.5. der Stand der Gedächtnisforschung bei *Drosophila* erläutert, worauf die Ergebnisse (Abschnitt 3) dieser Doktorarbeit bezüglich der Lokalisierung des Geruchsgedächtnisses bei *Drosophila* dargestellt werden. Zum Schluß wird kurz die Zulässigkeit speziesübergreifender Vergleiche bezüglich der bei *Drosophila* gewonnenen Erkenntnisse erwogen (Abschnitt 5).

1. 4. 1. Die Entdeckung der Bedeutung der cAMP-Kaskade für Lernen und Gedächtnis bei Aplysia

Die Meeresschnecke Aplysia, auch Seehase genannt, besitzt ca. 20 000 Nervenzellen, die in mehreren Ganglien gruppiert sind. Dieses einfach gebaute Weichtier besitzt die Fähigkeit zu Habituation, Sensitivierung und assoziativem Lernen (Kandel 2000; Squire 1999). Wenn man den Siphon (Atemröhre) der Schnecke berührt, zieht er sich zusammen (Siphonrückziehreflex) und die Kieme, das äußerlich gelegene Atmungsorgan, zieht sich unter den Mantelrand zurück (Kiemenrückziehreflex) (siehe Abb. 2). Diese Reflexantwort ist habitulierbar. Wiederholte Berührung des Siphons führt zu immer schwächeren Retraktionen. Das Gedächtnis bleibt nach 10 Berührungen etwa 10-15 min erhalten (Kurzzeithabituation). Wenn man dieses Training an 4 aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt, bleibt die Erinnerung bis zu 3 Wochen lang erhalten (Langzeithabituation).

Die Habituation kommt dadurch zustande, daß die sensorischen Neurone des Siphons bzw. dazwischengeschaltete Interneurone die jeweiligen Motoneurone der Kieme durch Ausschüttung von weniger Transmitter weniger stark erregen. Bei langzeithabituierten Tieren kommt es auch zu einer Verringerung der Anzahl an präsynaptischen Endigungen (siehe 1.4.4.).

Welche molekularen Vorgänge zu veränderter Transmitterausschüttung führen, wurde bei der Untersuchung der Sensitivierung des Kiemenrückziehreflexes entdeckt. Dafür wird am Schwanz ein elektrischer Schlag gegeben, was zur Folge hat, daß die Kieme auf eine Berührung des Siphons hin stärker als gewöhnlich zurückgezogen wird. Diese Form des Lernens ist im Gegensatz zur homosynaptischen Habituation, die innerhalb der direkten Verbindung von sensorischem Siphonneuron und motorischem Kiemenneuron stattfindet, heterosynaptisch.

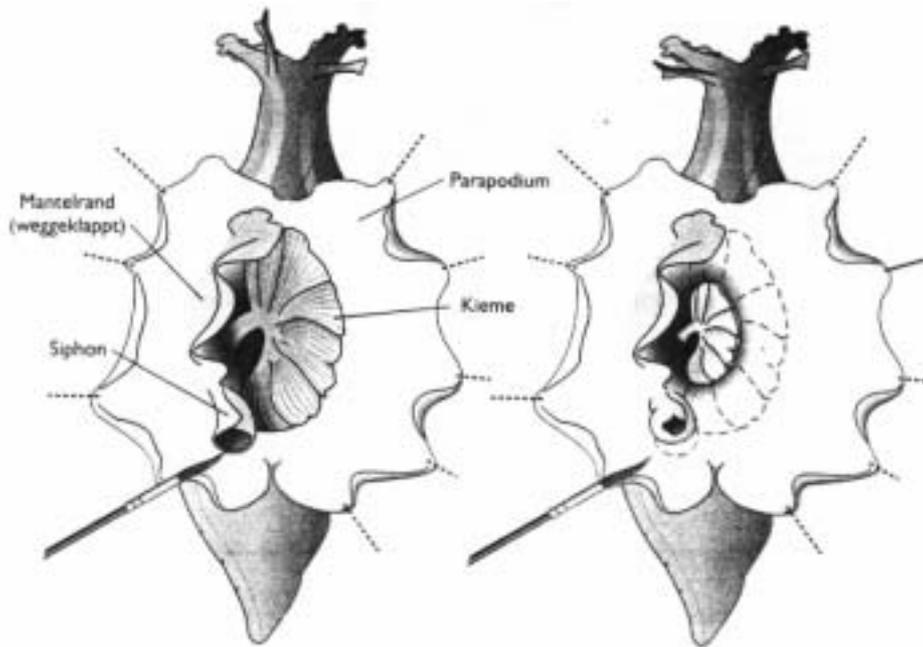


Abb. 2: Kiemerückziehreflex bei *Aplysia*. Eine Berührung des Siphons führt zu seiner Kontraktion und zum Zurückziehen der Kieme unter den Mantelrand (Abb. aus Squire 1999; S. 40).

Als drittes Neuron ist das sensorische Schwanzneuron, das den Elektroschock über eine Reihe modulierender Interneurone weiterleitet, beteiligt. Es bewirkt am sensorischen Siphonneuron eine Erhöhung der Transmitterausschüttung, was zu einer stärkeren Retraktion der Kieme führt. Die modulierenden Interneurone setzen Serotonin frei, das am sensorischen Siphonneuron einen 7-Helix-Transmembranrezeptor aktiviert. Dieser aktiviert über ein stimulatorisches G_s -Protein (guanylnukleotidbindendes Protein) eine Adenylatzyklase, ein membranständiges Enzym, das aus ATP den sekundären Botenstoff („second messenger“) cAMP herstellt (siehe Abb. 3).

Das G_s -Protein besteht im inaktiven Zustand aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Solange GDP an das Protein gebunden ist, ist es inaktiv. Die Aktivierung des Transmembranrezeptors durch einen Transmitter führt zum Austausch von gebundenem GDP gegen GTP. Die α -Untereinheit mit dem gebundenen GTP dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Untereinheit ab und aktiviert die Adenylatzyklase. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität wird GTP wieder zu GDP hydrolysiert, wodurch der inaktive Zustand

wiederhergestellt wird (zur Bedeutung des G-Proteins für das Gedächtnis von *Drosophila* siehe S. 39).

Das von der AC synthetisierte cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Die PKA besteht aus 2 regulatorischen und 2 katalytischen Untereinheiten. Da die regulatorischen Untereinheiten die katalytischen hemmen, ist der Proteinkomplex inaktiv. Wenn cAMP an die regulatorischen Einheiten bindet, erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch sie sich von den katalytischen Einheiten lösen. Diese können nun Zielproteine an Threonin- und Serinresten phosphorylieren und dadurch deren Aktivität verändern.

Diese Signaltransduktionkaskade hat die Eigenschaft, am Rezeptor ankommende Signale zu verstärken, indem z. B. ein Rezeptor viele G-Proteine aktiviert, die ihrerseits noch mehr Adenylatzyklasen aktivieren. Sie ist nicht neuronenspezifisch sondern wird in vielen unterschiedlichen Körperzellen benutzt: Z. B. wird in Epithelzellen der Chloridionenkanal (CFTR-Protein) von der durch cAMP aktivierten PKA phosphoryliert und dadurch geöffnet. Im Glykogenstoffwechsel führt die Phosphorylierung von Enzymen durch die PKA zum Abbau von Glykogen (Stryer 1996; S. 363). Man findet dieses second-messenger System schon bei Bakterien (Squire 1999; S. 60). Das bedeutet, daß sich in der Evolution kein völlig neuer molekularer Mechanismus herausgebildet hat, um Lernen (in diesem Fall noch nicht-assoziatives Lernen) zu ermöglichen, sondern daß auf ein schon vorhandenes Signalsystem zurückgegriffen wurde, welches auch anderen Zwecken dient (Squire 1999; S. 60).

Von der aktivierten PKA führt der Weg zur Erhöhung der Transmitterausschüttung über eine Phosphorylierung von K^+ -Kanälen. Dadurch verlängert sich die Repolarisationsphase des Aktionspotentials, da die Phosphorylierung bewirkt, daß weniger K^+ -Ionen ausströmen können. Das hat einen längeren Ca^{2+} -Einstrom und damit eine stärkere Transmitterausschüttung zur Folge. Die PKA bewirkt durch Phosphorylierung anderer Proteine auch eine stärkere Vesikelmobilisierung aus einer Vesikelspeicherregion hin zur „aktiven Zone“, wo die Transmitter abgegeben werden. Serotonin aktiviert außerdem über einen zweiten Transmembranrezeptor, ein G_0 -Protein

und die Phospholipase C (PLC) die Proteinkinase C (PKC). Zur Vesikelmobilisierung ist die gemeinsame Aktivität der PKA und PKC nötig (Kandel 2000; S. 1250-1255).

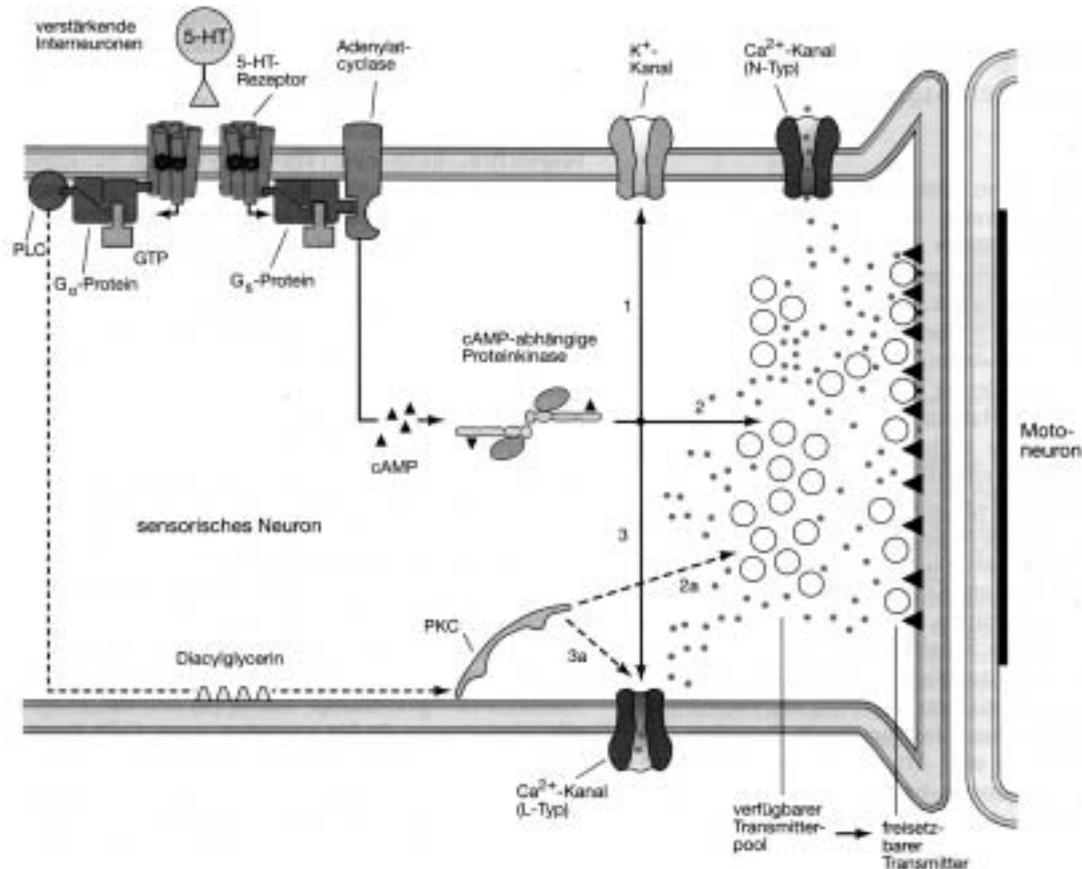


Abb. 3: Modell der Kurzzeitsensitivierung beim Kiemenrückziehreflex von *Aplysia*. Erläuterungen siehe Text. Reaktionskette 1: Konformationsänderung der K^+ -Kanäle durch PKA-Phosphorylierung. Reaktionsketten 2+3: Die verstärkte Transmitterfreisetzung und Öffnung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen wird gemeinsam durch die PKA und PKC bewirkt (Abb. aus Kandel 1996).

Aplysia ist auch klassisch konditionierbar. Dabei wird gleichzeitig mit der Berührung des Siphons ein Schwanzschock gegeben. Nach mehrmaliger Wiederholung kann man durch eine leichte Berührung des Siphons alleine einen stärkeren Rückzug der Kieme feststellen, als wenn US (Schwanzschock) und CS (Siphonberührung) zeitlich ungepaart verabreicht worden wären. Die Erinnerung bleibt mehrere Tage erhalten. Man kann im selben Experiment auch den Mantelrand, ähnlich wie den Siphon, reizen, was ebenfalls zu einem Zurückziehen der Kieme führt. Wenn man Berührungen des Mantelrandes im

Gegensatz zu Berührungen des Siphons nicht mit Schwanzschocks paart, kann man im selben Tier zwischen Sensitivierung und klassischer Konditionierung differenzieren. Es kommt nur zu einer erfolgreichen Konditionierung, wenn der CS dem US (um ca. 0.5 sec) vorausgeht (Squire 1999; S. 64).

Auf neuronaler Ebene läßt sich diese klassische Konditionierung folgendermaßen erklären (siehe Abb. 4): Die Adenylatzyklase I ist nicht nur durch das G-Protein, sondern auch durch Ca^{2+} /Calmodulin aktivierbar. Wenn Ca^{2+} in die Zelle bei deren Depolarisierung einströmt, wird Calmodulin durch Bindung von 3 oder 4 Ca^{2+} -Ionen aktiviert und aktiviert dann die AC I, eine Unterform der Adenylatzyklasen, die durch Ca^{2+} und G-Protein aktiviert werden kann. Die so durch Ca^{2+} /Calmodulin aktivierte AC weist allosterische Eigenschaften auf, indem sie auf eine G-Proteinaktivierung in überadditiver Weise mit einer wesentlich höheren Produktion von cAMP antwortet als es nach Aktivierung durch Ca^{2+} /Calmodulin oder G-Protein alleine (z. B. bei der Sensitivierung; klassische Konditionierung ist also eine Verstärkung der Prozesse bei der Sensitivierung) geschehen wäre. Deshalb ist die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige AC ein **Koinzidenzdetektor** (Bourne 1993) für das gleichzeitige Vorhandensein zweier Signale:

1. der Depolarisation des sensorischen Neurons, welches den CS weiterleitet. Diese führt zu Ca^{2+} -Einstrom.
2. der Aktivierung des Transmembranrezeptors durch Transmitterfreisetzung aus einem Neuron, das den US weiterleitet.

Es spiegeln sich auf molekularer Ebene auch die zeitlichen Anforderungen an die klassische Konditionierung: Der CS muß dem US vorausgehen (die AC muß erst durch Ca^{2+} aktiviert werden, um dann auf die G-Proteinaktivierung mit einer stärkeren cAMP-Produktion antworten zu können). Diese Form der präsynaptischen Verstärkung wird aktivitätsabhängige Verstärkung genannt.

Bei Säugetieren sind mindestens 10 verschiedene Adenylatzyklasen bekannt. Sie unterscheiden sich durch ihre Aktivier- bzw. Hemmbarkeit durch G-Protein und Ca^{2+} . So werden außer der AC I auch die AC III und VIII durch Ca^{2+} /Calmodulin

(synergistisch mit G_{so}) stimuliert, dagegen die AC V und VI durch Ca^{2+} inhibiert. Alle Adenylatzyklenen werden durch G_{as} stimuliert (Sunahara 1996).

Die Bedeutung der cAMP-Kaskade für das Lernen wurde untermauert, als man Lernmutanten bei *Drosophila* isolierte, bei denen Komponenten genau dieses Signalwegs defekt sind (siehe 1.5.4.1.).

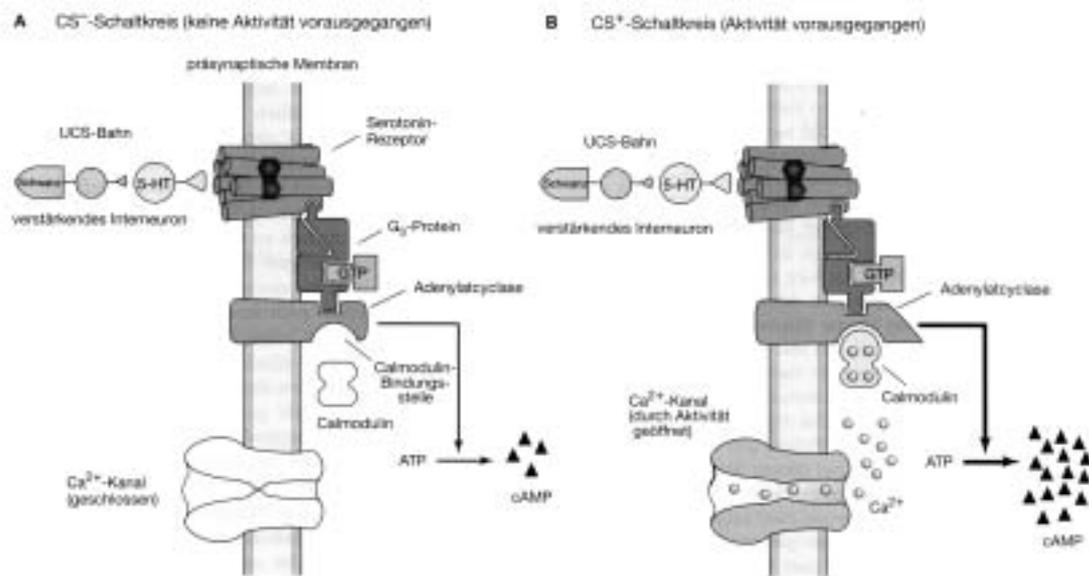


Abb. 4: Modell der molekularen Vorgänge bei der klassischen Konditionierung. In A geht dem US kein CS voraus, die Ca^{2+} -Kanäle bleiben bei fehlender Depolarisation geschlossen. In B wird der US mit einem CS gepaart. Ca^{2+} koppelt an Calmodulin und tritt mit der AC in Wechselwirkung. Dadurch kann die AC als Reaktion auf das vom US-Neuron freigesetzte Serotonin wesentlich mehr cAMP produzieren. UCS = unconditioned stimulus (US) (Abb. aus Kandel 1996).

1. 4. 2. Molekulare Grundlagen des Langzeitgedächtnisses

Eine allgemeine Eigenschaft des Gedächtnisses über die Speziesgrenzen hinweg scheint der allmähliche Übergang von einer instabilen kurzlebigen in eine stabile langlebige Form zu sein. Das Langzeitgedächtnis zeichnet sich durch *Transkription* und

Proteinsynthese aus. Kurzzeitgedächtnis baut nur auf kovalenten Veränderungen von schon vorhandenen Proteinen auf, wogegen für das Langzeitgedächtnis neue Proteine hergestellt und neue Synapsen gebildet werden.

Erste Hinweise auf dieses Phänomen ergaben sich durch Experimente an Mäusen. Ihnen wurde der Proteinsynthesehemmer Cycloheximid kurz vor dem Training in einem räumlichen Lernparadigma injiziert. Das Kurzzeitgedächtnis nach 15 min war normal, doch das 3 h-Gedächtnis war im Vergleich zu Kontrolltieren gestört (Flexner 1966).

Die Aufklärung der molekularen Grundlagen des Langzeitgedächtnisses begann mit *Aplysia* (siehe Abb. 5). Wiederholte Serotoninpulse an Nerven-Explantaten von *Aplysia*, die die synaptischen Verhältnisse zwischen sensorischem und motorischem Neuron nachstellen, führen dazu, daß die katalytische Komponente der PKA in den Kern diffundiert. Dort phosphoryliert die PKA den Transkriptionsfaktor CREB-1 (cAMP-responsive element-binding protein), der die Transkription von Genen bewirkt, die für die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses nötig sind, indem er an die entsprechende CRE (cAMP-responsive element) - Region auf der DNA bindet. Die Injektion von Oligonukleotiden in den Nukleus, die CRE-Regionen enthalten, fängt die CREB-Proteine ab und verhindert dadurch deren Bindung an die CRE-Regionen auf der DNA. Das Ergebnis ist, daß die Langzeitverstärkung blockiert ist, ohne daß die kurzfristige Erhöhung der synaptischen Effektivität beeinträchtigt wird (Dash 1990).

Umgekehrt führt die Injektion von phosphoryliertem CREB-1-Protein in sensorische Neurone von *Aplysia* zu einer Langzeitverstärkung der synaptischen Übertragung, ohne kurzzeitige Einflüsse zu haben (Bartsch 1998). Dagegen ist CREB-2 (Bartsch 1995) ein hemmender Faktor der Transkription indem er die CRE-Region auf der DNA und auch das CREB-1-Protein bindet. CREB-2 wird unabhängig von der PKA reguliert.

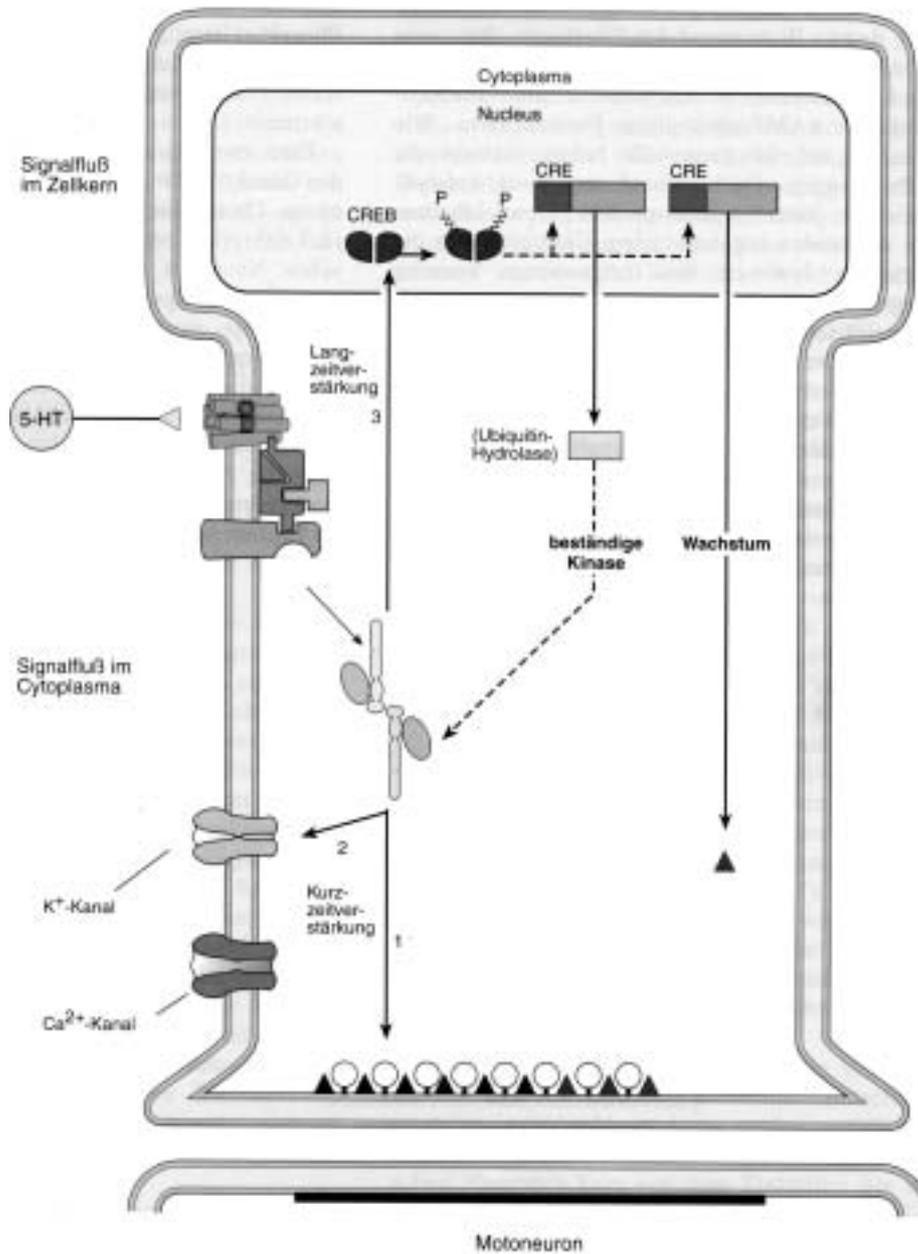


Abb. 5: Die Reaktionskette 3 stellt die Vorgänge bei der Langzeitsensitivierung bei *Aplysia* dar. Die von cAMP aktivierte PKA phosphoryliert CREB im Zellkern, das über die Veränderung von Genaktivitäten zu Langzeitveränderungen in diesem Neuron führt (Erläuterungen siehe Text; Abb. aus Kandel 1996).

CREB-1 aktiviert sogenannte unmittelbare frühe Gene („immediate early genes“). Eines der Gene kodiert für das Enzym Ubiquitinhydrolase (Alberini 1994), ein anderes für den Transkriptionsfaktor C/EBP (Hedge 1997). Die Ubiquitinhydrolase baut als Teil des Ubiquitinproteasoms die hemmende regulatorische Untereinheit der PKA ab, wodurch die PKA aktiviert wird. Die Ubiquitinhydrolase bildet so einen Rückkopplungsmechanismus, da die aktive PKA im Kern wieder CREB-1 aktivieren kann. Damit ist ein „Umschalten“ von den Kurzzeit- zu den Langzeitprozessen erreicht. Der Transkriptionsfaktor C/EBP wirkt auf Gene, die für die Bildung neuer synaptischer Verbindungen verantwortlich sind.

Wie schon bei der cAMP-Kaskade ist CREB bei *Drosophila* (siehe 1.5.4.3.), *Aplysia* und Mäusen gleichermaßen bedeutsam. Homozygote *creb*-Mäuse haben ein geschädigtes Langzeiterinnerungsvermögen (Bourtchuladze 1994).

1. 4. 3. Morphologische Grundlagen der synaptischen Plastizität

Eine **Synapse** ist eine spezialisierte Struktur zur Kommunikation zwischen 2 Neuronen oder zwischen Neuron und Muskelzelle. Man unterscheidet chemische und elektrische Synapsen. Bei der elektrischen Synapse fließt der Strom direkt von der präsynaptischen zur postsynaptischen Zelle. Die chemische Synapse zwischen 2 Neuronen besteht aus **präsynaptischer** Endigung der Zelle, die den Transmitter ausschüttet. Der Transmitter leitet das Signal über den **synaptischen Spalt** weiter zur **Postsynapse**. Dort wird es von dem chemischen wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt. Alle vier Regionen einer Nervenzelle: Axon (einfacher Fortsatz, der das Signal vom Zellkörper weg leitet), präsynaptische Nervenendigungen, Zellkörper (Soma) und Dendriten (vielfache Fortsätze, die Signale zum Zellkörper hin leiten) können im oben definierten Sinne präsynaptisch oder postsynaptisch sein. Die meisten Synapsen sind jedoch axosomatisch, axo-dendritisch oder axo-axonisch.

Die **axo-somatischen** Synapsen sind meistens *hemmend*: Sie führen zu einer Unterdrückung des elektrischen Signals in der postsynaptischen Zelle. Die

entsprechenden Transmitter im Zentralnervensystem sind typischerweise GABA (γ -Aminobuttersäure) oder Glycin. **Axo-dendritische** Synapsen sind in der Regel *aktivierend*: Sie führen meist über den Transmitter Glutamat zu einer Verstärkung des postsynaptischen Signals. Zentrale Neurone haben meist 20-40 Hauptdendriten mit jeweils noch feineren Verzweigungen. Die Kontaktstelle von präsynaptischem Neuron auf den Dendriten liegt entweder am Dendriten-Schaft oder an einer spezialisierten Struktur, die als dendritischer Dorn („**spine**“) bezeichnet wird. Ein „spine“ hat einen dünnen Hals und einen dickeren Kopf. Damit stellt er ein eigenes Kompartiment dar, das vom Rest des Dendriten biochemisch weitgehend isoliert ist, was zu *lokalen* Veränderungen hinsichtlich der synaptischen Plastizität an Neuronen führen kann.

Axo-axonische Synapsen an axonalen Endigungen wie im Falle der heterosynaptischen Verstärkung bei *Aplysia* haben meist *modulatorische* Funktion im Sinne der Veränderung der Transmitterausschüttung aus der von ihnen direkt beeinflussten Zelle auf die nachgeschaltete Zelle. Hier ist es vom Standpunkt abhängig, ob man das „modulierte“ Axon als präsynaptisch in Bezug auf das nachgeschaltete Neuron, oder als postsynaptisch in Bezug auf das modulierende Axon (das im Falle der Sensitivierung bei *Aplysia* den US repräsentiert) bezeichnet (Kandel 1996; Kandel 2000).

1. 4. 4. Synaptische Plastizität durch Änderung der Zahl synaptischer Verbindungen

Bei den synaptischen Langzeitveränderungen, die, wie oben erläutert, mit Gentranskription und Proteinsynthese einhergehen, kommt es neben der Erhöhung der Transmitterausschüttung auch zu strukturellen Veränderungen („Wachstum“ in Abb. 5). Dabei kommt es zur Zunahme oder Abnahme der Zahl präsynaptischer Endigungen, zum Auswachsen oder zur Rückbildung von Dendriten oder von dendritischen „spines“. Bei langzeit-sensitivierten Seehasen z. B. ist die Zahl der präsynaptischen Endigungen verdoppelt, bei langzeit-habituieren ist sie um 1/3 reduziert und die Zahl der Endigungen mit aktiver Zone von 40 % auf 10 % erniedrigt (siehe Abb. 6) (Kandel 2000; S. 1256-1257; Bailey 1983).

Bei untrainierten Seehasen findet man, daß 90% der sensorischen Neurone Verbindungen zu Kiemen-Motoneuronen haben. Nach Langzeithabituation sinkt dieser Wert auf 30% und liegt noch nach 1 Woche auf diesem Niveau, nach 3 Wochen bei 60% (Castellucci 1978; Kandel 2000).

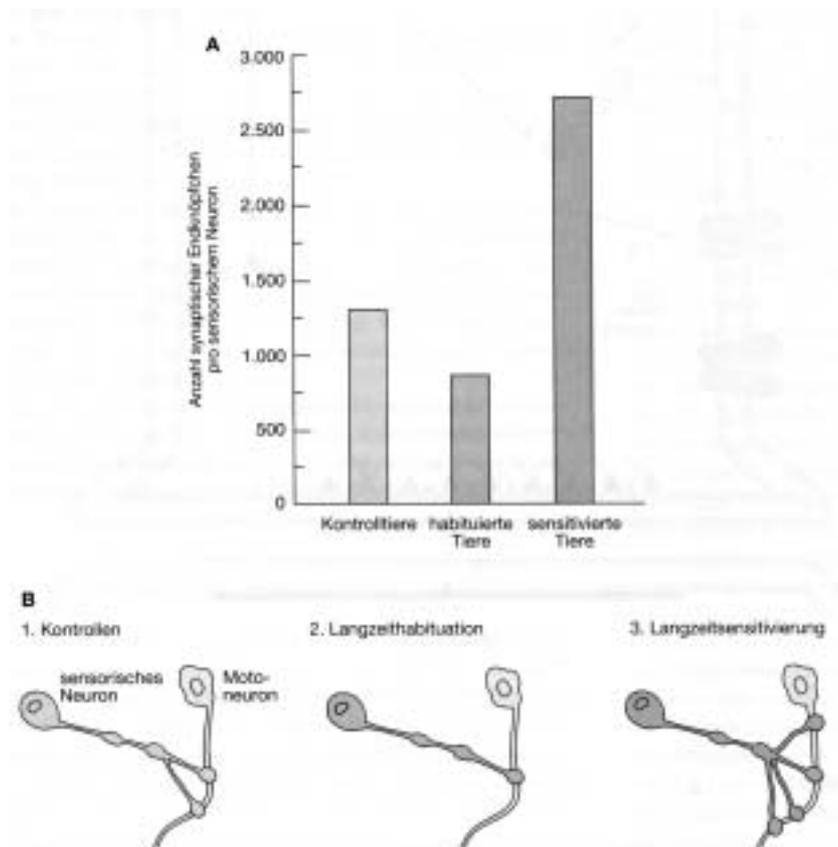


Abb. 6: A: Anzahl synaptischer Endigungen bei langzeithabituieren und langzeitsensitivierten Seehasen sowie bei Kontrolltieren. B: Schematische Darstellung der Zunahme bzw. Abnahme synaptischer Verbindungen nach Langzeithabituation und Langzeitsensitivierung (Abb. aus Kandel 2000, adaptiert nach Bailey 1983).

1. 4. 5. Langzeitpotenzierung (LTP)

Die Langzeitpotenzierung (long-term potentiation; LTP) ist ein aus dem Nervensystem von Säugern bekannter neurophysiologischer Mechanismus, der mit Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebracht wird, und dessen molekulare Grundlagen zur Zeit aufgeklärt werden. LTP tritt bei künstlicher Reizung einer Nervenbahn mit hochfrequenten elektrischen Impulsen als eine Zunahme der synaptischen Übertragungsstärke auf. Diese kann, je nach dem, wie lange gereizt wird, tage- oder wochenlang anhalten.

LTP ist in den drei wichtigsten afferenten Bahnen des Hippocampus induzierbar: Im **Tractus perforans**, den **Moosfasern** und den **Schaffer-Kollateralen**. LTP in den Schaffer-Kollateralen ist assoziativ und postsynaptisch induziert. Wenn eine schwache Stimulation einer Bahn zeitlich mit einer starken Stimulation einer anderen, das gleiche postsynaptische Neuron innervierenden, Bahn gepaart wird, tritt auch in den Synapsen der schwach stimulierten Bahn LTP auf. Dies wäre ohne die zusätzliche Stimulierung der anderen Bahn nicht geleistet worden. LTP in den Moosfasern ist nichtassoziativ und präsynaptisch, der Sensitivierung bei *Aplysia* vergleichbar.

Im Unterschied zur präsynaptischen Verstärkung bei *Aplysia* ist LTP in den Schaffer-Kollateralen (CA1-Region) ein Vorgang, der gleichzeitig Aktivität im präsynaptischen Neuron und die Depolarisation des postsynaptischen Neurons verlangt. Man bezeichnet eine solche Synapse als **Hebb-Synapse**, da Donald Hebb (1904-1985) 1949 gefordert hat: „Wenn das Axon einer Zelle A...die Zelle B erregt und wiederholt oder persistierend am Erregungsprozeß von B beteiligt ist, kommt es zu einem Wachstumsprozeß oder einer metabolischen Änderung in einer dieser Zellen oder in beiden, und zwar in der Form, daß die Effizienz der Zelle A als eines der Neurone, die B erregen, erhöht wird.“ (Hebb 1949). Dagegen ist bei der oben erörterten Form der synaptischen Verstärkung, die bei *Aplysia* beobachtet wird und auch dem Gedächtnis von *Drosophila* zugrunde liegt (siehe 1.5.), nur Aktivität in der Präsynapse gefordert, was man auch daran sehen kann, daß Transmitterausschüttung der Präsynapse beim Lernen nicht notwendig ist (siehe 1.5.4.2.). Bei LTP in den Schaffer-Kollateralen muß

jedoch das postsynaptische Neuron durch präsynaptische Transmitterausschüttung depolarisiert werden.

Das präsynaptische Neuron setzt Glutamat als Transmitter frei, das sowohl an NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) als auch an nicht-NMDA-Rezeptoren (A-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionate; AMPA-Rezeptoren) am postsynaptischen Neuron bindet. Gewöhnlich ist der NMDA-Rezeptor durch Mg^{2+} blockiert, so daß keine Ionen durch ihn einströmen können. Der AMPA-Rezeptor dagegen ist immer aktivierbar und führt zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran, ist also für die normale Signalübertragung zuständig. Er ist durchlässig für K^+ -und Na^+ -Ionen. Ist die Depolarisation besonders stark, wie z. B. nach einer hochfrequenten Reizung, wird das Mg^{2+} -Ion aus dem NMDA-Kanal herausgetrieben. Nun kann auch der NMDA-Kanal durch Glutamat aktiviert werden. Er ist außer für Na^+ - und K^+ -Ionen auch für Ca^{2+} durchlässig. Der Einstrom von Ca^{2+} hat die Aktivierung der PKC, der Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) und der CaM-Kinase II zur Folge. Diese Kinasen veranlassen durch Phosphorylierung eine verstärkte Reaktionsbereitschaft der AMPA-Rezeptoren auf Glutamat und den Einbau neuer AMPA-Rezeptoren in die Membran. Für die Etablierung von Langzeitgedächtnis wird, wie bei Drosophila (siehe 1.5.4.3.) und Aplysia, über die PKA und die Phosphorylierung von CREB auf die Transkription eingewirkt. Außerdem wird ein retrogrades Signal ausgelöst, welches zur Präsynapse wandert und dort die Transmitterausschüttung verstärkt. Diese Verstärkung funktioniert allerdings nur, wenn das präsynaptische Neuron gleichzeitig erregt wird, was der aktivitätsabhängigen Verstärkung bei der klassischen Konditionierung bei Aplysia ähnlich ist (Squire 1999; S. 127/128). Die Erhöhung der Transmitterausschüttung ist notwendig, um LTP *aufrechtzuerhalten*. Die *Induktion* der LTP dagegen findet, NMDA-Rezeptor-abhängig, in der Postsynapse statt.

LTP in den Moosfasern (CA3-Region) ist dagegen unabhängig von postsynaptischer Aktivität und dem gleichzeitigen Feuern mehrerer Neurone. Sie ist jedoch abhängig von Ca^{2+} -Einstrom in die Präsynapse, welcher, ähnlich wie bei Aplysia, über die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige AC die Menge von cAMP und der PKA erhöht. Sie ist außerdem unabhängig von NMDA-Rezeptoren. Es findet keine Blockierung der LTP

statt, wenn die NMDA-Rezeptoren mit Aminophosphonovalerat (APV) gehemmt werden (Kandel 2000; S. 1258-1260). Allerdings gab es unter anderen Stimulations- und Ableitebedingungen widersprüchliche Ergebnisse. So wurde auch eine NMDA-Rezeptor-abhängige Moosfaser-LTP gefunden, und Urban et al. (Urban 1996) nehmen an, daß in der CA3-Region sowohl ein Hebb'scher (prä- und postsynaptisch) als auch ein nicht-Hebb'scher Mechanismus (präsynaptisch) der synaptischen Verstärkung vorhanden sind. Lechner und Byrne vermuten eine solche Synthese auch für die plastische Synapse bei der assoziativen Konditionierung von Aplysia. Denn bei sensorischen Synapsen von Aplysia-Neuronen in Zellkultur ist nach tetanischer Reizung des sensorischen Neurons Ca^{2+} -Einstrom durch NMDA-Rezeptoren notwendig (Lin 1994). Außerdem wird im Zellkultur-Analogon von assoziativer Konditionierung bei Aplysia die Verstärkung durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten APV (Murphy 1997) und den Ca^{2+} -Chelator BAPTA (Bao 1998) gehemmt. Lechner und Byrne schlagen als Modell vor, daß nach wie vor präsynaptisch die AC als Koinzidenzdetektor fungiert, aber zusätzlich postsynaptisch NMDA-Rezeptoren auf Glutamat (CS) und Depolarisation (US) reagieren. Auf den postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom hin könnte ein unbekanntes retrogrades Signal in der Präsynapse die Aktivierung der AC durch Ca^{2+} /Calmodulin verstärken (Lechner 1998).

Man findet LTP auch außerhalb des Hippocampus. Man kennt es aus Amygdala, Striatum, Cerebellum, Neocortex und sogar aus dem Rückenmark (Eichenbaum 2002; S. 65).

1. 4. 6. Die Adenylatzyklase und synaptische Plastizität bei Säugern

Die AC I der Ratte ist nicht nur neuronenspezifisch exprimiert, sondern auch hauptsächlich in den für das Lernen wichtigen Gehirnregionen wie Hippocampus (Gyrus dentatus, CA1- und CA3-Region), Cerebellum und Neocortex (Xia 1991; Xia 1993). Sie wird, wie bei Drosophila (siehe 1.5.) und Aplysia, durch Ca^{2+} /Calmodulin stimuliert, in vitro auch durch ein stimulatorisches G-Protein ohne Ca^{2+} /CaM. In vivo (in Hek-293 Zellen) wird sie jedoch nur dann durch β -adrenerge Agonisten und

Glucagon stimuliert, wenn sie gleichzeitig durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ aktiviert wird (Wayman 1994). Sie kann also auch als Koinzidenzdetektor dienen.

Mäuse mit mutiertem AC I-Gen haben normale LTP im Tractus perforans und in den Schaffer-Kollateralen, jedoch eine verminderte (aber noch vorhandene) Moosfaser-LTP (Villacres 1998). AC I-mutierte Mäuse sind auch im Verhalten untersucht worden. Dazu ist ein Wasser-„Labyrinth“ („Morris water maze“) verwendet worden. Dabei muß die Maus schwimmend eine Plattform erreichen, die unter der Wasseroberfläche liegt, also nicht sichtbar ist. Sie navigiert mit Hilfe der optischen Umgebungseindrücke von den Wänden des Raumes und kann nach dem Training von beliebiger Position aus die Plattform auf direktem Wege erreichen. Die AC I-mutierten Mäuse waren dabei völlig normal. In einer anderen Version des Paradigmas zeigten sie jedoch Veränderungen. Wenn man nämlich die Plattform nach dem Training entfernt, suchen die Wildtyp-Mäuse länger an dem Ort, an dem die Plattform vorher war, als die mutierten Mäuse (man könnte aber auch argumentieren, daß es eine Leistung ist, schnell zu erkennen, daß die Plattform nicht mehr da ist, und statt dessen an anderer Stelle zu suchen, was die mutierten Mäuse auch taten; auf das Gedächtnis kann man also nicht so ohne weiteres schließen) (Wu 1995).

Um festzustellen, ob die relativ milden Ausfälle bei AC I-mutierten Mäusen daher rühren, daß andere Adenylatzyklasen noch funktionieren, wurde eine Mutante für die AC XIII (die AC XIII ist die einzige AC außer der AC I, die in vivo durch $\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulin}$ stimuliert wird), und, als diese in LTP und LTM (long-term memory) normal war, Mäuse mit Mutationen beider Gene (DKO) hergestellt. Diese hatten in CA 1 gestörte L (late phase) - LTP, also LTP die länger als 3 h anhält, mit Gentranskription und Proteinsynthese einhergeht und wofür der cAMP/PKA-Signalweg benötigt wird (Blitzer 1995). Bei der Einfachmutante kann jede AC also noch genügend cAMP herstellen. Außerdem waren die DKO-Mäuse, im Gegensatz zu den Einfachmutanten, im längerzeitigen und Langzeitgedächtnis nach „passivem Vermeidungstraining“ gestört. Dabei wird der Übertritt von der beleuchteten zur unbeleuchteten Seite einer Kammer mit einem Elektroschock bestraft. Das Lernen war normal, jedoch nach 30 min, 24 h und 8 Tagen waren Defekte im Erinnerungsvermögen zu verzeichnen. Ebenso

im „Kontext-Lernen“, bei dem in einer bestimmten Umgebung Elektroschocks gegeben werden, so daß die Tiere bei späterem Aufenthalt in dieser Umgebung „freezing“ zeigen, einen Ausdruck von Furcht. Sie sind aber nicht *generell* lerngestört, sondern, soweit getestet, nur in Hippocampus-abhängigen Paradigmen (Wong 1999).

1. 5. Lernen und Gedächtnis bei Drosophila

1. 5. 1. Lernparadigmen

Lernen und Gedächtnis bei Drosophila wurde zum ersten Mal im Labor von S. Benzer untersucht (Quinn 1974). Damals war als Lernparadigma *ein operantes Geruchsvermeidungsparadigma* verwendet worden, das später von T. Tully (Tully 1985) zu einem klassischen umgewandelt und verbessert worden ist. Als negative Verstärker wurden Elektroschocks sowie Chininsulfatpulver verwendet. Die Fliegen wurden mit den Gerüchen 3-Octanol und 4-Methylcyclohexanol trainiert. Später wurden auch positive Verstärker erfolgreich benutzt (Tempel 1983). Belohnung durch in Zuckerwasser getränkte Filterpapiere konnte ein langlebigeres Gedächtnis produzieren als das Lernen mit negativem Verstärker. Allerdings war das Lernen mit Elektroschocks als US resistenter gegen Extinktion (Tully 1985). Das in dieser Arbeit verwendete *klassische olfaktorische Lernparadigma* wird auf S. 34 kurz beschrieben und unter 2.4. ausführlich erläutert.

Inzwischen sind eine Vielzahl von verschiedenen anderen Lernparadigmen entwickelt worden: Im *Flugsimulator* werden als CS u. a. bestimmte Muster verwendet (aufrechtes und umgekehrtes T), als Bestrafung Hitze. Die Fliege wird an einem Detektor so fixiert, daß sie die Flügel wie im Flug frei bewegen kann. Der Detektor mißt die intendierten Richtungsänderungen im Flug. Diese werden verrechnet und mit minimaler Verzögerung mit entgegengesetzten Drehbewegungen der Arena beantwortet, in der die Fliege hängt, und in deren 4 Quadranten sich jeweils ein T-Muster befindet. So hat die Fliege den Eindruck, als würde sie wirklich die Richtung im Flug ändern, und kann so wählen, auf welches der Muster sie zufliegen will. Wenn eines der beiden

unterschiedlichen Muster durch einen Hitzestrahler regelmäßig bestraft wird, vermeidet die Fliege das Muster auch dann noch, wenn der Strafreiz nicht mehr appliziert wird (operante Konditionierung) (Wolf 1986).

Bei der *Konditionierung des PER* („proboscis extension reflex“), bei dem die Fliege den Rüssel ausstreckt, wenn die Tarsi der Vorderbeine mit Zucker in Berührung kommen, wird mit dem Ausstrecken des Rüssels regelmäßig ein Elektroschock gepaart. Als Ergebnis verringert sich die Häufigkeit des PER (Médioni 1975).

Die *Balzkonditionierung*, eine operante Verhaltensänderung, besteht darin, daß bereits befruchtete Weibchen auf die Kopulationsversuche eines Männchens anders reagieren und ein verändertes chemisches Signal absondern als jungfräuliche Weibchen, so daß es nicht zur Paarung kommt. Die Folge ist, daß bei den Männchen die Paarungsbereitschaft sowohl gegenüber diesen Fliegen als auch gegenüber jungfräulichen Weibchen sinkt. Dies hält 2-3 h an und kann auch erzeugt werden, wenn man eine Fliegenattrappe mit dem Signalstoff bestreicht.

Auch Habituation und Sensitivierung können in vielerlei Hinsicht hervorgerufen werden: Die *Habituation der Landereaktion* wurde schon erwähnt (siehe 1.2.1.). Ein Beispiel für Sensitivierung (hier kein *schädlicher* Reiz; siehe 1.2.1.): Beim *akustischen „Priming“* wird die Paarungsbereitschaft von jungfräulichen Weibchen durch künstlichen Paarungsgesang so gesteigert, daß die Paarung auch mit flügellosen Männchen (der Gesang wird durch Flügelvibrationen erzeugt) verstärkt stattfindet.

Olfaktorisches Lernen und Langzeitgedächtnis bei Drosophila: Im klassischen olfaktorischen Lernparadigma (Tully 1985; siehe 2.4.) wird eine Gruppe von ca. 100 Fliegen nacheinander mit 2 unterschiedlichen Gerüchen konfrontiert, von denen einer mit 12 Elektroschocks gepaart ist. Dies bewirkt, daß bei gleichzeitiger Applikation der beiden Gerüche aus unterschiedlichen Richtungen nach ca. 2 Minuten im Durchschnitt 95% der Fliegen den vorher unbestraften Geruch bevorzugen. Aus der relativen Anzahl der Fliegen, die den einen oder den anderen Geruch bevorzugen wird ein „Lernindex“ (siehe 2.4.2.) errechnet. Ein Lernindex von 1 besagt, daß alle Fliegen das gelernte

Verhalten gezeigt haben, ein Lernindex von 0, daß die Verteilung auf die beiden Gerüche nicht von einer Zufallsverteilung verschieden ist. Der Lernindex nach dem gewöhnlichen Training in diesem Paradigma fällt innerhalb von 24 h von 0.9 auf 0.1 ab. Wenn man aber statt eines Trainingszyklus mit insgesamt 12 Elektroschocks 10 solche Zyklen hintereinander mit jeweils fünfzehn-minütigen Pausen zwischen den Zyklen durchführt („spaced training“), erhält man nach 24 h einen fünfmal so hohen Lernindex (0.5), der in den ersten 4 Tagen kaum abfällt und nach insgesamt 7 Tagen (das entspricht fast $\frac{1}{4}$ der Lebenserwartung von *Drosophila*) noch bei 0.3 liegt (Tully 1994). Darauf wird unter 1.5.4.3. noch eingegangen werden.

1. 5. 2. Pilzkörper und Zentralkomplex: Anatomie und Struktur

Das *Drosophilagehirn* besteht aus etwa 200.000 Neuronen (Zars 2000b). Davon entfallen je etwa 70.000 auf einen einzelnen optischen Lobus. Das Zentralgehirn besteht also aus etwa 60.000 Neuronen, 30.000 pro Hemisphäre. Die morphologisch auffälligsten Strukturen im Zentralgehirn sind der Zentralkomplex, der unpaar in der Mitte zwischen den beiden Gehirnhälften liegt, und die paarigen Pilzkörper.

Der **Zentralkomplex** besteht aus 4 Untereinheiten: Der Protocerebralbrücke, einer stabförmigen Struktur, die zwischen den Calyces des Pilzkörpers liegt; dem fächerförmigen Körper, der sich ventral davon befindet; darunter liegen die Noduli, und am weitesten ventro-rostral der Ellipsoidkörper. Es wird vermutet, daß die Funktion des Zentralkomplexes in der Regulation der Verhaltensaktivität des Insekts besteht. Außerdem dient er der Verbindung der beiden Gehirnhälften. Zentralkomplexmutanten zeigen eine geringere Laufgeschwindigkeit und kürzere Flugzeiten. Der Zentralkomplex ist ein motorisches Zentrum und wäre unter allen Gehirnstrukturen am ehesten als Ort der Generierung von initialer Aktivität anzusehen (siehe 1.1.), wohingegen die Pilzkörper mehr der Sensorik, vor allem bezüglich der Olfaktorik, aber auch anderer Modalitäten, zuzuordnen sind (Heisenberg 1994).

Als die **Pilzkörper** (corpora pedunculata) 1850 erstmals von Dujardin (Dujardin 1850) beschrieben wurden, verglich er sie auf Grund ihrer äußeren Form mit der gewundenen Großhirnrinde der Säugetiere und hielt sie für den Sitz der Intelligenz. „Es dauerte fast 150 Jahre, um zweifelsfrei herauszuarbeiten, daß sie in der Tat mit so etwas wie Intelligenz zu tun haben: Sie sind essentiell für das Kurzzeitgedächtnis im Geruchsunterscheidungsparadigma.“ (Übersetzung aus Heisenberg 1998; S. 2).

Die Pilzkörper von *Drosophila* bestehen aus 2500 parallel von dorso-caudal nach rostro-ventral verlaufenden Neuronen pro Hemisphäre, die als Kenyon-Zellen oder intrinsische Pilzkörperneurone bezeichnet werden. Die Zellkörper der Kenyon-Zellen liegen im dorso-caudalen Gehirn und senden ihre Axone nach vorne aus. Die Dendriten der Kenyon-Zellen bilden die beiden Calyces, nach deren Pilzform die Pilzkörper benannt wurden. Die parallel verlaufenden Axone bilden die Pedunkel, die sich rostro-ventral in die waagerechten und senkrechten Loben aufspalten. Der gesamte Pilzkörper ist vom restlichen Gehirn durch eine dünne Gliazell-Lamelle getrennt.

Man kann anhand von Genexpressionsmustern (Crittenden 1998) 3 Untereinheiten unterscheiden, die schon im Pedunkel separat verlaufen. Ein Teil der Fasern spaltet sich in den waagerechten α - und den senkrechten β -Lobus, ein anderer Teil in den waagerechten α' - und den senkrechten β' -Lobus auf, und ein dritter Teil bildet den am weitesten rostral liegenden waagerechten γ -Lobus (siehe Abb. 7 und Schemazeichnung in Abb. 16). Die Pilzkörper von *Drosophila* erhalten über die Calyces Afferenzen von den Antennalloben und sind damit nur durch zwei synaptische Stationen von den Geruchsrezeptoren getrennt. Diese befinden sich auf dem 3. Antennalsegment und auf dem Maxillarpalp. Die olfaktorischen Rezeptorneurone konvergieren auf die 40 Glomeruli, aus denen jeder Antennallobus besteht. Dabei konvergieren die gemeinsamen Fasern einer bestimmten Geruchsempfindlichkeit auf einen Glomerulus. Von dort ziehen im antennoglomerulären Trakt Projektionsneurone zum lateralen Horn (laterales Protocerebrum), wobei sie Seitenäste, die die Kenyon-Zellen innervieren, zum Calyx abgeben (Heisenberg 1994; Heisenberg 1995; Vosshall 2000).

Wohin die Efferenzen aus den Loben der Pilzkörper projizieren, ist nur zum Teil bekannt. Sie ziehen in die den Pilzkörpern benachbarten Regionen des Protocerebrums, auch ins laterale Protocerebrum, wo die Projektionsneurone enden, sowie zurück zum Calyx (Ito 1998). Es ist zu erwarten, daß sie letztlich Verbindungen zu Neuronen (z. B. im Thorakalganglion) haben, die die motorischen Effektororgane innervieren.

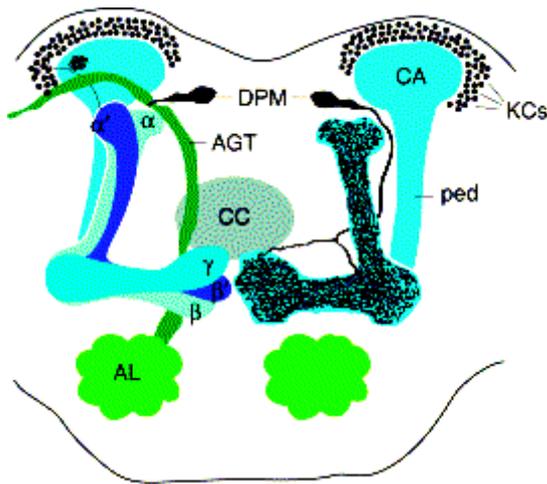


Abb. 7: Schematische Darstellung der wichtigsten Gehirnstrukturen von *Drosophila*, die am Geruchslernen beteiligt sind. AGT=Antennoglomerulärer Trakt; AL=Antennallobus; CA=Calyx; (CC=Zentralkomplex); DPM=Dorsal Paired Medial Neuron; KCs=Kenyonzellen; ped=Pedunkel (Darstellung aus Waddell 2001b).

Während der Metamorphose verlieren die larvalen Pilzkörper den größten Teil ihrer Nervenfasern und neue Fasern wachsen aus. Eine hohe Populationsdichte bei der Aufzucht der Larven führt zu einer höheren Zahl von Kenyon-Zellen (Heisenberg 1995), eine niedrige Populationsdichte bei adulten Tieren verringert die Zahl der Kenyon-Zellen wieder (Technau 1984). Die Pilzkörper sozial lebender Insekten sind besonders groß, so die von Arbeiterinnen bei Bienen im Vergleich zu Dronen (Jonescu 1909).

1. 5. 3. Funktion der Pilzkörper - Störungsmuster pilzkörperloser Fliegen

Bislang sind mehrere Funktionen bekannt, für die die Pilzkörper notwendig sind: Olfaktorisches Kurzzeitgedächtnis, olfaktorisches Langzeitgedächtnis, Balzkonditionierung, Kontrolle spontaner Bewegungsaktivität, Kontextgeneralisierung und Entscheidungsfähigkeit bei sich widersprechenden Reizen.

Bei Bienen konnte gezeigt werden, daß die Kühlung von Teilen der Pilzkörper (aber auch des Antennallobus) nach dem Training das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis beeinträchtigt (Erber 1980). Einzelne Experimente dieser Art können keine Gewissheit verschaffen, daß es wirklich die Pilzkörper sind, deren Beeinträchtigung zu dem Verhaltensdefekt führt. Für die Aussage, daß die Pilzkörper für olfaktorisches Gedächtnis notwendig sind, wurden deswegen bei *Drosophila* drei unterschiedliche Interventionsmethoden herangezogen (siehe Abb. 8). Diese sollen im folgenden kurz beschrieben werden.

Mutanten mit Strukturdefekten in den Pilzkörpern: *mushroom bodies deranged (mbd)* und *mushroom body miniature (mbm)*. Bei *mbd*-Fliegen wachsen die bei der Metamorphose neugebildeten Fasern nicht wie gewöhnlich zu Pedunkeln heran, sondern bilden eine „turbanartige“ (Heisenberg 1985; S. 64) Struktur in der Nähe der Calyces oder wachsen auf einem anderen Weg in des Gehirn ein. Die etwa 400 von der Metamorphose nicht betroffenen Pilzkörperneurone bleiben davon unbeeinflusst. *mbm*-Fliegen-Weibchen verlieren die Pilzkörperfasern nach dem 2. Larvenstadium und bilden keine neuen Fasern während der Metamorphose. Es liegt ein geschlechtsbezogener Dimorphismus vor: Männliche *mbm*-Fliegen haben in der Regel normal entwickelte Pilzkörper. Diese, wie auch noch einige andere Pilzkörpermutanten haben gemein, daß sie sich völlig normal verhalten und Gerüche und Elektroschocks wahrnehmen können, aber in der olfaktorischen Konditionierung versagen.

Im Vergleich zur mechanischen Zerstörung oder Kühlung der Pilzkörper mit einer unvermeidlichen Mit-Zerstörung oder Mit-Kühlung von Bereichen außerhalb der Pilzkörper hat die Erzeugung pilzkörperloser Fliegen durch Mutationen den Vorteil der

„Nichtinvasivität“. Der Defekt ist genau auf die Struktur, für die man sich interessiert, beschränkt. Andererseits können auch hier unerwünschte Nebenwirkungen nicht völlig ausgeschlossen werden, wie nicht beobachtete Entwicklungsdefekte des Nervensystems oder biochemische Störungen, die sich negativ auf das Lernen auswirken und durch die Mutation verursacht sein könnten.

Hemmung der Proliferation von Pilzkörperneuroblasten in der Entwicklung (De Belle 1994). Die Pilzkörper entwickeln sich aus 4 Neuroblasten in jeder Hemisphäre. Diese Neuroblasten, sowie ein weiterer Neuroblast (für den Antennallobus) sind die einzigen proliferierenden Zellen in den ersten 8-12 h nach dem Schlüpfen der Larve. Wenn man den Larven in diesem Zeitfenster das Zytostatikum Hydroxyharnstoff (Hydroxyurea; HU) füttert, gehen diese Neuroblasten zugrunde, was zur Folge hat, daß sich keine Pilzkörperneurone entwickeln. Es fehlt allerdings auch der Teil des Antennallobus, der aus dem erwähnten zusätzlichen Neuroblasten entsteht. Der Rest des Gehirns entwickelt sich normal. Die adulten Fliegen verhalten sich weitgehend normal. Geruchs- und Elektroschockwahrnehmung sind unverändert, jedoch sind olfaktorisches Lernen und Gedächtnis wiederum fast vollständig zerstört.

Expression eines konstitutiv aktiven $G_{\alpha s}$ -Proteins in den Pilzkörpern (Connolly 1996). Die Expression geschah mit Hilfe des P-Gal4 enhancer trap Systems (siehe 2.2.). Das Protein ist Teil einer Signaltransduktionskaskade, in der beim Lernen die Adenylatzyklase I aktiviert wird. Expression einer Variante des $G_{\alpha s}$ -Proteins, bei der durch einen einzigen Aminosäureaustausch die GTPase-Aktivität des Proteins zerstört wurde, und das Protein damit die AC ständig aktiviert (konstitutiv aktiv), schädigt das Geruchslernen nur, wenn sie in den Pilzkörpern, nicht wenn sie in anderen Gehirnregionen erfolgt, wie etwa im Zentralkomplex. Überexpression des *wildtypischen* $G_{\alpha s}$ in den Pilzkörpern hat jedoch keine Auswirkung auf das Lernen. Als Pilzkörper-Gal4-Linien wurden benutzt: 238y, c309, c747, 201y. Als Zentralkomplexlinien wurden verwendet: c232, ok348. Vier von diesen Linien, nämlich 238y, c772 (identisches Expressionsmuster wie c747), 201y und c232 wurden in der hier vorgelegten Arbeit verwendet (Expressionsmuster dieser Linien siehe 3.1.), um die *rut*⁺-cDNA in oder außerhalb der Pilzkörper zu exprimieren (siehe 3. und 4.).

Daß diese drei unterschiedlichen Methoden zu ähnlichen Störungsmustern führen, ist ein Indiz dafür, daß tatsächlich die Pilzkörper, bzw. deren Fehlen für die Verhaltensänderung der Fliegen verantwortlich sind, da sie genau die „Schnittmenge“ der 3 Experimente bilden. Die jeweils anderen Nebeneffekte der Einzelmethoden können als ursächlich ausgeschlossen werden. Z. B. sind bei der HU-Methode auch Antennallobus-Neurone ausgeschaltet, bei den Gal4-Linien sind auch Neurone außerhalb der Pilzkörper betroffen (z. B. das mediane Bündel).

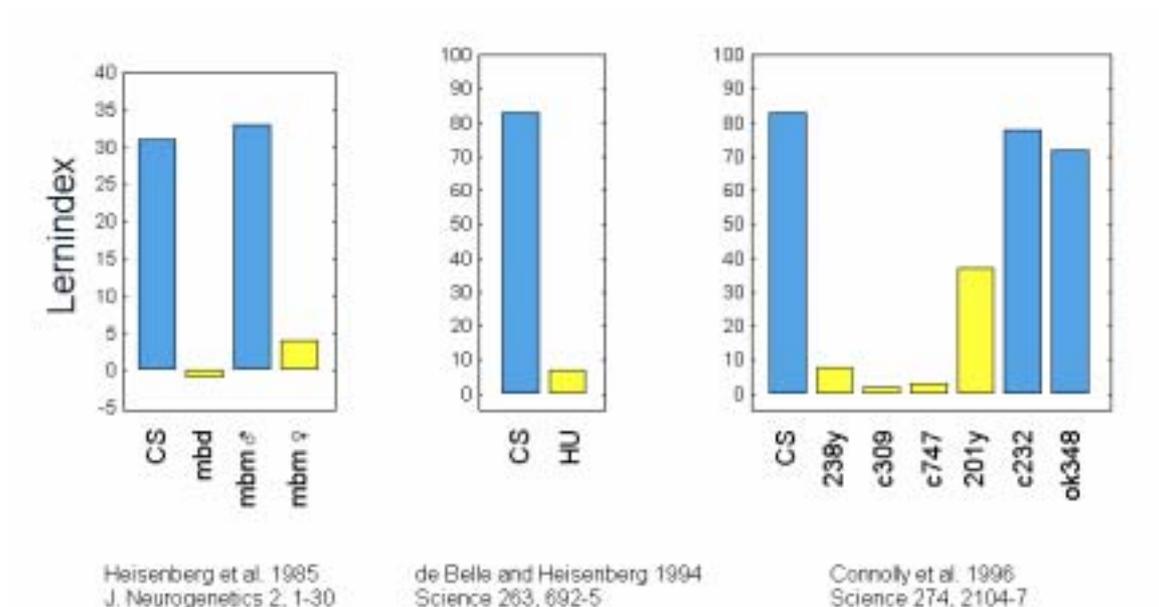


Abb. 8: Das Lernvermögen im klassischen olfaktorischen Lernparadigma ist in drei publizierten Studien bei Fliegen mit ablatiertem oder biochemisch verändertem Pilzkörper zerstört. 238y, c309, c747 und 201y sind Gal4-Linien, die im Pilzkörper exprimieren. C232 und ok348 sind Zentralkomplexlinien. Der Lernindex wurde jeweils mit 100 multipliziert.

In einer neueren Arbeit aus dem Jahre 2001 konnte gezeigt werden, daß Teile der Pilzkörper für das *olfaktorische Langzeitgedächtnis* notwendig sind. Bei Fliegen, denen die vertikalen Loben, also α - und α' -Loben, fehlen, war das Langzeitgedächtnis nach 10-fachem Training mit Zwischenpausen („spaced training“) null, das Kurzzeitgedächtnis dagegen normal. Fehlten die horizontalen β/β' -Loben, waren beide

Gedächtnisformen unbeeinträchtigt (Pascual 2001). Darauf wird im Kapitel 1.5.4.3. genauer eingegangen werden.

Die Pilzkörper sind notwendig für die *Balzconditionierung* („courtship conditioning“) (siehe S. 34). Bei Fliegen mit HU-ablatierten Pilzkörpern funktioniert zwar noch die initiale Suppression, aber die Fliegen nehmen früher (nach 30 min) ihre Paarungsversuche wieder auf als Wildtypfliegen (nach 2-3 h). Das Kurzzeitgedächtnis ist also normal, das 30-min-Gedächtnis aber gestört. In einer bestimmten Variante des Paradigmas, in der ein 9 Tage anhaltendes Langzeitgedächtnis ausgebildet wird, verschwand das Gedächtnis bei HU-Fliegen vollständig innerhalb eines Tages (McBride 1999).

Neben der Bedeutung für Lernen und Gedächtnis haben die Pilzkörper auch Einfluß auf die *spontante Laufaktivität* der Fliegen (Martin 1998). In diesem Fall wurden neben den erwähnten pilzkörperlosen Fliegen (*mbm*¹; HU-behandelte Fliegen) auch Fliegen mit blockierter synaptischer Übertragung in den Pilzkörpern untersucht. Letzteres wurde durch die Expression eines Gens der leichten Kette von Tetanustoxin erreicht (*Cnt-E*; Sweeney 1995). Das Tetanustoxin wurde mit Hilfe der Gal4-Technik (2.2.) gewebespezifisch exprimiert, wobei die 3 Pilzkörper-Gal4-Linien 201y, 17d und H24 (Expressionsmuster siehe 3.1.) verwendet wurden. *Cnt-E* inhibiert durch die Spaltung von neuronalem Synaptobrevin die Transmitterausschüttung an den Synapsen und blockiert somit die synaptische Übertragung an den von den Gal4-Linien betroffenen Neuronen. Es stellte sich heraus, daß pilzkörperlose Fliegen, bzw. Fliegen, deren Pilzkörper funktionell ausgeschaltet sind, eine höhere Laufaktivität als normale Fliegen zeigen, ganz im Gegensatz zu Zentralkomplex-Mutanten, die eine geringere Bewegungsaktivität haben. Dabei äußert sich dieser Effekt in einer Verlängerung der Lauf- und einer Verkürzung der Ruhephasen. Da die Ausgangsneurone der Pilzkörper noch nicht gut bekannt sind, ist nicht klar, ob dieser Einfluß auf die Laufaktivität über einen direkten hemmenden Einfluß auf die Zentralkomplexneurone erfolgt.

Außerdem sind die Pilzkörper wichtig für *Kontextgeneralisierung* beim visuellen Lernen im Flugsimulator (Liu 1999). Bei Lernexperimenten versucht man

normalerweise, den Kontext, also alle Reize, die nicht CS oder US sind, zwischen Training und Test möglichst unverändert zu lassen. Der Kontext im olfaktorischen Lernparadigma (siehe 2.4.) besteht z. B. in der Geschwindigkeit der Luftströmung durch die Röhrchen, in den Ausmaßen der Röhrchen oder der Handhabung durch den Experimentator. In der natürlichen Umwelt ist es jedoch die Regel, daß der Kontext sich ändert. Deshalb ist zu erwarten, daß sich in der Evolution Mechanismen der Abstraktion vom jeweiligen Kontext durchgesetzt haben. D. h. das Tier muß unterscheiden, welche Umweltreize immer gleichzeitig mit dem US gepaart und welche unabhängig davon sind.

Kontext im Flugsimulator (siehe S. 33), mit dem die Versuche zur Kontextgeneralisierung durchgeführt wurden, sind z. B. die Beleuchtung der Arena, Geräusche, Erschütterungen und Gerüche im Raum. Wildtypische Fliegen können im Flugsimulator auch dann noch die bestraften Muster vermeiden, wenn im Test (wenn also keine Hitzebestrafung mehr erfolgt) die Arenabeleuchtung farblich gegenüber der im Training verändert ist (Kontextänderung vom Training zum Test). Pilzkörperlose Fliegen (*mbm*; HU-behandelte Fliegen; Fliegen mit UAS-*CntE* unter der Expressionskontrolle der Gal4-Linie 17d) konnten zwar im Flugsimulator visuell normal lernen, versagten jedoch, wenn sich der Kontext zwischen Training und Test änderte. Das bedeutet, daß die Pilzkörper für die Erkennung der zeitlichen Paarung von CS und US, d. h. für die Unterscheidung von CS und Kontext wichtig sind. Auch hier führen drei unabhängige Methoden der Ausschaltung der Pilzkörper zum selben Ergebnis.

Die Pilzkörper scheinen auch eine Rolle bei der *Entscheidungsfällung* bei zwei sich widersprechenden Reizen zu spielen. Konditioniert wurde auf visuelle Symbole mit bestimmter Orientierung und Farbe im Flugsimulator. Wurde nun die zu vermeidende Farbe mit der zu bevorzugenden Orientierung des Symbols (und umgekehrt) im Test kombiniert (widersprüchliche Gedächtnisbilder), und die Intensität der Farben schrittweise verändert, entschieden sich die Fliegen bei einer hohen Farbintensität für die Farbe als CS, dem zu folgen oder nicht zu folgen den US vermeiden sollte, bei niedrigerer Intensität für die Orientierung des Symbols. Der „Umschlagspunkt“ war bei

Wildtypfliegen eng definiert: entweder Farbe oder Orientierung. Bei *mbm*-Fliegen oder HU-behandelten Fliegen war kein so scharfes entweder-oder-Verhalten zu beobachten (Tang 2001).

1. 5. 4. Molekulare Mechanismen von Lernen und Gedächtnis bei Drosophila

1. 5. 4. 1. Biochemische Lernmutanten

Nachdem unter 1.5.3. strukturelle Lernmutanten besprochen wurden, wird im folgenden auf Mutationen eingegangen, die die Anatomie des Nervensystems in der Regel nicht verändern, aber bei denen bestimmte Enzyme oder Rezeptoren ubiquitär nicht mehr oder nicht in ausreichendem Maße gebildet werden („biochemische Lernmutanten“). Die wichtigsten der identifizierten biochemischen Lernmutanten bei Drosophila haben gerade in der geschilderten Signaltransduktions-Kaskade Defekte vorliegen (siehe Abb. 3). So ist bei *dunce* (*dnc*) das Gen für die cAMP-abbauende Phosphodiesterase defekt, was zu einer Akkumulation von cAMP in der Zelle führt. Bei *rut* ist das Gen für die AC I defekt, bei *dco* das Gen für die katalytische Untereinheit der PKA, bei *amn* das Gen für ein Peptid, das vermutlich den G-Protein-Rezeptor aktiviert. Das spricht dafür, daß der synaptischen Plastizität bei Drosophila die oben besprochenen molekularen Mechanismen zugrunde liegen. Der Vorteil bei Drosophila ist, daß man den Effekt auf das Verhalten direkt zu sehen bekommt. Man kann das Gedächtnis der genetisch veränderten Fliege messen. Bei *Aplysia* wurden isolierte Nervenpräparate auf die Veränderung der Übertragungsstärke untersucht und vorausgesetzt, daß damit Aussagen über das Gedächtnis gemacht werden können.

Die erste Lernmutante, die überhaupt isoliert wurde, war eine biochemische Lernmutante: *dunce* (*dnc*). Sie wurde mit Hilfe des operanten olfaktorischen Vermeidungsparadigmas (siehe 1.5.1.) isoliert. In dem heutzutage verwendeten klassischen Lernparadigma zeigt *dnc* einen initialen Lernindex (LI; siehe 2.4.2.) von 0.3, verglichen mit 0.9 beim Wildtyp. Schon nach einer halben Stunde ist der Lernwert auf 0.1 abgesunken. Die Wahrnehmung der Gerüche und der Elektroschocks (dies gilt

definitionsgemäß für alle Lernmutanten) ist ungestört. Die Weibchen sind steril. Wenn Zuckerbelohnung als US verwendet wird, ist der Lernindex zu Beginn normal, fällt danach aber schnell ab (Tempel 1983). Weiterhin sind *dnc*-Fliegen gestört in der Balzkonditionierung (Gailey 1984), im visuellen Lernen (Folkers 1982) und der Sensitivierung (nicht-assoziativ) des PER (Duerr 1982). Daß nicht-assoziatives und assoziatives Lernen ähnliche molekulare Grundlagen haben, ist, wie oben beschrieben, schon bei *Aplysia* entdeckt worden. Interessanterweise ist bei *dnc*-Fliegen die Habituation der Landereaktion stabiler und erfolgt schneller als beim Wildtyp.

dnc ist das Gen für die Phosphodiesterase II, die aus cAMP 5'AMP macht. In der Mutante häuft sich also cAMP in der synaptischen Endigung des Neurons an. Offensichtlich behindert dies das Funktionieren der Signalkaskade. Daß der Defekt bei *dnc* von den aktuellen Anforderungen an die cAMP-Kaskade beim Lernen herrührt und nicht durch Entwicklungsdefekte bestimmt ist, hat ein Experiment gezeigt, bei dem bei *dnc*-Fliegen durch den heat shock 70-Promotor (Golic 1989) kurz vor dem Training (klassisches olfaktorisches Paradigma) die Wildtyp-cDNA oder eine homologe cDNA aus der Ratte zur Expression gebracht wurde (Dauwalder 1995). In beiden Fällen konnte das Lernen gerettet werden, obwohl das wildtypische Gen während der Entwicklung nicht aktiv gewesen war.

rutabaga (*rut*) ist das Strukturgen für die AC I und das Gen, *das in dieser Arbeit gewebespezifisch exprimiert wurde* (siehe 2.2. und 3.). Ebenso wie *dnc* wurde *rut* mit Hilfe des olfaktorischen Lernparadigmas isoliert (Aceves-Pina 1983; Dudai 1984; 1988). *rut*-Fliegen zeigen etwa 60% des Lernwertes von Wildtypfliegen in der klassischen olfaktorischen Konditionierung. Der Wert fällt in der ersten halben Stunde nach dem Training stark ab, nämlich auf 0.25 und liegt nach 3 Stunden bei 0.1. *rut*-Fliegen sind in allen bisher getesteten Lernparadigmen gestört.

Genau entgegengesetzt zu *dnc* ist *rut* beim olfaktorischen Zucker-Belohnungslernen (Tempel 1983) stärker beeinträchtigt als beim olfaktorischen Bestrafungslernen. In der Balz-Konditionierung, beim visuellen Lernen und der Sensitivierung des PER ebenso wie in der stabileren Habituation der Landereaktion entsprechen die Veränderungen bei

rut in etwa denjenigen von *dnc*. Außerdem haben *rut*-Fliegen eine veränderte synaptische Plastizität an der larvalen neuromuskulären Synapse (Zhong 1990).

Doppelmutanten für *dnc* und *rut* sind im olfaktorischen Lernen schlechter als Einfachmutanten (Tully 1985), obwohl die Mutationen entgegengesetzte Effekte haben: *dnc* erhöht die cAMP-Menge, *rut* vermindert sie, so daß die cAMP-Menge nur noch leicht erhöht ist (Livingstone 1984). Es kommt also auf die präzise Regulierung von cAMP an und nicht auf die absolute Menge. Die Sterilität der *dnc*-Weibchen konnte allerdings durch die *rut*-Mutation unterdrückt werden. Hier kommt es offenbar auf die absolute Menge an cAMP an.

Die ursprüngliche *rut*-Mutation ist durch EMS (Ethylmethansulfonat) - Mutagenese erzeugt worden (Livingstone 1984), welche hauptsächlich zu Punktmutationen führt. Die Mutation (*rut*¹) besteht in einem Basenaustausch an der Position 3459 in der Wildtyp-cDNA: Ein Adenin an der Stelle von Guanin. Das führt zu einem Arginin an Stelle von Glycin an der Aminosäure-Position 1026 (Levin 1992). Die Defizienz-Komplementations-Analyse ergab, daß die Mutation in den Banden 12F5-7 auf dem X-Chromosom liegt (Livingstone 1984; Livingstone 1985).

Fünf P-Elementinsertionslinien, deren P-Elemente in dieser Region liegen und die aus einer Suche nach pilzkörperspezifischen Enhancern stammen, wurden im klassischen olfaktorischen Lernparadigma getestet und zeigten alle signifikant verminderte Lernwerte. Drei von ihnen konnten das *rut*¹-Allel nicht komplementieren. Eine dieser Linien, nämlich *rut2080* wurde für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zur Wiederherstellung des Gedächtnisses (Rettung; „rescue“) als Mutante verwendet. Der Insertionsort des dazugehörigen P-Elements liegt 155 Nukleotide stromaufwärts vom 5'-Ende der Adenylatzyklasen-cDNA (Levin 1992).

Die *rut*-kodierte Zykklase und die AC I von Säugetieren weisen starke Homologien auf. 2 Bereiche mit jeweils 6 Transmembrandomainen, jede gefolgt von einer cytoplasmatischen Schleife, charakterisieren beide Proteine. Das *Drosophila*-Enzym enthält einen zusätzlichen 120 kd Schwanz nach der 2. Schleife, so daß das gesamte

Protein zweimal so groß ist, wie das Säugerprotein. Das Drosophila $G_{\alpha s}$ kann die Säuger-AC stimulieren (Quan 1991).

Laut einer neueren Arbeit (Guo 2000) greift das Drosophila-Homolog eines Tumor-Suppressor-Gens in den *rut*-Signaltransduktionsweg ein und ist für das olfaktorische Lernen essentiell: Das Ras-Gap (GTPase activating protein), vom Gen *Neurofibromatose 1* (*Nf1*) kodiert. *Nf1*-Fliegen haben einen partiellen Lerndefekt, ähnlich wie *rut*-Fliegen. Dieser Defekt kann in einem „rescue“-Experiment, bei dem in adulten *Nf1*-Fliegen durch einen Hitzeschock das *Nf1*-Gen aktiviert wird, behoben werden. Das bedeutet, daß Entwicklungsdefekte keine Rolle für das Lerndefizit spielen. Die *rut/Nf1*-Doppelmutante lernt genau so wie die Einfachmutante (im Gegensatz zur *rut/dnc*-Doppelmutante; siehe oben). Das könnte bedeuten, daß beide Genprodukte sehr dicht im cAMP-Transduktionsweg beieinander liegen, denn die Effekte addieren sich nicht. In biochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die AC-Aktivität aus einer *Nf1*-abhängigen und einer *Nf1*-unabhängigen Komponente besteht, wobei die *Nf1*-abhängige Komponente die *rut*-AC, also die AC I, involviert (Guo 2000).

DCO (*dco*) ist das Gen für die Proteinkinase A. Drain et al. zeigten, daß einerseits die Inhibition der PKA, andererseits deren Überexpression Lernen und Gedächtnis im klassischen olfaktorischen Lernparadigma zerstören (Drain 1991). Ähnlich wie im Falle von cAMP zerstören also eine Verminderung wie eine Erhöhung der Menge an PKA das Lernen.

volado (*vol*) codiert für α -Integrin, ein Molekül, das Zelladhäsion und Signaltransduktion vermittelt. *vol*-Fliegen sind im olfaktorischen Gedächtnis gestört, und auch dieses Molekül ist, wie die Glieder der cAMP-Kaskade, stark in den Pilzkörpern vertreten (Grotewiel 1998).

fasciclin II (*fasII*) kodiert für ein NCAM von Vertebraten und apCAM von *Aplysia* verwandtes Protein. Es ist ebenfalls ein Zelladhäsionsmolekül, das der Adhäsion und Migration von Neuronen und der Stabilisierung und dem Wachstum von Synapsen an der neuromuskulären Endplatte dient. Wegen der starken Expression dieses Gens in den

Pilzkörpern wurden *fasII*-Fliegen in einer neueren Arbeit (Cheng 2001) auf olfaktorisches Lernen getestet. Sie erwiesen sich als Lernmutanten, und das Gedächtnis konnte durch Expression des normalen Gens in *fasII*-Fliegen kurz vor dem Training gerettet werden. Die Pilzkörper sind nicht sichtbar durch eventuelle Entwicklungsdefekte verändert.

leonardo (*leo*) entspricht einem Gen, das bei Säugern für die zeta-Isoform des 14-3-3-Proteins, die dort hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird, kodiert. Biochemisch waren die 14-3-3-Proteine schon lange bekannt. Über die Funktion wurde zum ersten Mal etwas bekannt, als sich herausstellte, daß *leo*-Fliegen eine Störung im Geruchslernen haben (Skoulakis 1996). Wie bei den Adhäsionsmolekülen handelt es sich also um ein Protein, von dem nicht primär bekannt ist, daß es mit dem cAMP-Weg zusammenhängt. Vielmehr hängen die 14-3-3 Proteine über eine Interaktion mit RAF1 mit dem MAPK (Mitogen Aktivated Protein Kinase) - Weg zusammen. Es ist auch bekannt, daß die PKC, die einen Einfluß auf das Gedächtnis (*turnip*, PKM; siehe S. 49 f.) hat, 14-3-3 bindet. Es ist denkbar, daß die nicht *rut*-abhängige synaptische Plastizität (*rut*-Fliegen haben noch 60% des ursprünglichen Lernwertes) durch solche alternativen Wege erklärt werden kann. *leo* ist verstärkt im Pilzkörper exprimiert.

Fliegen mit einer temperatur-sensitiven Mutation im Gen für die **Dopa-Decarboxylase** (*Ddc*) lernen ebenfalls schlecht im Geruchs-Lernparadigma. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von Dopamin und Serotonin (Wright 1981). Bei 20°C ist die Enzymaktivität schon leichtgradig, bei der restriktiven Temperatur von 29°C noch stärker reduziert. Bei verschiedenen Allelen unter permissiver und restriktiver Temperatur ergeben sich unterschiedlich hohe Enzymwerte und diese korrelieren mit der Lernleistung der Fliegen (Livingstone 1983; Tempel 1984). Wahrscheinlich sind Dopamin oder Serotonin die modulierenden Transmitter, die über das G-Protein die AC aktivieren. Wenn nicht genügend Transmitter hergestellt wird, kann der US also nicht die plastische Synapse modulieren.

Das Genprodukt von *amnesiac* (*amn*) hat Ähnlichkeit mit Neuropeptiden von Vertebraten und einem hypothalamischen Peptid (pituitary-adenylyl-cyclase-activating

peptide; PACAP), das die Fähigkeit besitzt, Adenylatzyklen zu aktivieren (Davis 1996). Möglicherweise aktiviert das Produkt von *amn*, von dem noch nicht bekannt ist, ob es bei *Drosophila* wirklich ein Neuropeptid ist, über einen Transmembranrezeptor und das G-Protein die Adenylatzyklase. *amn*-Fliegen haben zwar fast wildtypische Lernwerte, aber die Erinnerung fällt schnell ab (auf 0.4 nach 30 min; auf 0.35 nach 1 h). Damit ist *amn* verantwortlich für „middle-term-memory“ (MTM; siehe S. 55) (Tully 1985).

Das *amn*-Genprodukt ist im Gegensatz zu anderen geruchs-lern-relevanten Genen nicht in den Pilzkörpern sondern hauptsächlich in zwei Neuronen (eines pro Hemisphäre) außerhalb der Pilzkörper exprimiert, den DPM („dorsal paired medial“) - Zellen. Diese jedoch innervieren mit ihren Axonverzweigungen die Pilzkörper-Loben, und das spricht wieder für die Bedeutung der Pilzkörper hinsichtlich des olfaktorischen Gedächtnisses. Wenn man in einem „rescue“ - Experiment in *amn*-Fliegen das wildtypische Gen nur in den DPM-Zellen exprimiert, ist das Kurzzeitgedächtnis (in diesem Fall das 1-h-Gedächtnis) wieder völlig normal, die Wiederherstellung in den Pilzkörpern führt zu keinem „rescue“. Wenn man andererseits die synaptische Übertragung der DPM-Zellen in normalen Fliegen hemmt, bekommt man einen Gedächtnisdefekt wie in *amn*-Fliegen (Waddell 2000). Dazu war ein temperatursensitives *shibire* (*shi*) - Allel (*shi*^{ts1}) verwendet worden. *shi* kodiert für Dynamin, eine Mikrotubulus - assoziierte GTPase, die an der Endozytose und dem „recycling“ von Vesikeln beteiligt ist, und wirkt dominant negativ durch Bildung nicht - funktioneller Multimere. Expression von *shi*^{ts1} z. B. nur in den Photorezeptorzellen oder in cholinergen Neuronen führt reversibel zu Blindheit bzw. Lähmungen. *shi*^{ts1}, nur in den DPM-Neuronen exprimiert, führt bei der restriktiven Temperatur von 29 °C reversibel zu einem Stopp der synaptischen Übertragung auf die Pilzkörperneurone.

amn in diesen beiden modulatorischen Neuronen ist also notwendig und hinreichend für das Geruchsgedächtnis. Von Neuropeptiden ist bekannt, daß sie intrazelluläre Signalkaskaden länger als andere Neurotransmitter stimulieren. Das *amn*-Genprodukt könnte also eine längerfristige Erhöhung der cAMP-Konzentration bewirken, nachdem

das Lernen schon erfolgt ist, und damit zur Überbrückung der Zeit bis zur Ausbildung von Langzeitgedächtnis beitragen (Waddell 2000).

Bei *turnip* (*tur*) sind ebenfalls Lernen und Gedächtnis im olfaktorischen Lernparadigma gestört (Aceves-Pina 1983). Bei *tur*-Fliegen ist die Proteinkinase C (PKC) vermindert. Allerdings wird nur eine indirekte Beeinflussung der PKC vermutet, da die bekannten Strukturgene für die PKC nicht mit *turnip* identisch sind. Eine Verbindung der PKC zur cAMP-Kaskade wird angenommen (Smith 1986). Auskunft über die PKC selbst bezüglich ihrer Bedeutung für das Lernen kann nicht von der PKC-Mutante erhalten werden, da die Mutation letal ist. Aber die Expression der dauerhaft aktiven atypischen Isoform der PKC der Maus (MaPKM ζ) in *Drosophila* 30 min nach dem Lernen im klassischen olfaktorischen Paradigma *verbesserte* nach Drier et al. das Gedächtnis. Die Induktion durch Hitzeschock vor dem Training hatte keinen positiven Einfluß. Auch das Gedächtnis nach Massentraining ohne Zwischenpausen („massed training“) konnte gesteigert werden, aber nicht das nach Massentraining mit Pausen („spaced training“).

Der Lerndefekt von *rsh*-Fliegen, bei denen nach „massed training“ kein ARM gebildet wird, konnte durch PKM-Expression behoben werden. Andererseits hatte das Füttern von Chelerytrin, einem Inhibitor der PKM ζ , sowie die Expression eines „dominant negativen“ MaPKM ζ -Proteins (KI-MaPKM ζ ; ohne Kinase-Aktivität) einen negativen Effekt auf das Gedächtnis, aber nicht auf das Lernen. Überdies konnte das Gedächtnis auch durch die Induktion des *Drosophila*-Homologs der aPKM (DaPKM) nach dem Lernen gesteigert werden (Drier 2002). Die Autoren vermuten, daß die PKM für den Erhalt, nicht die stärkere Ausbildung des Gedächtnisses verantwortlich ist, da das *Lernen* durch Inhibition nicht beeinträchtigt wird, und auch eine Induktion vor dem Lernen keinen positiven Einfluß hat. Die selektive Verbesserung des Gedächtnisses nur nach „massed training“ könnte daher rühren, daß nach „massed training“, im Gegensatz zu „spaced training“, normalerweise nicht die PKM involviert würde, so daß also das Anschalten dieses zusätzlichen Weges das Gedächtnis verbessern kann (nach „spaced training“ aber eine Störung bedeutet) (Drier 2002). Die PKC hat eine ähnliche Bedeutung für die Aufrechterhaltung von LTP (siehe 1.4.5.) bei Mäusen: Die Injektion von MaPKM ζ in CA 1 - Zellen führte zu einer Potenzierung der Übertragungsstärke,

die wiederum durch Chelerytrin und KI-MaPKM ζ (ohne Kinase-Aktivität) gehemmt werden konnte (Ling 2002).

shaker (*sh*) hat einen Defekt im Gen für einen spannungsgesteuerten K⁺-Ionenkanal (Kamb 1988). Die Fliegen sind im olfaktorischen Lernparadigma lern- und gedächtnisgestört. Der von der PKA in *Aplysia* phosphorylierte K⁺-Kanal (siehe 1.4.1.) ist nicht spannungsabhängig.

Weitere Lernmutanten im olfaktorischen Lernparadigma, über welche molekular noch wenig bekannt ist, sind: *cabbage* (*cab*) (Aceves-Pina 1979), *latheo* (*lat*) (Boynton 1992), *linotte* (*lio*) (Dura 1993), *radish* (*rsh*) (Folkers 1993), *nalyot* (*nal*) (DeZazzo 2000). *lat* und *lio* haben auch strukturelle Gehirndefekte.

Bei *Drosophila* ist außerdem die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaM-Kinase) von Wichtigkeit für das Lernen (Griffith 1993). Es konnte durch induzierbare Expression eines Inhibitors der CaM-Kinase gezeigt werden, daß dadurch die Balzkonditionierung (assoziativ) und das akustische „priming“ (nicht-assoziativ) gestört werden.

Viele dieser Gene, die für olfaktorisches Lernen benötigt werden, sind in den Pilzkörpern besonders stark exprimiert, so z. B. *dnc*, *rut*, *dco*, *vol*, *fasII*, *leo* und *sh*. Aber auch in anderen Gehirnregionen läßt sich ihre Expression nachweisen (z. B. Heisenberg 1994; Waddell 2001a). Die erhöhte Expression spricht für die Pilzkörper als möglichen Ort von Lernen und Gedächtnis. Die *rut*-Adenylatzyklase befindet sich hauptsächlich in den Pedunkeln und Loben der Pilzkörper (mögliche Folgerungen für die Konvergenz von US und CS siehe unter 4.).

Die **erfahrungsabhängige strukturelle Plastizität** im *Drosophila*-Gehirn ist verknüpft mit der cAMP-Kaskade. Es wurde gezeigt, daß das Volumen der Calyces bei Fliegen, die in Helligkeit aufgezogen werden, größer ist, als bei Fliegen ohne visuelle Erfahrung. Dies, obwohl bei *Drosophila* bislang keine direkten Verbindungen von den optischen Loben zu den Pilzkörpern gefunden wurden. Dieser Unterschied ist aber bei *dnc*- und

amn-Fliegen, die eine gestörte cAMP-Kaskade aufweisen, nicht auszumachen. Wie beim Lernen ist also auch bei der erfahrungsbedingten strukturellen Plastizität eine funktionierende cAMP-Kaskade notwendig. Allerdings hat die Mutation *rut*¹ keinen Einfluß auf die Calyxgröße, wobei *rut* im Calyx innerhalb der Pilzkörper auch vergleichsweise gering repräsentiert ist. Möglicherweise wird durch eine andere AC als die AC I genügend cAMP hergestellt. Allerdings ist die Calyxgrößenzunahme, die von einer erhöhten Populationsdichte bei der Aufzucht herrührt, nicht nur bei *dnc* und *amn* Fliegen nicht mehr vorhanden, sondern auch bei *rut* Fliegen. Also bedienen sich diese beiden (visuelle Erfahrung; Populationsdichte) auf Erfahrung beruhenden Strukturveränderungen unterschiedlicher Mechanismen (Barth 1997).

1. 5. 4. 2. Speicherung – Wiederabruf - Vergessen

Zwei Arbeiten aus dem Jahre 2001 (Dubnau 2001; McGuire 2001) kamen zu dem selben Ergebnis, daß Neurotransmission von den Kenyon-Zellen auf extrinsische Neurone nicht für das Erlernen und die **Speicherung** sondern nur für das **Wiederabrufen** der Information nötig ist. Dazu exprimierten sie mit Hilfe der Gal4-Technik *shi*^{ts1} in den Pilzkörpern, das, wie oben erläutert, von Waddell in den DPM-Neuronen verwendet worden war. Oberhalb von 29 °C schaltet es reversibel die Neurotransmitter-Ausschüttung durch Hemmung des „recycling“ von Vesikeln ab. Zunächst ergab sich eine Zerstörung des 3-min-Gedächtnisses durch *shi*^{ts1}-Expression während Training und Test durch die Gal4-Linien MB 247 und *c739*, nur eine nicht-signifikante Abschwächung bei 201y (McGuire 2001). Da *c739* hauptsächlich in den α/β -Loben, und 201y hauptsächlich im γ -Lobus (201y hat auch Expression im α -/ β -Lobus, jedoch schwächer als im γ -Lobus) exprimiert, ergibt sich nach Ansicht der Autoren das α/β -System als notwendig für Lernen. Um die Komponenten Lernen, Speicherung und Wiederabruf unterscheiden zu können, wurde *shi*^{ts1} dann zum einen während des Trainings, zum anderen zwischen Training und Test und dann während des Tests (nach 30 min bei Dubnau, nach 3 h bei McGuire) durch Temperaturerhöhung aktiviert. Danach wurde es durch Absenken der Temperatur jeweils wieder inaktiviert. Das Ergebnis war, daß Neurotransmission von den Kenyon-Zellen auf nachgeschaltete

efferente Neurone nicht für den Lernvorgang und die 30-minütige oder 3-stündige Speicherung notwendig ist, daß sie aber für das Wiederabrufen des Gedächtnisses gebraucht wird. McGuire verwendete hier nur die Linie c739. Das Ergebnis sprach damit dafür, daß die chemischen Synapsen (es könnten im Pilzkörper auch elektrische Synapsen vorhanden sein; Waddell 2001a; S. 1272) im α/β -System funktionsfähig sein müssen, damit Gedächtnis abgerufen werden kann. Dubnau benutzte die weniger selektiven Pilzkörper-Linien c747, die c772 in dieser Arbeit entspricht, und c309, die ebenso wie c747 schon von Connolly et al. zur Überexpression des G-Proteins benutzt worden war, und kam zu dem gleichen Ergebnis.

Die Autoren argumentieren, daß die molekularen Veränderungen auf der Grundlage der *rut*-Adenylatzyklase zur Gedächtnisbildung „oberhalb“ des Pilzkörperausgangs, also im Calyx oder sogar im Antennallobus stattfinden. Aber: „Diese zwei Veröffentlichungen sagen uns, daß Lernen ohne Pilzkörperausgang - nicht, daß Lernen unabhängig von den Pilzkörpern auftritt“ (Übersetzung aus Waddell 2001a, S. 1272). Durch *shi* wird ja nicht die AC I gehemmt. Die einfachste Vorstellung ist, daß die AC an den präsynaptischen Endigungen der Kenyon-Zellen als Koinzidenzdetektor fungiert, wobei beim Lernen dort keine Transmitterausschüttung nötig ist. Diese ist aber dann beim Test notwendig, wenn das Gelernte in Verhalten umgesetzt wird. Die Ergebnisse der *rut*-„rescue“-Experimente (siehe 3.) zeigen, daß *rut*-abhängige synaptische Plastizität im Antennallobus weder notwendig noch hinreichend (189y hat dort Expression) für Gedächtnis ist.

Welche molekularen Mechanismen spielen beim **Vergessen** eine Rolle? In einer neueren Arbeit (Schwaerzel 2002) wurde gezeigt, daß Extinktion der im Pilzkörper lokalisierten Geruchs-Gedächtnisspur auch dann erfolgt, wenn die Pilzkörperausgangsneurone durch *shi*^{ts1} unter MB 247 oder c772 in ihrer Transmission blockiert werden. Daß die Kurzzeit-Gedächtnisspur dort lokalisiert ist, wurde in der hier vorgelegten Arbeit gezeigt; in der Arbeit von Schwaerzel et al. konnte auch längerzeitiges Gedächtnis im Pilzkörper lokalisiert werden (siehe S. 90 f.). Wenn *shi*^{ts1} aber durch eine Gal4-Linie (GH146) exprimiert wird, die die Eingangsneurone des Pilzkörpers blockiert, tritt keine Extinktion auf. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß

Extinktion durch eine Abschwächung genau der synaptischen Verbindung erfolgt, die durch das Lernen verstärkt worden war, daß also kein neuer Lernvorgang den alten durch *interzelluläre* Wechselwirkungen unterdrückt, sondern daß Extinktion ein *intrazellulärer* Vorgang ist. Da Extinktion auch in *rut*-Fliegen auftritt, ist die AC I wahrscheinlich nicht an den molekularen Mechanismen des Vergessens beteiligt. Die Autoren vermuten einen bislang unbekanntem Inhibitor, der entweder den cAMP-Spiegel senkt bzw. die PKA oder die PKA-Substrate hemmt, wenn der CS⁺, also der Duft, der vorher bestraft wurde, alleine, ohne US, präsentiert wird und dadurch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in Abwesenheit einer G-Protein-Aktivierung ansteigt. Es wird in diesem Zusammenhang auf ein *Drosophila*-Gen hingewiesen, das homolog zu einer Säuger-AC (Typ IX) ist, die durch Ca²⁺/Calmodulin *inhibiert* wird, außerdem auf Calcineurin, eine Ca²⁺/CaM-abhängige Phosphatase, die die PKA-Wirkungen antagonisieren könnte (Schwaerzel 2002).

1. 5. 4. 3. Molekulare und strukturelle Grundlagen des Langzeitgedächtnisses bei *Drosophila*

Wie schon erwähnt konnten Tully et al. zeigen, daß *Drosophila* ein Langzeitgedächtnis (**long-term memory; LTM**) im klassischen olfaktorischen Paradigma erwerben kann, wenn man die Zahl der Trainingszyklen erhöht (Tully 1994) (siehe Abb. 9). 10 Trainingszyklen, wobei bei jedem die üblichen 12 Elektroschocks gegeben werden, ergeben ein 7-Tage-Gedächtnis von 0.3 (Lernindex; siehe 2.4.2.), allerdings nur, wenn zwischen jedem Zyklus eine 15-minütige Pause liegt („spaced training“). Wenn man die 10 Trainingzyklen unmittelbar hintereinander durchführt („massed training“) bildet sich definitionsgemäß kein Langzeitgedächtnis, sondern nur ein 4 Tage lang anhaltendes Gedächtnis, welches die Eigenschaft hat, unempfindlich gegen Kälteanästhesie zu sein (**anesthesia-resistant memory; ARM**). Daß Unterbrechungen zwischen den Trainingseinheiten zu länger anhaltendem Gedächtnis führen, ist vielfach beobachtet worden und gilt auch für Vertebraten einschließlich des Menschen (Ebbinghaus 1885; Carew 1972; Hintzman 1974; Frost 1985). Diese beiden Gedächtnisformen (LTM und

ARM) sind bei *Drosophila* genetisch voneinander unterschiedene, parallele Pfade der Speicherung.

LTM ist abhängig von Proteinsynthese. Das konnte durch Füttern von Cycloheximid, ähnlich wie schon bei Mäusen (siehe S. 24), demonstriert werden. Den Fliegen wurde der Proteinsynthese-Hemmer 12-15 h vor dem Training im olfaktorischen Paradigma und auch während der Zeitspanne zwischen Training und Test gefüttert: Der Lernwert 24 h nach dem Training war auf 41% des Wertes der Kontrolltiere reduziert (Tully 1994). LTM wird nur durch „spaced training“ erzeugt. ARM (der 41%-,„Rest“ nach 24 h) wird sowohl durch „spaced training“ als auch durch „massed training“ erzeugt. ARM nach „massed training“ wird durch Cycloheximid-Gabe nicht beeinträchtigt. Aber es wird, im Gegensatz zu LTM, durch die Mutation *rsh* (Folkers 1993) vollständig zerstört.

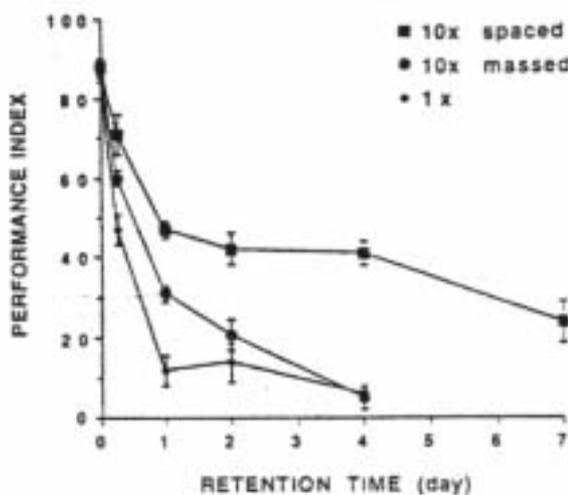


Abb. 9: Zeitliche Verläufe des Gedächtnisses von *Drosophila* nach Einfach-, Zehnfach- („massed“) und Zehnfach-Training mit jeweils 15-minütigen Pausen zwischen jedem Trainingsabschnitt („spaced“) (Abb. aus Tully 1994).

Die Gedächtniswerte sind additiv, d. h. bei *rsh*-Fliegen besteht der Lernwert z. B. einen Tag nach dem „spaced training“ nur noch aus der LTM-Komponente. Daher weiß man, daß die LTM-Komponente innerhalb von 7 Tagen in etwa auf dem gleichen Niveau bleibt und der Gesamtabfall des Gedächtnisses durch den Abfall der ARM-Komponente

begründet ist. Dagegen besteht bei Fliegen mit gehemmter Proteinsynthese der Lernwert nach „spaced training“ nur noch aus der ARM-Komponente. Beide Werte addiert ergeben den Lernwert von Wildtyp-Fliegen. *rsh*-Fliegen, denen man Cycloheximid füttert, haben einen Tag nach „spaced training“ kein Gedächtnis mehr.

Doch bevor sich das Gedächtnis in ARM und LTM „aufspaltet“, müsse es, so Tully et al. (Tully 1994), die Phasen des Kurzzeitgedächtnisses (**short-term memory; STM**) und des Mittelzeitgedächtnisses (**middle-term memory; MTM**) durchlaufen (siehe Abb. 10). Das Kurzzeitgedächtnis, welches unmittelbar nach dem Lernen entsteht und ca. 2 h anhält, sei durch Mutationen in den Genen *dnc* und *rut* gestört. Das Mittelzeitgedächtnis, das das Maximum innerhalb einer Stunde nach dem Lernen erreicht und binnen 5 h auf null abfällt, sei durch die *amn*-Mutation, die sich durch initial hohe, dann aber rasch abfallende Lernwerte auszeichnet, gestört. Aus MTM entwickelten sich dann parallel ARM und LTM. Die beiden Mutationen *lat* und *lio* beeinträchtigten dagegen nur das Lernen und schon nicht mehr das Kurzzeitgedächtnis (Boynton 1992; Dura 1993).

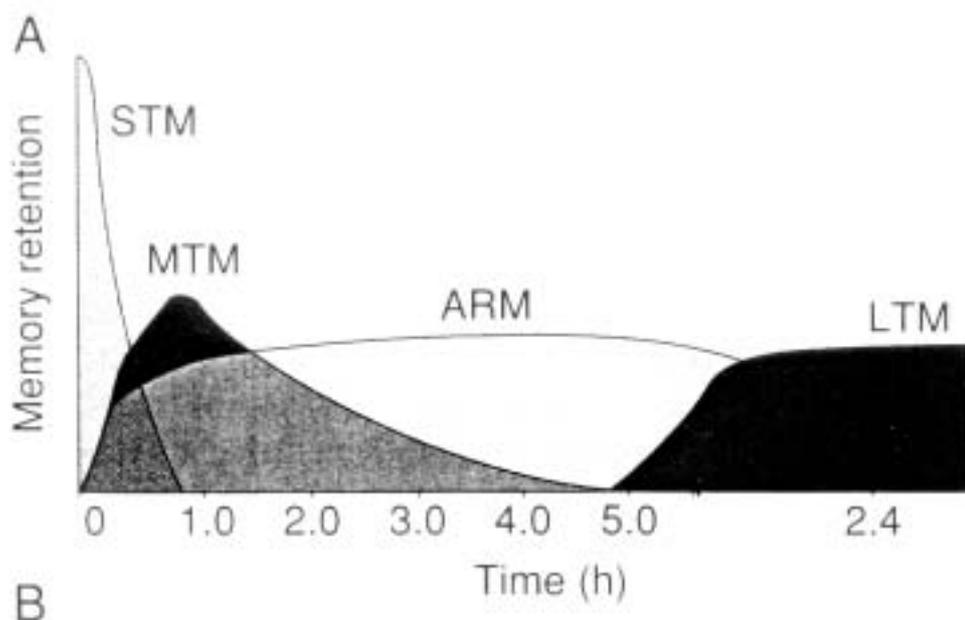


Abb. 10: Zeitliche Abfolge der unterschiedlichen Gedächtniskomponenten bei *Drosophila*. Die dargestellten Kurven ergeben sich durch Subtraktion der Lernwerte

von Mutanten und pharmakologisch behandelten Fliegen von den wildtypischen Lernwerten. (Abb. aus DeZazzo 1995).

Das Drosophila-Homolog des *CREB*-Gens ist für die Ausprägung von LTM und die Initiierung der Proteinsynthese verantwortlich. Die dCREB2-a Isoform ist ein PKA-abhängiger Transkriptionsaktivator (wie CREB-1 bei *Aplysia*). Die dCREB2-b Isoform ist ein Repressor der dCREB2-a -Transkriptionsaktivierung (wie CREB-2 bei *Aplysia*).

Fliegen mit dem *dCREB2-b*-Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Hitzeschockpromotors (Golic 1989) wurden 3 h nach Hitzeschockgabe trainiert. Hierbei wird die Transkription des Gens durch hohe Temperatur (Hitzeschock) induziert. Das Ein-Tages-Gedächtnis nach „spaced training“ war bei Fliegen, die den Hitzeschock erhalten hatten halb so groß wie bei Kontrollfliegen ohne Hitzeschock (Yin 1994). Andererseits konnte gezeigt werden, daß die induzierte Expression der aktivierenden *dCREB2-a* Isoform die Formierung von LTM verstärkt. Schon durch *einen* Trainingzyklus konnte das sonst nur nach „spaced training“ gebildete 7-Tage-Gedächtnis erzeugt werden. Phosphorylierung des dCREB2-a Aktivators ist eine Voraussetzung für seine Aktivität. Veränderte Aktivatoren mit einem Aminosäureaustausch im Bereich der PKA-Phosphorylierungssequenz, durch Hitzeschock induziert, konnten kein LTM nach einmaligem Training hervorbringen (Yin 1995).

Yin et al. versuchen mit diesen Ergebnissen die Notwendigkeit der Trainingspausen beim „spaced training“ zu erklären. Nur wenn das Training mit Unterbrechungen durchgeführt wird, bildet sich das Langzeitgedächtnis aus. Experimente mit unterschiedlich langen Pausen zeigten einen Anstieg des Lernindex mit schrittweiser Verlängerung der Pause von 1 bis 15 min. Noch längere Pausen bewirkten keine weitere Erhöhung. Die Autoren argumentieren (Yin 1995), daß durch das Training sowohl der CREB-Aktivator als auch der CREB-Repressor aktiviert würden. Doch zunächst überwiege die reprimierende Wirkung des CREB-Repressors, der den Aktivator davon abhält, die für das Langzeitgedächtnis nötigen Gene zu aktivieren. Aber während der Trainingspause würde der Repressor schneller als der Aktivator inaktiviert werden, so

daß die Menge an nicht reprimiertem Aktivator ΔC ($\Delta C =$ Menge an Aktivator – Menge an Repressor) zunehme und während vieler Wiederholungen von Training und Zwischenpause eine Akkumulation stattfände. Erhöhe man nun durch transgene Expression die Menge an Aktivator, reiche schon ein einfaches Training aus, daß ΔC positiv würde, erhöhe man die Menge an Repressor, reiche auch „spaced training“ nicht aus, um ein positives ΔC zu erzeugen.

Ein Teil der Pilzkörper ist notwendig für Langzeitgedächtnis nach „spaced training“ (Pascual 2001). Bei der Mutation „*alpha-lobes-absent*“ (*ala*) fehlen bei einem Teil der Fliegen ausschließlich die vertikalen Loben (α und α'), bei einem anderen Teil zwei der drei horizontalen Loben (β und β'), ein dritter Teil besitzt alle 5 Loben (einschließlich des γ -Lobus). Die jeweiligen Loben fehlen, da sich die Neurone in den Pedunkeln nicht wie üblich in die zwei Äste für die α - und β -Loben bzw. die α' - und β' -Loben aufzweigen, sondern nur in eine Richtung weiterziehen. Es stellte sich heraus, daß das 24-h-Gedächtnis nach „spaced training“ bei Fliegen ohne vertikale Loben null war, bei Fliegen ohne horizontale Loben dagegen normal. Dies, obwohl die Nervenäste der vertikalen und horizontalen Loben in der Entwicklung aus den selben Pedunkel-Neuronen abzweigen. Bemerkenswert ist, daß zwar nur dann das Gedächtnis zerstört war, wenn mit „spaced training“ gelernt worden war, aber daß dann nicht, wie zu erwarten, nur der LTM-Anteil nach 24 h fehlte, sondern auch der ARM-Anteil. Nach „massed training“ war der LI bei Fliegen ohne vertikale Loben so groß wie bei *ala*-Fliegen mit allen 5 Loben.

Bei Fliegen ohne vertikale Loben sind die β - und β' -Loben in der Mitte fusioniert. Da dies aber auch bei normal lernenden *ala*-Fliegen mit allen 5 Loben der Fall ist, erklärt das nicht den Langzeitgedächtnis-Defekt. Die vertikalen Loben sind nur für Langzeitgedächtnis notwendig. Das 3-h-Gedächtnis sowie das 24-h-Gedächtnis nach „massed training“ waren unbeeinträchtigt. Ob das Kurzzeitgedächtnis z. B. von den γ -Loben, die in *ala*-Fliegen nicht verändert erschienen und die nach den Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit der Hauptort des Kurzzeitgedächtnisses sind (siehe 3.), später zu den vertikalen Loben transferiert wird, oder ob Kurz- und Langzeitgedächtnis von Anfang an parallel angelegt werden, ist eine offene Frage (Pascual 2001).

Da bei diesen Befunden Teile des Gehirns ablatiert sind, kann man, wie bei den *mbm*- und *mbd*-Fliegen, nicht schließen, daß das Langzeitgedächtnis in den vertikalen Loben abgelegt wird, sondern nur, daß sie eine der dafür notwendigen Strukturen sind. Man darf auch nicht vergessen, daß die Pilzkörper in einem größeren Zusammenhang gesehen werden müssen: Sie sind z. B. auch für Kontextgeneralisierung wichtig (Liu 1999). Es wäre etwa denkbar, daß solch eine umfassendere Funktion für die besonderen Anforderungen zur Ausbildung von Langzeitgedächtnis gerade nach „spaced training“ nötig ist, wobei der „Kontext“, auf den sich die Generalisierung beziehen würde, hier mehr *zeitlicher* Natur wäre, und es aus diesem Grund bei Fehlen der vertikalen Loben nicht aufgebaut werden kann. Pascual et al. vermuten, daß das Langzeitgedächtnis nach „spaced training“ und Proteinsynthesehemmung deswegen nur teilweise zerstört wird, weil noch eine Restaktivität von Ribosomen vorhanden bleibt (Pascual 2001). Denn in den *ala*-Experimenten wird auch dieser Rest zerstört, weshalb dem 24-h-Gedächtnis nach „spaced training“ ein gemeinsamer molekularer und zellulärer Mechanismus zugrundeliegen sollte. Wenn man aber annimmt, daß bei fehlenden vertikalen Loben nicht speziell Proteinsynthese-abhängiges LTM betroffen ist, sondern der *Lernvorgang* bei „spaced training“ geschädigt ist, könnte man argumentieren, daß auch nicht-Proteinsynthese-abhängiges ARM nach „spaced training“ in solchen Fliegen nicht gebildet wird. Bei den Experimenten zur Kontextgeneralisierung war kein Unterschied zwischen vertikalen und horizontalen Loben gemacht worden. Die Gal4-Linie 17d, die verwendet worden war, exprimiert in α - und β -Loben. Es ist also nicht auszuschließen, daß für die Kontextgeneralisierung nur die vertikalen Loben notwendig sind.

1. 6. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Es war, wie in der Einleitung ausführlich geschildert, zu der Zeit, als diese Arbeit begonnen wurde, bekannt, daß die Pilzkörper von *Drosophila melanogaster* für olfaktorisches Lernen und Gedächtnis *notwendig* sind. Man darf jedoch Einzelstrukturen im Gehirn nicht isoliert vom Gesamtgehirn betrachten, da man davon ausgehen kann, daß das Gehirn ein Netzwerk ist, in dem die Funktion der einzelnen Teile voneinander abhängt, sich also die Veränderung eines Teils auf andere Teile auswirkt. Wenn also das Gedächtnis an einer anderen Stelle als im Pilzkörper lokalisiert wäre, könnte die Ablation des Pilzkörpers z. B. eine wichtige Verbindungsbahn zu dieser Stelle oder einen unentbehrlichen Ort zur Vorverarbeitung der Information zerstören. Es könnte auch auf das Zusammenspiel zwischen Pilzkörper und anderen notwendigen Arealen ankommen, etwa bei der Formierung und Stabilisierung des Gedächtnisses, im Sinne eines Informationsaustausches oder der Ausbildung eines Kreislaufs. Die konsolidierte Gedächtnisinformation schließlich könnte über mehrere Gehirnregionen verteilt sein. Man weiß also nicht, ob der Pilzkörper das einzige notwendige Areal ist, obwohl natürlich mit der Überexpression von $G_{\alpha s}$ (Connolly 1996) (siehe S. 39) außerhalb des Pilzkörpers die Notwendigkeit einiger anderer Gehirnregionen schon ausgeschlossen wurde.

Neben der Notwendigkeit der Pilzkörper für das olfaktorische Gedächtnis war im Vorfeld dieser Doktorarbeit ebenso die Bedeutung der Adenylatzyklase für synaptische Plastizität in verschiedenen Modellorganismen hinreichend deutlich geworden. Der strukturelle und biochemische Ansatz wurde nun zu einem „rescue“-Experiment vereinigt. Das zentrale Paradigma faßt Abb. 11 zusammen. In der Mutante für die AC I wurde das wildtypische *rut*-Gen einerseits nur im Pilzkörper, andererseits außerhalb des Pilzkörpers im Gehirn mit Hilfe des Gal4-UAS-Systems exprimiert. Damit ist die *rut*-abhängige synaptische Plastizität jeweils nur im einen oder anderen ausgewählten GehirnaREAL zu erwarten, und die so veränderten Fliegen können in einem Verhaltensexperiment auf ihre Gedächtnisleistung, für die die synaptische Plastizität die molekulare Grundlage ist, getestet werden. Würde der Lernwert der *rut*-Mutante durch die pilzkörperspezifische Wiederherstellung von *rut* wieder wildtypisch (Rettung,

„rescue“), aber durch eine Wiederherstellung außerhalb des Pilzkörpers nicht, würde das dafür sprechen, daß *rut*-abhängige synaptische Plastizität ausschließlich in den Pilzkörpern für die Gewährleistung des olfaktorischen Gedächtnisses ausreicht. Damit wäre das Gedächtnis lokalisiert. Man hätte nicht nur einen weiteren, zusätzlichen Beweis für die Notwendigkeit der Pilzkörper für Geruchsgedächtnis, sondern hätte die früheren Experimente auf fruchtbare Weise so vervollständigt, daß die Aussage zuträfe, daß die Pilzkörper für olfaktorisches Lernen und Gedächtnis *notwendig und hinreichend* sind.

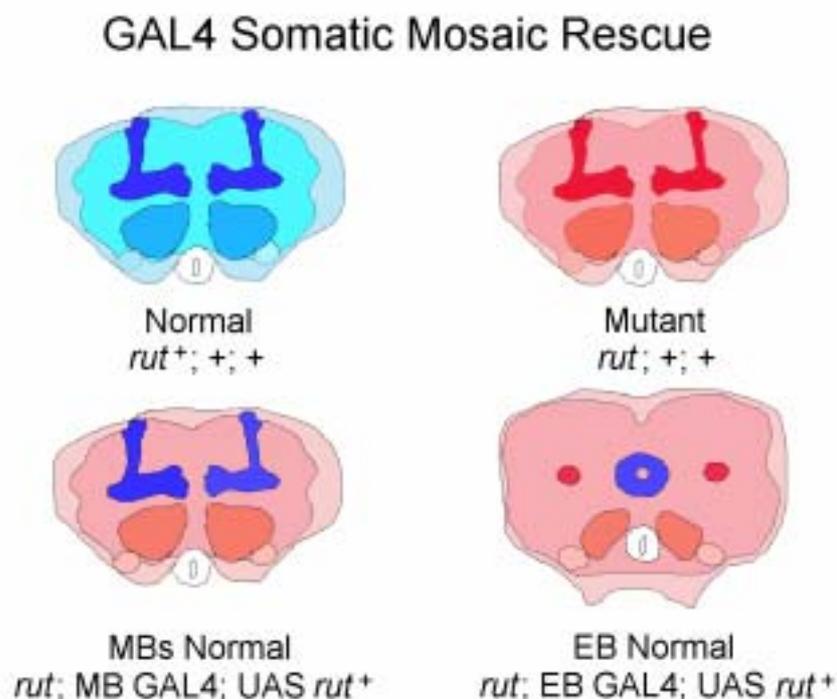


Abb. 11: Gal4 somatischer Mosaik-„rescue“; dunkel = wildtypisch (links oben); hell = mutant (rechts oben); MB: mushroombody (Pilzkörper), EB: ellipsoid body (Ellipsoidkörper); Abb. links unten: wildtypisches *rut*-Gen ausschließlich in den Pilzkörpern: Pilzkörper dunkel, Hintergrund hell. Abb. rechts unten: wildtypisches *rut*-Gen ausschließlich außerhalb der Pilzkörper: Ellipsoidkörper dunkel; Pedunkel der Pilzkörper und Hintergrund hell.

2. Materialien und Methoden

2. 1. Fliegen

Die Fliegen wurden auf Maismehl/Molasse-Medium (Zusammensetzung siehe Guo 1996) bei 25°C, 60% Luftfeuchtigkeit und einem 16h hell/8h dunkel-Rhythmus gehalten. Die Wildtyp-Fliegen waren vom Stamm Canton S. Die verwendeten Genotypen der transgenen Fliegen sind bei den einzelnen Ergebnissen im Teil 3 aufgeführt.

2. 2. Gal4-Technik und UAS_{Gal4-*rut*}⁺-Fliegen

Die Gal4-Technik wurde von Brand und Perrimon (1993) entwickelt (siehe Abb. 12). Sie macht sich die Existenz von P-Elementen zu Nutze. P-Elemente sind Transposons, also bewegliche Gene, die bei Anwesenheit von einem als Transposase bezeichneten Protein, das gewöhnlich durch das P-Element selbst kodiert wird, ihre ursprüngliche Position im Genom verlassen und an einer anderen Stelle wieder inserieren können. Lässt man ein P-Element, das selbst keine Transposasefunktion mehr besitzt und statt dessen den Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 trägt, zufällig ins Genom inserieren, kann es zu folgendem Effekt kommen: Das Gen für den Hefe-Transkriptionsfaktor, vor dem sich ein schwacher Promotor befindetet, gerät unter die Kontrolle eines Enhancers, der normalerweise die Aktivität eines nahegelegenen Gens nach einem bestimmten zeitlichen und räumlichen Muster kontrolliert. Der Hefe-Transkriptionsfaktor wird dann nach dem selben Muster exprimiert. Dieses Muster kann sich auf eine abgrenzbare Gehirnregion wie die Pilzkörper oder den Zentralkomplex beschränken, in der Regel sind jedoch mehrere Strukturelemente gleichzeitig betroffen. Die Expressionsmuster der in dieser Arbeit verwendeten Linien werden unter 3.1. dargestellt.

Die Fliegen einer solchen Gal4-Linie kann man mit Fliegen einer anderen Linie kreuzen, die ein Reporter gen unter der Kontrolle einer UAS (upstream activating sequence)_{Gal4}-Sequenz im Genom tragen, an welche der Transkriptionsfaktor binden

und die Transkription aktivieren kann. Auf diese Weise lässt sich das entsprechende Gen in nur denjenigen Gehirnregionen aktivieren, in denen das Gal4-Element aktiv ist. Das Reportergen kann z. B. für Tetanustoxin kodieren, welches zur funktionellen Ausschaltung der Neuronen führt, oder Tau, welches zur Sichtbarmachung des Expressionsmusters (siehe 2.3.) dient.

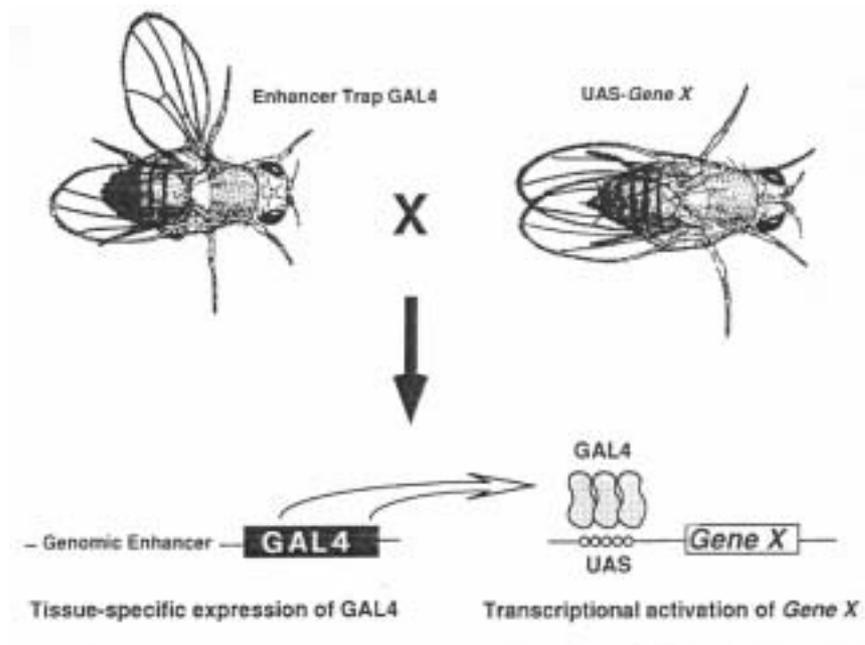


Abb. 12: Die Kreuzung zwischen Fliegen, die das Gal4-Element tragen und Fliegen, die das Reportergen X unter der Kontrolle der Gal4-abhängigen UAS (upstream activating sequence) - Sequenz tragen, ergibt Fliegen, bei denen das Gen X in den Zellen exprimiert wird, in denen Gal4 exprimiert wird (Abb. aus Brand 1993).

Für die hier durchgeführten „rescue“ - Experimente wurde die wildtypische *rut*⁺-cDNA unter die Kontrolle des UAS_{Gal4}-Promotors gebracht. Diese Arbeit wurde von Dr. Troy Zars durchgeführt. Dazu wurde die *rut*-cDNA von einem „bluescript“ Vektor (Levin 1992) mit Kpn1 und Xba1 Schnittstellen in einen pUAST Vektor (Brand 1993) subcloniert. Durch diesen Schritt wurden 294 Nukleotide vom nicht translatierten 3'-Ende entfernt, aber das vermeintliche Stoppcodon wurde dabei nicht verändert. Die UAS_{Gal4}-cDNAs, nach dem Standardprotokoll in das Fliegen-genom (3. Chromosom)

integriert, wurden, unter der Verwendung einer cantonisierten FM7a; SM1-Linie, in einen *rut2080*-Hintergrund gekreuzt (Zars 2000b).

2. 3. Immunhistochemie

Um die Expressionsmuster der verwendeten Gal4-Linien darzustellen, wurde UAS-Tau als Reporter verwendet (Ito 1997). Das von einer Rinder-cDNA kodierte Mikrotubulus-assoziierte Protein Tau, ein neuronales Protein, verteilt sich auf das ganze Axon und läßt sich mit Anti-Tau Antiserum sichtbar machen. Gal4 *+/+* - Fliegen wurden mit UAS-Tau *+/+* - Fliegen gekreuzt. Die mit Äther betäubten Fliegen wurden am Halskonnektiv auf Krägen (bis zu 20 Fliegen pro Krage) aufgefädelt (Heisenberg 1979) und bis zur Fixierung auf Eis gestellt. Die Fixierung erfolgte 4 h lang in Carnoy-Fixativ.

Carnoy-Fixierlösung (50 ml):

30 ml 100% Äthanol

15 ml Chloroform

5 ml Eisessig

Es folgten Waschschrte in 100% Äthanol: zweimal 30 min und einmal 1 h in 100% trockenem Äthanol. Inkubation über Nacht in Methylbenzoat. Am nächsten Tag 1 h Inkubation in Paraffin-Methylbenzoat (58°C). Danach wurden die Fliegen in den Krägen achtmal jeweils 30 min in flüssiges Paraffin (Merck, Darmstadt; Schmelzpunkt bei 56-58 °C) mit einer Temperatur von 58 °C getaucht und daraufhin in Paraffinblöcke gegossen. Die Krägen wurden von den Paraffinblöcken abgetrennt, so daß nur noch die Köpfe der Fliegen in den Blöcken zurückblieben. Daraufhin wurden die Köpfe im Paraffin mit einer Schichtdicke von 7 µm mit einem Mikrotom (Jung; Heidelberg) geschnitten und die entstehenden Schnittbänder auf mit Eiweiß-Glycerin (Hühner-Eiweiß; Chroma, Münster) bestrichenen Objektträgern bei 42 °C gestreckt. Nach dem Antrocknen: Entparaffinierung mit Xylol: zweimal 30 min; sowie Rehydrierung durch

eine absteigende Äthanolreihe: je 15 min 96%, 90%, 70% und 50% Äthanol. Danach Spülen mit Aqua destillata und Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift.

Die weiteren Schritte fanden in einer geschlossenen feuchten Kammer statt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern: Inkubieren in PBT (1x PBS plus 0.1% Triton X-100; zu PBS siehe unten) für 15 min. Dann 3 h inkubieren mit 2% Pferde-Serum (in PBT). Bei 4 °C über Nacht inkubieren mit anti-Tau (Monoklonaler Antikörper; Sigma, Steinheim) 1:1000 in 0.1% PBT. Am nächsten Tag wurde dreimal 10 min mit 0.1% PBT gewaschen. Dann wurde der Zweitantikörper (anti-mouse; Vectastain Elite ABC Kit; Vector Lab., Inc., Burlingame) zugegeben: 1:100 in PBT für 1 h. Danach wurde nochmals mit 0.1% PBT dreimal 10 min gewaschen. Dann wurde 30 min inkubiert mit dem ABC-Komplex (aus Vectastain Elite ABC Kit), der 30 min vorher angesetzt worden war: auf 100 µl PBT je 1 µl Reagenz A und Reagenz B. Dann wurde wiederum dreimal 10 min mit 0.1% PBT gewaschen, worauf die Färbung mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin; Sigma, Steinheim) folgte.

Dazu wurden 5 ml DAB mit 5 µl Wasserstoffperoxid gemischt. Die Färbung wurde durch Abstoppen mit 1x PBS (10x PBS: 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na₂HPO₄, 2,4g KH₂PO₄, pH 7,4) zu dem Zeitpunkt beendet, an dem die Färbung unter dem Mikroskop ausreichend kontrastreich erschien (nach ca. 3 min). Danach wurde erwärmtes (~50 °C) flüssiges Glycergel (Zubereitung aus: 7g Gelatine, 50g Glycerin, 0,5g Carbonsäure-Kristalle in 42 ml H₂O) aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt.

2. 4. Verhaltensexperimente

Wie unter 1.5.1. bereits erwähnt, können Drosophila-Fliegen olfaktorisch konditioniert werden. In dieser Arbeit wurden die Fliegen mit der von Tully und Quinn (Tully 1985) entwickelten Apparatur zur klassischen olfaktorischen Konditionierung trainiert. Bei der klassischen Konditionierung (siehe 1.2.2.1.) wird eine Assoziation zwischen CS und US hergestellt. In dem in dieser Arbeit verwendeten Paradigma wurden 2 Gerüche verwendet, von denen in jedem Einzelexperiment jeweils einer mit Elektroschocks als

US gepaart wurde. Dies ist der CS⁺. Der andere Geruch, der CS⁻ wurde ohne gleichzeitige US-Applikation dargeboten. Die Fliegen konnten dann nach einer bestimmten Zeit, je nach dem, welche Gedächtnisspanne man testen wollte, zwischen den beiden Gerüchen wählen. Bei geglücktem Experiment entschied sich die große Mehrzahl der Fliegen für den vorher unbestraften Geruch (CS⁻).

2. 4. 1. Trainingsapparatur

Die Trainingsapparatur (siehe Abb. 13) bestand aus einem Trainingsröhrchen, das innen mit einer flexiblen Leiterplatine ausgekleidet war, über welche den Fliegen Elektroschocks verabreicht werden konnten. Nur an der zur Trainingsapparatur gerichteten Öffnung, an der die Luft abgesaugt wurde, befand sich eine Stelle ohne Leiterplatine, an der den Fliegen also keine Schocks gegeben werden konnten. Doch war die Ausdehnung dieses Areal (ca. 2 cm²), verglichen mit der hohen Anzahl von Fliegen im Röhrchen (~100), sehr klein.

Von dem Trainingsröhrchen konnten die Fliegen in einen verschiebbaren Zwischenraum durch leichtes Klopfen befördert und von dort zu den zwei Teströhrchen verschoben werden, wo sie sich für eines der Röhrchen entscheiden konnten. Die Teströhrchen waren 10 cm lang und hatten einen Durchmesser von 1.7 cm. Das Trainingsröhrchen war 8.1 cm lang und hatte den selben Durchmesser wie die Teströhrchen. Jedes Röhrchen besaß an einem Ende ein feinmaschiges Netz, durch welches Luft hineinströmen konnte, die über das verschiebbare Zwischenstück mit einer Geschwindigkeit von 12.5 ml/sec durch eine Wasserstrahlpumpe angesaugt wurde. Damit die Geschwindigkeit in den zwei Teströhrchen genau so groß war wie im Trainingsröhrchen, wurde die Luft aus den zwei Teströhrchen mit doppelter Geschwindigkeit (25 ml/sec) angesaugt.

Zwei Behältnisse mit den Duftstoffen wurden in zwei Duftröhrchen plaziert. Wenn man diese auf die Röhrchen mit den Fliegen außen aufsteckte, strömte die mit dem Duft angereicherte Luft in das Röhrchen und über die Fliegen. Die Duftbehälter in den

Duftröhrchen hatten eine Oberfläche von 12 mm² für Benzaldehyd und von 95 mm² für Methylcyclohexanol, die jeweils als Reinstoffe verwendet wurden und beide eine abstoßende Wirkung auf die Fliegen haben. Die Größe der Duftbehälter (d. h. die Größe der Oberfläche, über die die Duftstoffe mit Luft in Berührung kamen) wurde so gewählt, daß der Lernindex bei Bestrafung des einen Geruches so groß war, wie bei Bestrafung des anderen. Dies war nicht identisch mit der natürlichen Präferenz der Fliegen. Bei den angegebenen Oberflächengrößen war Benzaldehyd für die Fliegen abstoßender als Methylcyclohexanol, sowohl, wenn untrainierte Fliegen die Wahl zwischen den beiden Gerüchen hatten, als auch, wenn man abwechselnd einen der Gerüche gegen Luft testete (siehe Tab. 2). Möglicherweise assoziieren die Fliegen die Elektroschocks besser mit Methylcyclohexanol als mit Benzaldehyd und lernen es besser, was die natürliche Präferenz ausgleichen würde.

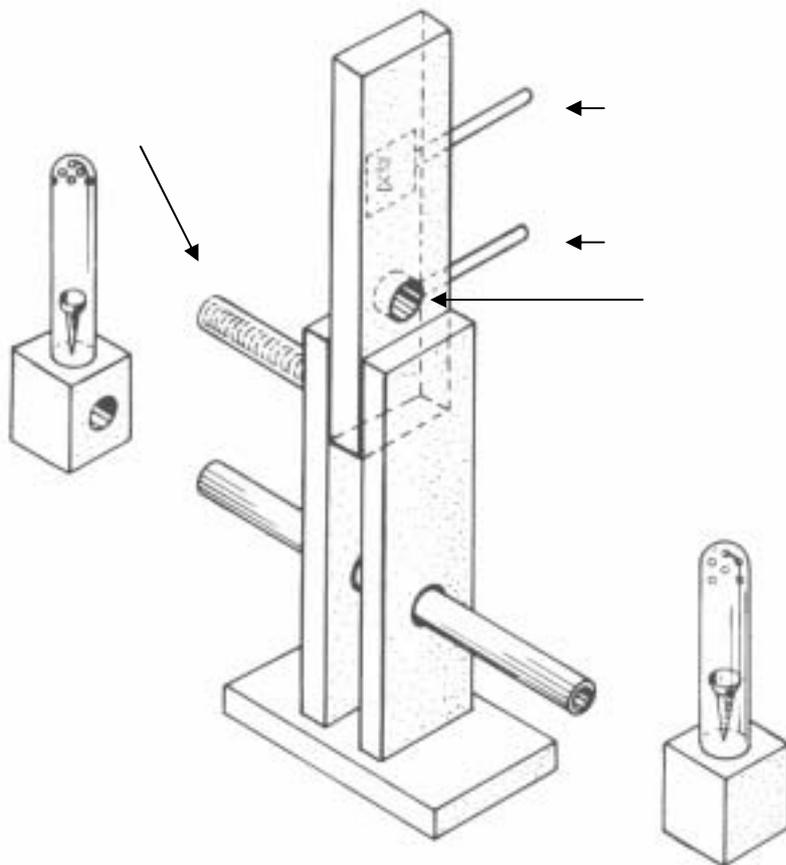


Abb. 13: Apparatur zur klassischen Konditionierung von Drosophila mit einem Trainingsröhrchen mit Drahtspirale (schräger Pfeil; oben) und zwei Teströhrchen (unten). In der Mitte befindet sich ein verschiebbares Zwischenstück mit Anschlüssen für die Wasserstrahlpumpe (kleine Pfeile). In dem Zwischenstück befindet sich ein kleiner Hohlraum (großer horizontaler Pfeil). Nach dem Training werden die Fliegen dort hinein bewegt und können in dem senkrechten Schieber soweit heruntergeschoben werden, daß der Hohlraum direkte Verbindung zu den seitlichen Röhren der „Testebene“ erhält. Dargestellt sind außerdem die beiden Duftröhrchen mit den Behältnissen für die Duftstoffe, die auf die Fliegen-Röhrchen außen aufgesteckt werden können (Abb. modifiziert nach Tully 1985).

2. 4. 2. Standardtraining

Ungefähr 300 Fliegen, die zwischen 1 und 6 Tagen alt waren, wurden am Vortag des Experiments in frische Gläser mit dem Standardmedium ohne Hefe und Filter gesetzt. Dort konnten sie sich über Nacht putzen und hatten vergleichbare Umgebungsbedingungen (bezüglich Alter des Glases und Mediums, sowie bezüglich „Stress“ durch eine bestimmte Gesamtzahl von Fliegen im Glas). Die getesteten Fliegen waren dann also zwischen 2 und 7 Tagen alt. Für ein Experiment wurden ca. 100 Fliegen in das Trainingsröhrchen gebracht. Dafür wurde eine selbstgebaute Vorrichtung zum Ansaugen der Fliegen aus den Gläsern verwendet: Über einen Plastikschauch wurden die Fliegen in ein Glasröhrchen (\varnothing etwa 5 mm) gesaugt, welches am hinteren Ende mit einem feinmaschigen Netz abgedichtet war. Von dort wurden sie vom Experimentator vorsichtig in das Trainingsröhrchen geblasen.

Im Trainingsröhrchen waren sie zu Beginn des Experiments für 90 sec frischer Luft ausgesetzt. Dann wurde eines der beiden Duftröhrchen 60 sec lang auf das Fliegenröhrchen aufgesetzt und gleichzeitig Elektroschocks von 120 V für 1.25 sec alle 5 sec, also insgesamt 12 Schocks, verabreicht. Nach einer 45 sec dauernden Periode mit Frischluft folgten weitere 60 sec mit dem anderen Duft, aber ohne Elektroschocks. Nach wiederum 45 sec Frischluft wurden die Fliegen durch dreimaliges Klopfen aus dem

Trainingsröhrchen in das verschiebbare Zwischenstück bewegt und dort zwischen der Trainings- und Testebene gefangen gehalten. Von dort wurden sie nach weiteren 60 sec an den Wahlpunkt zwischen den beiden Teströhrchen geschoben. Innerhalb dieser 60 sec war ein Ventil umgeschaltet worden, so daß die Luft jetzt durch den unteren Pfad angesaugt wurde; außerdem wurden die vorher verwendeten Duft- und Duftröhrchen auf die beiden Teströhrchen gesteckt.

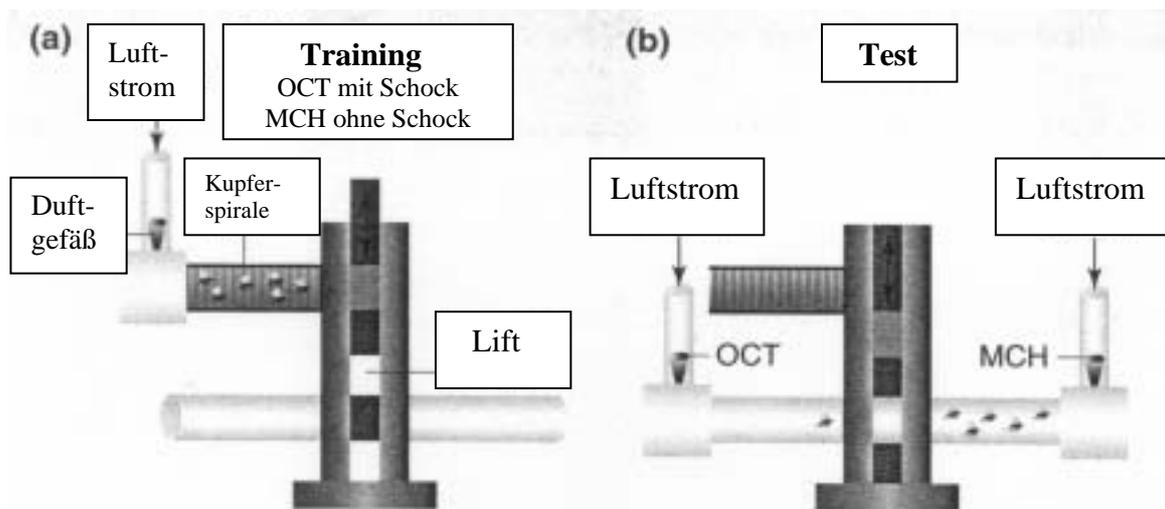


Abb. 14: (a) Training: Methylcyclohexanol (MCH) wird nicht mit Elektroschocks gepaart; Octanol (OCT) wird damit gepaart (in der hier vorgelegten Arbeit wurde statt OCT Benzaldehyd verwendet). (b) Test: Die Fliegen wurden im beweglichen „Lift“ nach unten zum Wahlpunkt verschoben und haben sich für den vorher unbestraften Geruch (Methylcyclohexanol; MCH) auf der rechten Seite entschieden. (Abb. modifiziert aus: Waddell 2001b; Beschriftung ins Deutsche übersetzt)

Am Wahlpunkt wurden die Fliegen gleichzeitig von einer Seite mit dem vorher nicht bestrafte, von der anderen Seite mit dem vorher bestrafte Geruch konfrontiert und hatten 120 sec Zeit, sich für eine Seite zu entscheiden. Danach wurde das zentrale bewegliche Element nach oben geschoben, um die Fliegen in den jeweiligen Röhrchen gefangen zu halten und sie später zählen zu können. Die im „Lift“ befindlichen Fliegen (durchschnittlich ~5) wurden nicht mitgezählt. Die Fliegen wurden daraufhin mit CO₂ betäubt und gezählt. Eine Betäubung vor dem Experiment wurde vermieden, um das

Verhalten der Fliegen nicht zu beeinflussen, statt dessen wurden sie nur durch Schütteln oder Ansaugen mit dem Mundschlauch bewegt.

Das Gedächtnis wird im **Lernindex (LI)** quantitativ erfaßt.

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

A = Anzahl der Fliegen, die den bestrafte Geruch vermieden haben; B = Anzahl der Fliegen, die den bestrafte Geruch nicht vermieden haben. Ein LI von 1 bedeutet, daß alle Fliegen gelernt haben und sich auch entsprechend verhalten haben. Ein Index von 0 bedeutet, daß keine Fliege gelernt hat, daß also in beiden Teströhrchen gleich viele Fliegen sind. Ein Index von -1 besagt, daß sich alle Fliegen für den bestrafte Geruch entschieden haben.

Ein **vollständiges Experiment** bestand aus 2 Teil-Experimenten. In dem einen wurde Methylcyclohexanol bestrafte, in dem anderen Benzaldehyd. Dann wurde der Mittelwert aus beiden Lernindices errechnet: „**Vollständiger**“ **LI**. Der **endgültige Lernindex** einer Fliegenlinie ist der Mittelwert aus 6 solchen vollständigen Lernindices. Das entspricht ca. 1200 getesteten Fliegen. Die Experimente mit einer Linie erstreckten sich in der Regel über drei verschiedene Tage, und Fliegenstämme, von denen ein schlechtes Lernen erwartet wurde, wurden soweit wie möglich zur selben Zeit mit Stämmen gemessen, von denen gutes Lernen erwartet wurde.

Alle Experimente wurden in Dunkelheit durchgeführt. Nur eine 665 nm Rotlichtquelle, für die Fliegen nicht sichtbar und auf die Apparatur zentriert, war in Betrieb. Die Raumtemperatur betrug 25 °C und wurde durch einen Heizlüfter konstant gehalten, der an einen Thermostat angeschlossen war. Die Luftfeuchtigkeit betrug mindestens 85%. Der Luftbefeuchter wurde nur zwischen den Experimenten angeschaltet, um eine Beeinflussung der Fliegen durch Vibrationen auszuschließen. Diese Bedingungen sind erforderlich, um ein optimales Lernen zu gewährleisten (Tully 1985; DeBelle 1994). Die hohe Luftfeuchtigkeit erzeugt einen Feuchtfilm in dem Trainingsröhrchen,

welcher den Widerstand zwischen Draht und Fliegenbein verringert und damit den Elektroschock wirksamer macht.

Vor jeder Reihe von Experimenten wurden die Röhren etwa 30 min lang mit Fliegen beladen, weil sich herausgestellt hatte, daß der Lernindex in Röhren, in denen lange keine Fliegen waren, geringer ausfällt als nach einiger Zeit der „Reifung“ mit Fliegen (Tully 1985). Um den Lernindex zu verbessern, wurden außerdem vor jedem Experiment die Düfte für ca. 1 min in die Teströhren gesaugt, damit die Fliegen beim Test sofort dem Geruch ausgesetzt waren, der ansonsten erst langsam anströmen würde, wenn sich die Fliegen zu entscheiden hätten. Danach wurde die Mischluft aus dem zentralen Element herausgesaugt, damit dort keine Duftreste zurückblieben. Außerdem erschien eine vorsichtige Handhabung der Fliegen beim Hineinblasen, Klopfen und Verschieben des Zentralstücks für hohe Lernwerte von Bedeutung.

2. 4. 3. Test des 30 min - und des 4 h - Gedächtnisses

Beim Standardexperiment wird ca. 2 min nach dem Training getestet. Zum Test des Gedächtnisses nach längeren Zeitintervallen wurden die Fliegen nach der Trainingsphase, also nach der Präsentation des zweiten Geruchsstoffes, für 30 min in ein Röhren geklopft, das von den Ausmaßen her dem Trainingsröhren vergleichbar, nur kürzer (4 cm) war. Dort wurden sie, während die Experimente weiterliefen, belassen, nach 30 min mit dem Mundschlauch wieder angesaugt und in das Trainingsröhren geblasen. Nach 90 sec mit Frischluft wurde die 2. Hälfte des normalen Experiments durchgeführt, also 60 sec „Lift“, 120 sec Test.

Der Test des 4 h - Gedächtnisses unterschied sich nur in so weit von dem des 30 min-Gedächtnisses, als die Fliegen in der Zwischenzeit auf Zucht-Gläser mit Futter gesetzt und in die 25°C-Kammer gebracht wurden. Dies deshalb, um den Gedächtniswert nicht durch die Hungerbelastung zu beeinträchtigen. Weil aber der Transfer der Fliegen in die großen Gläser eine Mehrbelastung durch zweimaliges Klopfen und Ansaugen mit sich

bringt, wurde darauf bei den 30 min-Tests, bei denen der Futtermangel noch nicht ins Gewicht fällt, verzichtet.

2. 4. 4. Test der Geruchsvermeidung

Um zu testen, ob die Fliegen der unterschiedlichen Linien die Gerüche gleich gut wahrnehmen können, wurden 100 Fliegen im Trainingsröhrchen 90 sec mit Luft beströmt und konnten sich nach 60 sec im „Lift“ innerhalb von 120 sec zwischen frischer Luft in einem Röhrchen ohne Duftgefäß und einem der beiden Gerüche im anderen Röhrchen entscheiden. Die verwendeten Duftstoffe wurden von der Mehrzahl der Fliegen vermieden: Durchschnittlich etwa 95% der Fliegen zogen Frischluft dem angebotenen Geruch vor. In einem zweiten Experiment wurde der andere Geruch gegen Luft getestet und der **Vermeidungsindex (VI)** folgendermaßen berechnet:

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

A = Anzahl der Fliegen, die den Geruch vermieden haben; B = Anzahl der Fliegen, die den Geruch nicht vermieden haben. Wiederum wurde der Mittelwert aus beiden Teil-Experimenten berechnet (**vollständiger VI**). Dieses Doppelexperiment wurde sechsmal wiederholt, und der **endgültige VI** war der Mittelwert aus den 6 vollständigen Vermeidungsindices.

2. 4. 5. Test der Vermeidung von Elektroschocks

In ähnlicher Weise wurde gemessen, ob die Fliegenlinien den US gleich gut wahrnehmen und vermeiden. Nach 90 sec im Trainingsröhrchen und 60 sec im „Lift“ war für ca. 100 Fliegen eine Entscheidung zwischen zwei Trainingsröhrchen mit Leiterplatine und entsprechender Möglichkeit zur Verabreichung von Elektroschocks verlangt. In einem der beiden Röhrchen wurden 24 Schocks innerhalb von 120 sec

verabreicht, im anderen Röhrchen keine. Die Mehrzahl der Fliegen (durchschnittlich etwa 90%) vermied das Röhrchen, in dem Elektroschocks gegeben wurden.

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

A = Anzahl der Fliegen, die die Elektroschocks vermieden haben; B = Anzahl der Fliegen, die die Elektroschocks nicht vermieden haben. Die Seiten, auf denen Elektroschocks gegeben wurden, wurden in jedem Teil-Experiment vertauscht, der **vollständige VI** aus zwei Halbexperimenten durch Bildung des Mittelwerts errechnet, und der **endgültige VI** als Mittelwert von sechs vollständigen Vermeidungsindices ermittelt.

2. 5. Statistik

Zur Ermittlung von statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den verschiedenen Linien bei Lernexperimenten und Kontrollexperimenten wurde ein MANOVA (Sachs 1992) verwendet. Zur detaillierten Analyse wurde, wenn nötig, ein Duncan Post Hoc Test (beides in einem Statistica 4.5 Programm) herangezogen.

3. Ergebnisse

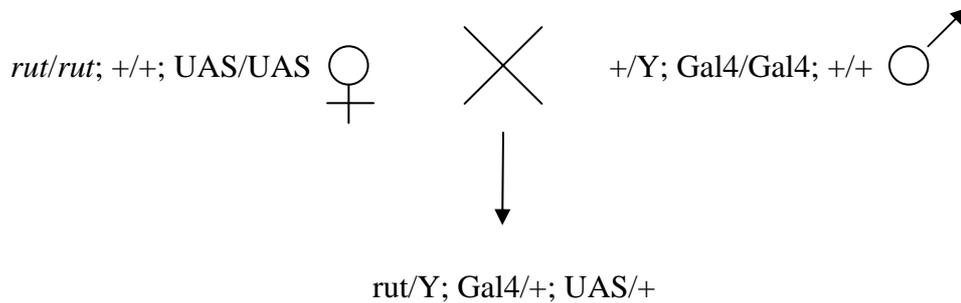
Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß bei *Drosophila* ausschließlich im Pilzkörper vorhandene *rut*-abhängige synaptische Plastizität ausreichend für wildtypisches Lernen und Kurzzeitgedächtnis im olfaktorischen Lernparadigma ist. Es besteht Grund zu der Annahme, daß der γ -Lobus diejenige Untereinheit des Pilzkörpers ist, die für den Erwerb des Kurzzeitgedächtnisses beim Geruchslernen von besonderer Bedeutung ist. Dagegen ist *rut*-abhängige Plastizität außerhalb des Pilzkörpers für normales Lernen nicht ausreichend.

Den idealisierten Darstellungen in Abb. 15 entsprechen am ehesten die beiden Gal4-Linien MB 247-36y mit ausschließlicher Pilzkörperexpression und c232 mit Expression im Ellipsoidkörper. Bei Expression der *rut*⁺-cDNA in *rut*-Fliegen durch die erstere Linie (Genotyp siehe unten) ergab sich im Verhaltensexperiment (2-min Gedächtnis) ein wildtypischer Lernwert, durch die letztere ein *rut*-typischer. Das Lernen konnte also bei MB 247 „gerettet“ werden, bei c232 nicht. Das spricht dafür, daß das Gedächtnis im Pilzkörper lokalisiert ist. Darüber hinaus wurden mehrere andere Linien getestet, die nicht so ausschließlich wie die beiden dem „Ideal“ nahekommenden Linien entweder im Pilzkörper oder außerhalb des Pilzkörpers exprimieren. Die Ergebnisse dieser anderen Linien weisen insgesamt in die selbe Richtung und erhärten damit die Hypothese der Lokalisation des Gedächtnisses im Pilzkörper, der die „Schnittmenge“ der „rescue“-Linien darstellt.

3. 1. Ergebnisse der Lernexperimente und Expressionsmuster der Gal4-Linien

Es wurden insgesamt elf Gal4-Linien auf ihre Fähigkeit untersucht, das Lernen bei *Drosophila* durch Expression der *rut*⁺-cDNA zu retten. Der Genotyp der männlichen Fliegen war: *rut*/Y; Gal4-Element/+; P[UAS_{GAL4}-*rut*⁺]/+, oder, wenn das Gal4-Element auf dem 3. Chromosom lag: *rut*/Y; +/-; P[UAS_{GAL4}-*rut*⁺]/Gal4-Element. Fliegenlinien des angegebenen Genotyps werden im folgenden mit dem Namen des Gal4-Elements bezeichnet.

Kreuzungsschema (in der F1-Generation ist nur der relevante männliche Genotyp und außerdem nur der Fall mit dem Gal4-Element auf dem 2. Chromosom dargestellt):



Trainiert und getestet wurden Fliegen beiderlei Geschlechts. Jedoch wurden nur die männlichen gezählt und ausgewertet, da sie hemizygot für die *rut*-Mutation waren und damit kein weiteres funktionierendes *rut*-Allel hatten. Dagegen hatten die weiblichen Fliegen auf dem zweiten X-Chromosom noch ein wildtypisches *rut*-Allel (und zeigten auch etwas bessere Lernwerte als die Männchen). Geruchslernexperimente, bei denen sich gleichzeitig getestete männliche und weibliche Tiere unterschiedlichen Genotyps im Verhalten unterschieden, hatten gezeigt, daß die Fliegen sich individuell entscheiden und nicht von anderen beeinflusst werden (Heisenberg, persönliche Mitteilung; Quinn 1974).

Diejenigen Linien, die wildtypische Lernindizes zeigen, werden als „rescue“ - Linien bezeichnet, und die Linien, für die das nicht zutrifft, als „nicht-rescue“ - Linien. Die Ergebnisse der Lernexperimente sind zusammen mit den Lernkontrollen in Abb. 15 zusammengefasst und werden im folgenden erläutert.

Zunächst wurden Fliegen vom Wildstamm Canton S (1. Säule in Abb. 15) und die Mutante *rut2080* (2. Säule in Abb. 15) gemessen. Die Lernwerte von **0,89** für Canton S und von **0,51** für *rut2080* entsprechen den aus der Literatur bekannten Werten (Tully 1985). Sie sind signifikant voneinander verschieden ($p < 0,0005$).

Die Gal4-Linie *elav*, die den Transkriptionsfaktor unterschiedslos in allen Neuronen von *Drosophila* exprimieren sollte, also auch im Pilzkörper, ergab keinen vergleichbar hohen Lernwert wie die „rescue“ - Linien, sondern war mit 0,68 sowohl von *rut* als

auch von Canton S signifikant verschieden. Zur Deutung dieses Ergebnisses siehe unter 4. 3. Für diese Linie wurden keine Kontrollexperimente durchgeführt, deshalb ist der Lernwert auch nicht in Abb. 15 aufgeführt.

Fünf der Linien, nämlich MB 247-36y, c772, 30y, 238y und H24 erreichten Lernwerte, die vom wildtypischen nicht signifikant verschieden waren („rescue“ - Linien; $p > 0,05$). Den höchsten Lernwert erreichte MB 247 (ein klonierter Enhancer des dMEF2-Gens; Schulz 1996), die einzige der Linien, die außerhalb des Pilzkörpers so gut wie keine Expression zeigt. Der LI von 201y nimmt eine Mittelstellung ein, indem er sich zwar signifikant von dem von *rut* unterscheidet ($p < 0,05$), aber auch signifikant vom wildtypischen unterschieden ist ($p < 0,005$) (Teil-Rettung; „partial rescue“).

Die Lernindices der Linien c232, 17d, 189y waren nicht signifikant von *rut* verschieden („nicht-rescue“ - Linien) ($p > 0,05$).

Eine weitere verwendete Linie, c522 war ebenfalls nicht signifikant von den *rut*-Fliegen verschieden, zeichnete sich aber dadurch aus, daß das Gal4-Element selbst einen dominant negativen Effekt auf das Lernen ausübte und daher nicht gefolgert werden kann, daß der niedrige Lernwert allein durch das Verteilungsmuster der Adenylatzyklase im Gehirn begründet ist. Da der dominante Effekt aber das Lernen nur teilweise beeinträchtigt, werden die Ergebnisse hier trotzdem erwähnt (siehe auch 3.3. und 4.3.).

Im folgenden werden die **Expressionsmuster** (siehe Abb. 16 und Tab. 1) zusammen mit den **Lernindices** (siehe Abb. 15 und Tab. 1) der „rescue“ - und „nicht-rescue“ - Linien aufgeführt.

„rescue“ - Linien:

MB 247-36y → 0,87

Expression ausschließlich im Pilzkörper. Dort in allen Untereinheiten: α/β -Loben, α'/β' -Loben, γ -Lobus. Jedoch, im Vergleich zu α/β -Loben und γ -Lobus, nur schwache

Expression im α' -und β' -Lobus. Auch die Verwendung des Reporters UAS-lacZ-KI2 (Schwaerzel 2002) zeigt diese Verteilung, außerdem ein schwaches Signal in einigen Gliazellen des Gehirns außerhalb des Pilzkörpers (dazu keine genauere Beschreibung in Schwaerzel 2002). Die Quantifizierung der Anzahl von Kenyon-Zellen, die unter dem MB 247-Treiber mit dem UAS-nls-lacZ-Reporter Expression zeigen, ergab eine Zahl von 711 ± 17 Zellen pro Hemisphäre in Männchen, von 825 ± 22 Zellen pro Hemisphäre in Weibchen (Schwaerzel 2002). Bei etwa 2500 Kenyon-Zellen pro Hirnhälfte sind also bei dieser Linie 1/4 bis 1/3 dieser Zellen betroffen.

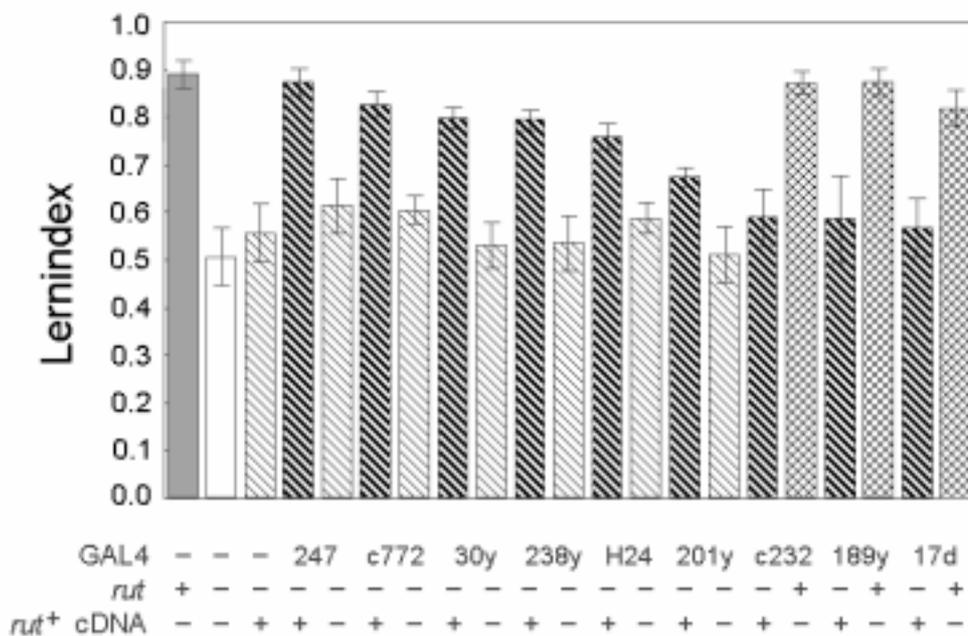


Abb. 15: Ergebnisse der Lernexperimente. Die Säulen repräsentieren den LI einer Fliegenlinie; die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar; $n=6$ für jeden Genotyp.

c772: → 0,83

Expression im gesamten Pilzkörper. Außerdem im Antennallobus, Ellipsoidkörper und fächerförmigen Körper (letzterer in Abb. 16 nicht dargestellt). Medianes Bündel. Verschiedene Bereiche des Protocerebrums. Die Zählung der exprimierenden Kenyon-Zellen (nicht der Zellen außerhalb des Pilzkörpers) wie bei MB 247 (siehe oben) ergab 842 ± 28 Zellen pro Hemisphäre in Männchen, 871 ± 47 Zellen pro Hemisphäre in Weibchen (Schwaerzel 2002). Also etwa 1/3 der Kenyon-Zellen. Die

Expressionsverteilung im gesamten Gehirn wird wiederum auch mit UAS-lacZ-KI2 als Reporter bestätigt (Schwaerzel 2002).

30y: → 0,80

Expression im gesamten Pilzkörper. Außerdem im Antennallobus, Ellipsoidkörper und fächerförmigen Körper.

238y: → 0,79

Expression im gesamten Pilzkörper. Außerdem im Antennallobus und Ellipsoidkörper. Medianes Bündel. Neurone der optischen Loben mit Ästen zum kontralateralen optischen Lobus und lateralen Protocerebrum (nach Connolly 1996; in Abb. 16 nicht zu sehen).

H24: → 0,76

Expression innerhalb des Pilzkörpers nur im γ -Lobus. Fleckförmige Expression im Antennallobus und einer Gruppe von Ringneuronen des Ellipsoidkörpers.

201y: → 0,67

Expression im Pilzkörper. Dort jedoch keine Expression im α' - und β' -Lobus. Im Vergleich zum γ -Lobus nur schwache Expression im α -/ β -Lobus. 4 Kenyon-Zell-Bündel, die schon im Calyx unterschieden werden können, verbinden sich im Pedunkel zu 2 Strängen, die sich dann aufteilen und in den Kern des α -Lobus und in den Kern des β -Lobus ziehen. Exprimierende Kenyon-Zellen mehr am Rand des Pedunkels projizieren ausschließlich in den γ -Lobus (Kaiser K., Information aus „flybrain“; www.flybrain.org): Betonte Anfärbung der Peripherie der Pedunkel im 3. Bild von links in Abb. 16 zu sehen. Expression auch im medianen Bündel.

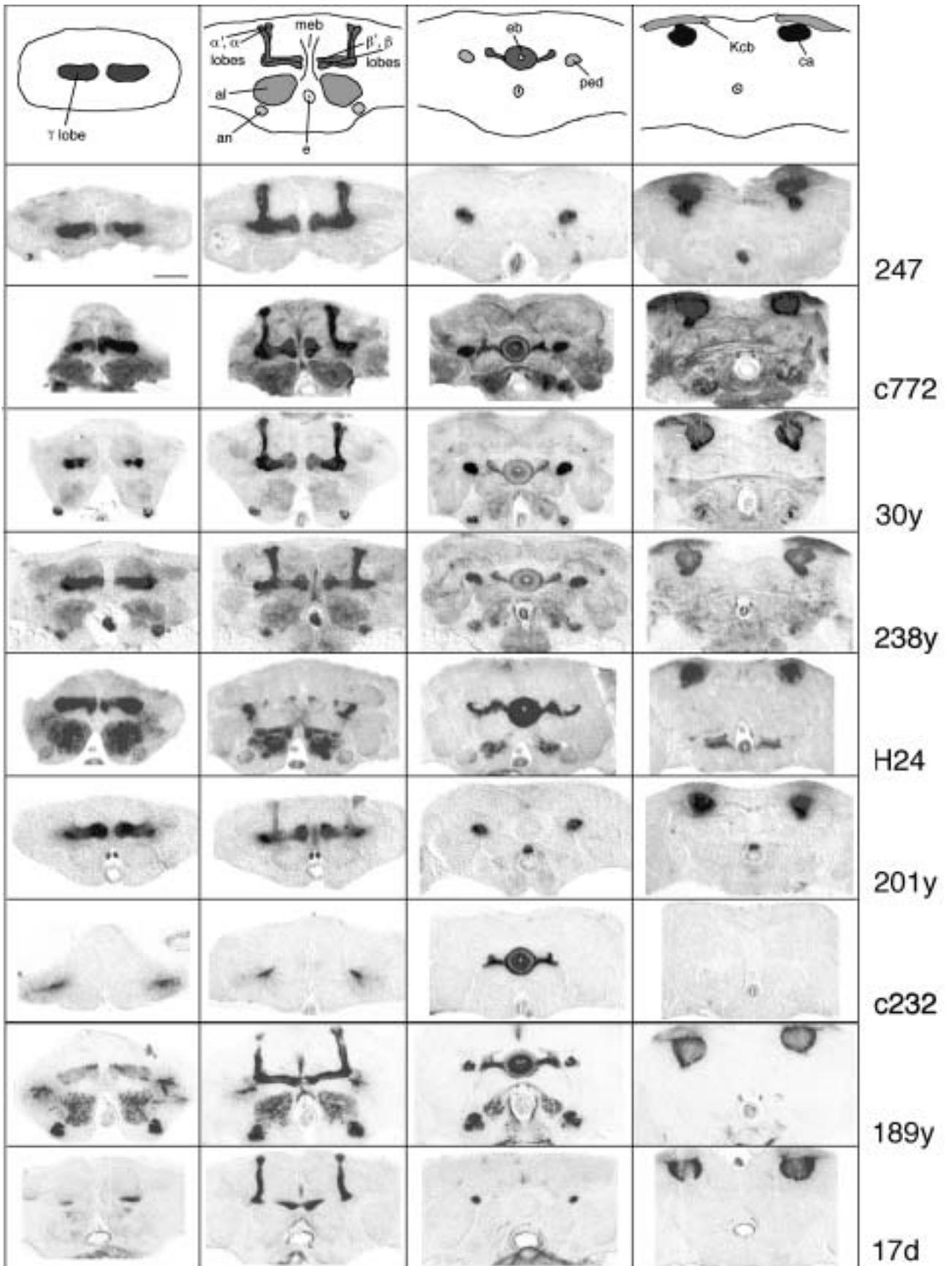


Abb. 16: Expressionsmuster der verwendeten Gal4-Linien im Gehirn mit dem Reporter $P[UAS_{GAL4-TAU}]$. Die frontalen Paraffin-Schnitte liegen (von links nach rechts) auf Höhe der γ -Loben; der α/β -, α'/β' -Loben und dem medianen Bündel; des Ellipsoidkörpers und der Pedunkel; der Calyces. Schemazeichnung: lobe = Lobus; al (antennal lobe) = Antennallobus; meb (median bundle) = medianes Bündel; an (antennal nerve) = Antennalnerv; e (esophagus) = Ösophagus; eb (ellipsoid body) = Ellipsoidkörper; ped (peduncle) = Pedunkel; Kcb (Kenyon cell bodies) = Kenyon-Zellkörper; ca (calyx) = Calyx. Dorsal ist oben. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

„nicht-rescue“ - Linien:

c232: → 0,59

Expression fast ausschließlich in den Ringneuronen des Ellipsoidkörpers.

189y: → 0,59

Expression in α - und β -Lobus und schwache Expression im γ -Lobus des Pilzkörpers. Außerdem im Ellipsoidkörper, Antennallobus und Antennalnerv. Medianes Bündel.

17d: → 0,57

Expression in α - und β -Lobus des Pilzkörpers. Im Gegensatz zu 201y in den Pedunkeln nur zentrale Anfärbung. Medianes Bündel.

	α/β -Lobus	α'/β' -Lobus	γ -Lobus	Ant.-Lobus	Ellipsoidk.	Med.Bündel
MB 247	+	+	+	-	-	-
c772	+	+	+	+	+	+
30y	+	+	+	+	+	-
238y	+	+	+	+	+	+
H24	-	-	+	+	+	-
<i>201y</i>	+	-	+	-	-	+
c232	-	-	-	-	+	-
189y	+	-	(+)	+	+	+
17d	+	-	-	-	-	+

Tab. 1: Expressionsverteilung der 9 Fliegen-Linien. Die „rescue“ - Linien, also die Linien, deren LI nicht signifikant vom wildtypischen verschieden ist, sind fett gedruckt, 201y mit „partial rescue“ kursiv.

3. 2. Langzeitgedächtnis

Zur Untersuchung des längerzeitigen Gedächtnisses wurden die Zeitspannen 30 min und 4 h gewählt, da in den ersten 30 min bei *rut*-Fliegen ein verhältnismäßig steiler Abfall des LI zu beobachten ist und nach 4 h der LI schon fast bei null liegt. Es wurde die „rescue“- Linie MB 247 gewählt, da sie den höchsten Lernwert von allen „rescue“-Linien hat und keine Expression außerhalb des Pilzkörpers besitzt. Es zeigte sich, daß schon nach 30 min der Lernwert dieser Linie signifikant niedriger ist als der wildtypische (siehe Abb. 17). Eine funktionierende Adenylatzyklase ausschließlich im Pilzkörper scheint also nicht auszureichen, um die Erinnerung in diesem Lernparadigma längere Zeit auf dem Niveau des Wildtyps zu halten. Trotzdem ist der Lernindex signifikant größer als der der reinen Mutante (Teil-Rettung; „partial rescue“). Es konnte jedoch in nach Abschluß dieser Arbeit durchgeführten Experimenten gezeigt werden, daß MB 247-Fliegen mit *zwei* Kopien des Gal4-Elements und der *rut*⁺-cDNA nach 30 min und 3 h nicht vom Wildtyp verschieden sind (volle Rettung; „full rescue“) (Schwaerzel 2002; siehe unter 4.4.). Nach 4 h ist der LI von MB 247 weder von Canton S noch von *rut* signifikant unterschieden.

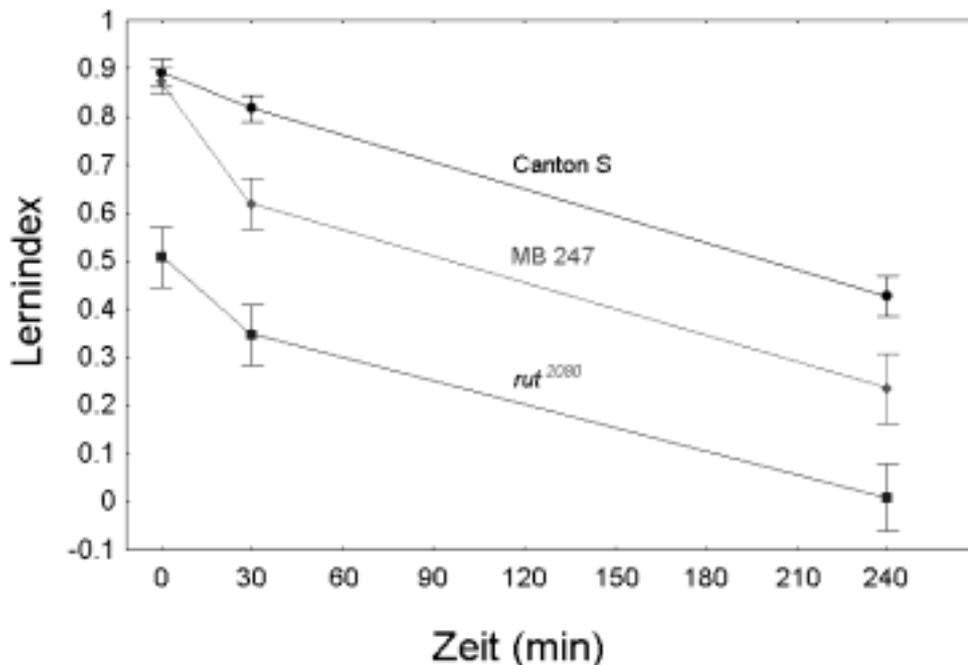


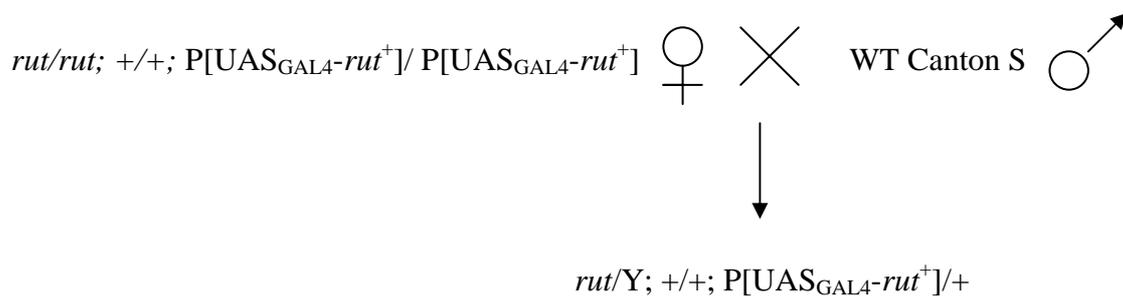
Abb. 17: Abfall des Lernwerts über die Zeit bei Wildtyp-Fliegen, *rut*-Mutante und der „rescue“ - Linie MB 247. Zum Zeitpunkt 0 (entspricht einem Kurzzeitgedächtnis von ca. 2 min) ist der Lernwert von MB 247 von dem wildtypischen nicht verschieden ($p > 0,05$). Nach 30 min ist der Lernwert von MB 247 signifikant vom Wildtyp und auch von *rut* verschieden ($p < 0,05$). Nach 4 h ist er weder signifikant von Canton S noch von *rut* verschieden ($p > 0,05$). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an.

3. 3. Kontrollexperimente

Zur Sicherung des Arguments, daß die Rettung des Lernvermögens tatsächlich auf der räumlich begrenzten Wiederherstellung der Adenylatzyklase beruht, wurden folgende Kontrollmessungen durchgeführt:

---Um auszuschließen, daß die *rut*-cDNA auch ohne Gal4-Treiber transkribiert wird, wurden männliche *rut*-Fliegen mit UAS-Konstrukt und ohne Gal4-Element gemessen. Deren Lernwert (3. Säule in Abb. 15) war von dem von Canton S signifikant verschieden ($p < 0,0005$) d. h. ohne Gal4-Element wird kein „rescue“ erreicht.

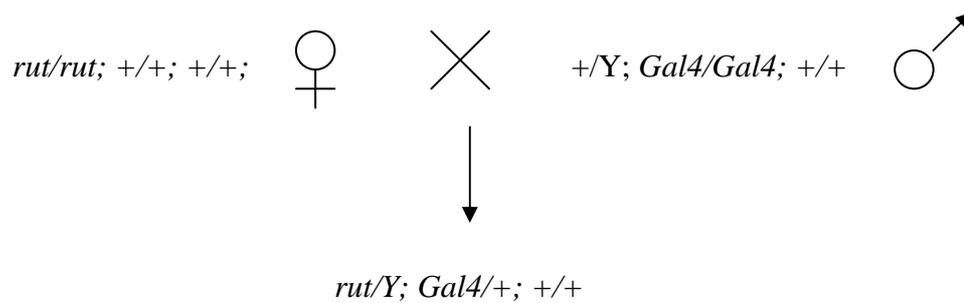
Kreuzungsschema (in der F1-Generation ist nur der relevante männliche Genotyp dargestellt):



---Um auszuschließen, daß die Gal4-Elemente selbst bei den „rescue“ - Fliegen einen dominant positiven Effekt auf das Lernen haben, wurden Fliegen getestet, die heterozygot für das entsprechende Gal4-Element und hemizygot für *rut2080* waren. Diese Fliegen erreichten Lernindices, die signifikant von Canton S verschieden waren

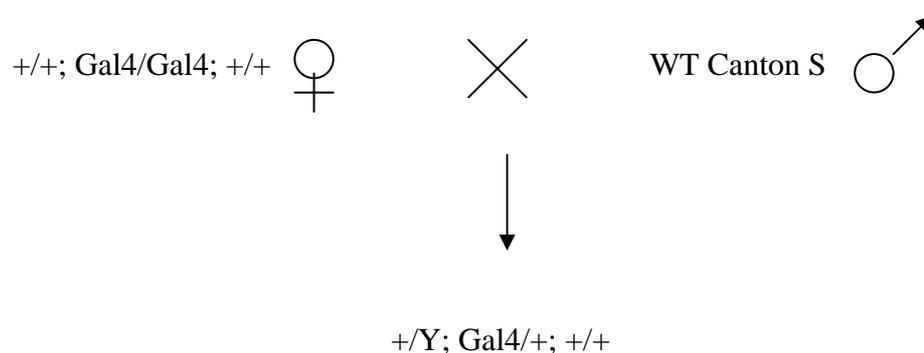
($p < 0,0005$). Das Gal4-Element hat also keinen dominant positiven Effekt auf das Lernen.

Kreuzungsschema (es ist nur der Fall mit dem Gal4-Element auf dem 2. Chromosom dargestellt; in F1 nur Männchen dargestellt):



---Um auszuschließen, daß die Gal4-Elemente bei den „nicht-rescue“ - Fliegen einen dominant negativen Effekt auf das Lernen ausüben, wurden Wildtypfliegen mit einer Kopie des entsprechenden Gal4-Elements gemessen. Es wurden weibliche Gal4-Fliegen und männliche Canton S-Fliegen miteinander gekreuzt, wobei das Geschlecht hier ohne Bedeutung für den Genotyp ist. Es wurden, wie in allen Experimenten, nur männliche Fliegen gezählt. Diese Fliegen waren vom Wildtyp nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$).

Kreuzungsschema (Gal4-Element nur auf dem 2. Chromosom dargestellt; in F1 nur Männchen dargestellt):



Eine Ausnahme bildete c522: Der LI war auf 0,73 erniedrigt (siehe 4.3.), weshalb diese Linie aus der weiteren Betrachtung ausgeschlossen wurde. Das bedeutet, das Gal4-

Element c522 hatte selbst einen Einfluß auf das Lernen, der unabhängig von der Expression der *rut*⁺-cDNA war. Der niedrige LI im Rettungsexperiment mit Gal4-Element und UAS-Konstrukt in einer Fliege kann also nicht alleine auf das spezifische räumliche Verteilungsmuster der *rut*⁺-cDNA unter c522 zurückgeführt werden, also darauf, daß die *rut*⁺-cDNA hauptsächlich außerhalb der Pilzkörper exprimiert wird, sondern ist zum Teil durch einen dominant negativen Einfluß des Gal4-Elements selbst bedingt.

Zwei umfassende Reihen wichtiger Kontrollexperimente untersuchten die Duft- und Elektroschockwahrnehmung der verschiedenen Linien (Tab. 2). Denn nur bei gleicher Wahrnehmung von CS und US sind die Lernindices Ausdruck unterschiedlicher oder gleicher *Lernleistung* und damit vergleichbar, also nicht durch schlechtere oder bessere Perzeption der Reize verursacht.

CS-Kontrolle: Veränderungen im Wahrnehmungsvermögen für die zwei verwendeten Düfte waren bei keiner der Linien festzustellen. Sämtliche Vermeidungsindices waren nicht signifikant von den wildtypischen verschieden ($p > 0,05$).

US-Kontrolle: Auch der unconditionierte Stimulus wird von allen Fliegenlinien gleich gut wahrgenommen ($p > 0,05$). Allerdings sind die Werte von 189y und 17d signifikant niedriger als der von *rut2080* ($p < 0,05$), aber nicht als der von Canton S, worauf es eigentlich ankommt. Die „rescue“ - Linie c772 hat einen ähnlich niedrigen Schockvermeidungsindex und lernt trotzdem gut, was ein Argument dafür ist, daß der niedrige Lernwert der „nicht-rescue“ - Linien 189y und 17d nicht durch die niedrige Schockvermeidung verursacht wird.

Tab. 2: US- und CS- Vermeidung				
Fliegen-Linie	Schockvermeidungs-Index	Geruchsvermeidungs-Index		
		BAL	MCH	Gesamt
Canton S	82,3±2,2	91,7±3,6	74,7±7,3	83,2±4,9
<i>rut</i>	86,0±2,4	97,0±1,4	76,9±2,6	86,9±2,0
247	78,6±4,8	87,5±5,5	78,5±11,3	83,0±6,7
c772	69,0±5,4	88,7±3,1	63,0±9,2	75,9±4,9
30y	80,0±5,7	98,8±1,2	93,4±3,0	96,1±1,8
238y	80,4±4,1	97,5±1,6	80,5±3,1	93,0±1,8
H24	87,6±3,0	97,6±2,4	80,5±3,1	89,6±5,8
201y	79,9±3,1	98,7±0,8	84,2±4,4	91,5±2,3
c232	81,7±3,0	92,8±4,5	73,1±7,7	82,9±4,5
189y	69,1±7,4	95,0±3,2	91,2±6,4	93,1±3,4
17d	67,7±4,4	98,8±0,8	77,0±4,1	87,9±2,1

Tabelle 2: Wildtyp Canton S-Fliegen, rut-Fliegen und rut-Fliegen mit gezielter Expression der rut⁺-cDNA wurden auf Vermeidung von Elektroschocks und den in den Lernexperimenten verwendeten Düften (BAL und MCH; die Werte sind sowohl getrennt für beide Gerüche als auch im Mittel aufgeführt) getestet. Dargestellt ist der endgültige Vermeidungsindex plus/minus dem Standardfehler des Mittelwerts.

4. Diskussion

Mit Hilfe der dargestellten genetischen Methoden und der durchgeführten Verhaltensexperimente wurde, in Zusammenschau mit den früheren Experimenten zur Ausschaltung der Pilzkörper, zum ersten Mal in der Geschichte der Gehirnforschung eine Gehirnstruktur als notwendig und hinreichend für eine Leistung erkannt. Das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis ist (mit den unter 4. 5. erwähnten Einschränkungen) in den Pilzkörpern der Fruchtfliege *Drosophila* lokalisiert.

4. 1. Diskussion der Ergebnisse der Lernexperimente und Expressionsmuster der Gal4-Linien

Bei einem ersten Überblick über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der „rescue“- und „nicht-rescue“-Linien fällt auf, daß alle „rescue“-Linien Expression im γ -Lobus haben, und alle „nicht-rescue“-Linien (bis auf 189y mit schwacher Expression im γ -Lobus) dort keine Expression haben. Weiterhin zeigen alle „rescue“-Linien bis auf H24 Expression im α - und β -Lobus. 201y („partial rescue“) hat Expression in allen 3 Loben-Systemen. Von den drei „nicht-rescue“-Linien hat c232 überhaupt keine Pilzkörperexpression, 17d und 189y exprimieren in α - und β -Lobus aber nicht im α' - und β' -Lobus.

Das besondere der Linie MB 247-36y ist, daß sie so gut wie ausschließlich im Pilzkörper Expression zeigt und den höchsten Lernwert aller „rescue“-Linien hat. Damit scheidet das mediane Bündel, das bei den von Connolly et al. (1996) verwendeten Gal4-Linien als zusätzliche „Schnittmengen“-Struktur neben den Pilzkörpern übrigblieb, als alternativer Ort des olfaktorischen Kurzzeitgedächtnisses aus.

Die Tatsache, daß die „rescue“-Linie H24, die nicht signifikant von Canton S unterschieden werden kann, keine Expression im α/β -System, aber Expression im γ -Lobus aufweist, und daß die „nicht-rescue“-Linien 17d und 189y im α - und β -Lobus

Expression haben, deutet auf die besondere Bedeutung des γ -Lobus hin. Die Ergebnisse lassen die Annahme zu, daß nur die γ -Loben der Sitz des 2-Minuten-Gedächtnisses sind. Selbst wenn in H24 die Rettung des 2-Minuten-Gedächtnisses unvollständig wäre, was nicht auszuschließen ist, ließe sich dies auf den Grad oder die Verteilung der Expression innerhalb des γ -Lobus bei H24 zurückführen.

Daß bei *ala*-Fliegen mit fehlenden vertikalen als auch fehlenden horizontalen (β/β' -) Loben kein Defekt des Kurzzeitgedächtnisses vorliegt, versuchen Pascual et al. durch funktionelle Redundanz zwischen den Loben oder, in Bezug auf das Ergebnis der hier vorgelegten Arbeit (Zars 2000a) durch die spezifische Bedeutung der γ -Loben für das Kurzzeitgedächtnis zu erklären (Pascual 2001). Obwohl viel dafür spricht, kann man aber nicht mit Sicherheit ausschließen, daß die γ -Loben nur zusammen mit dem α/β -System, wofür die Ergebnisse von McGuire et al. sprechen würden (McGuire 2001), 100% des wildtypischen Lernwertes restituieren. Wenn die γ -Loben tatsächlich ausreichen, könnte es natürlich sein, daß wiederum nur ein Bruchteil von diesen ca. 1000 Fasern auf jeder Seite des Gehirns für das Kurzzeitgedächtnis für MCH und BAL gebraucht wird. Diese interessante Frage bedarf der weiteren detaillierten Klärung.

Wie in der Einleitung dargestellt, wurde bisher die *Notwendigkeit* der Pilzkörper für Geruchslernen durch drei unabhängige Techniken, sie strukturell oder funktionell auszuschalten, gezeigt (Heisenberg 1985; De Belle 1994; Connolly 1996). Mutanten ohne oder mit stark verkleinerten Pilzkörpern (*mbm*, *mbd*), Ablation der Pilzkörper durch das Zellgift Hydroxyharnstoff und die Überexpression der konstitutiv aktiven α -Untereinheit des G-Proteins ($G_{\alpha s}$) mit Hilfe der Gal4-Technik in den Pilzkörpern führten alle gleichermaßen zu einer Ausschaltung des Lernens und Gedächtnisses von Gerüchen. Daß diese unabhängigen Methoden zu dem gleichen Ergebnis führen, schließt weitgehend aus, daß die mit jeder einzelnen Methode verbundenen möglichen Nebeneffekte das Resultat herbeiführen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ergänzen diese Befunde: Die Tatsache, daß die Zerstörung der Pilzkörper das Geruchslernen unmöglich macht, beweist nicht, daß das Gedächtnis auch dort lokalisiert ist. Es beweist nicht, daß die Pilzkörper

hinreichend für diese Leistung sind, nur, daß sie notwendig, also dafür unentbehrlich sind.

Der umgekehrte Ansatz, der, bei intakter Struktur, von einem Defekt auf molekularer Ebene ausgeht und den Defekt strukturell begrenzt wieder behebt, lokalisiert hingegen das „Engramm“ positiv zu dieser Struktur. Synaptische Plastizität allein im Pilzkörper ist hinreichend für das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis. Auf das Modell der *rut*-Adenylatzyklase angewandt bedeutet dies, daß das Gedächtnis auf dem Niveau einer einzigen synaptischen Verbindung zu suchen wäre, nämlich an der Verbindung zwischen der Präsynapse der Kenyon-Zelle und extrinsischem Ausgangsneuron im Lobus bzw. am Übergang zwischen Pedunkel und Lobus. Dort wird *rut* auch jeweils hauptsächlich exprimiert. Wenn man Synapsen zwischen den Kenyon-Zellen innerhalb des Pilzkörpers in Betracht zieht, würde das Gedächtnis auch an diesen Synapsen zu finden sein. Synaptische Plastizität in den Neuronen, die den CS weiterleiten, z. B. im Antennallobus, ist nicht nötig. Daß tatsächliche Transmitterausschüttung an diesen Synapsen beim *Lernen* entbehrlich ist (McGuire 2001; Dubnau 2001), widerspricht diesem Modell nicht, es geht nur um die Bereitschaft bzw. die Wahrscheinlichkeit der Ausschüttung in der Herausforderung der Testsituation.

Die sensiblen Neurone, die den US zum Pilzkörper leiten, sind bei *Drosophila* nicht bekannt. Die Vermutung liegt nahe, daß sie Verbindungen mit den präsynaptischen Endigungen der Kenyon-Zellen herstellen und dort, dem Modell entsprechend, Transmitter ausschütten, Rezeptoren aktivieren und über das G-Protein die AC stimulieren. Für dieses Modell sprechen auch die Ergebnisse der Arbeit von Waddell (Waddell 2000) bezüglich der DPM-Neurone (siehe S. 47 f.), die ja synaptische Verbindungen zu den Loben aufbauen (aber nicht den US weiterleiten, sonst wäre in den Experimenten mit der Hemmung der Transmitterausschüttung auch das Lernen gestört). Gene für Dopamin-Rezeptoren werden hauptsächlich in den Kenyon-Zellen exprimiert (Han 1996, Han 1998). Es könnten also dopaminerge Neurone den US an den Pilzkörper weiterleiten. Daß dopaminerge Neurone die Pilzkörperloben innervieren, ist bekannt (Nässel 1992). Ebenso, daß Mutationen der Dopa-Decarboxylase (*Ddc*) das Lernen beeinträchtigen (Livingstone 1983; Tempel 1984).

4. 2. Vergleich mit den Ergebnissen von J. Connolly et al. (1996) und T. Zars et al. (2000b)

J. Connolly hat für die Experimente mit der Überexpression des G-Proteins Gal4-Linien benutzt, von denen vier in den hier dargestellten Experimenten ebenfalls verwendet wurden. Dabei ist die quantitative Übereinstimmung bis ins Detail erstaunlich. Diejenigen Linien, die zu einer vollen Wiederherstellung des Lernindex führten, ergaben bei J. Connolly eine vollständige Zerstörung des Lernindex (c747, äquivalentes Expressionsmuster wie c772; und 238y, wobei der kleine quantitative Unterschied zwischen diesen beiden Linien, der aber nicht signifikant ist, wiederum seine Entsprechung bei J. Connolly hat), 201y, das zu einem mittleren Lernwert führte, zerstörte bei J. Connolly das Lernen auch nur zur Hälfte, und c232 (Zentralkomplex) beschädigte bei ihm das Lernen nicht, wie auch umgekehrt hier keine Verbesserung erreicht wurde. D. h. die unterschiedlichen Linien hatten, bedingt durch die spezifischen Expressionsmuster, in den unterschiedlichen Experimenten ähnliche Wirkungen auf das Lernen, nur in entgegengesetzter Richtung.

Dies ist um so bemerkenswerter, als der *rut*-abhängige Anteil des Kurzzeitgedächtnisses nur etwa 40% des Gesamtwertes beträgt, das konstitutiv aktive $G_{\alpha S}$ aber das Kurzzeitgedächtnis zu 100% blockiert. Nimmt man an, daß die Unterschiede in der Wirksamkeit der Gal4-Linien auf die Unterschiede ihrer Expressionsmuster zurückzuführen sind, kann man sich kaum der Schlußfolgerung widersetzen, daß die beiden Komponenten des Kurzzeitgedächtnisses co-lokalisiert sind, d. h. daß auch die *rut*-unabhängige Komponente in den γ -Loben liegt.

T. Zars hat ebenfalls einige der hier verwendeten Gal4-Linien benutzt, um die für das Lernen in einem anderen Paradigma, der „Hitzekammer“, hinreichende Gehirnstruktur zu finden. In diesem Paradigma werden einzelne Fliegen in eine dunkle Kammer, die gerade so hoch ist, daß eine Fliege darin laufen kann, gesetzt. Sie werden dort darauf trainiert, eine Seite zu vermeiden, indem das Betreten genau dieser Seite durch die Erhöhung der Temperatur in der gesamten Kammer bestraft wird. Wenn sich die Fliege auf der anderen Seite aufhält, wird die Temperatur wieder abgesenkt (Wustmann 1996;

Wustmann 1997). Nach mehrminütigem Training vermeiden die Fliegen auch ohne Bestrafung die vorher bestrafte Seite.

Die *rut*-Mutante hat auch in diesem Paradigama einen Lerndefekt, und durch Wiederherstellung der wildtypischen Adenylatzyklase konnten Lernen und Kurzzeitgedächtnis (nach 3 min) mit Hilfe einiger Gal4-Linien gerettet werden. Diesen waren die folgenden Gehirnareale gemeinsam: Teile des Antennallobus, das mediane Bündel und Teile des Ventralganglions.

Im einzelnen: *elav*, *c772* und *c522* retteten die Lernfähigkeit; außerdem die hier nicht verwendeten Linien *c115* und *c271*. *30y*, *238y*, *H24* und *201y* leisteten dies nicht. *189y* und *c232* konnten in der Hitzekammer (wie auch im olfaktorischen Lernparadigma) nicht retten. Das bedeutet, daß die Information des Kurzzeitgedächtnisses bei diesen verschiedenen Anforderungen an die Fliege, nämlich räumliches Lernen mit Hitze als US und Geruchslernen mit Elektroschocks als US, in unterschiedlichen Gehirnregionen repräsentiert ist. Daß die Pilzkörper nicht für das räumliche Lernen notwendig sind, war schon dadurch bewiesen worden, daß pilzkörperlose Fliegen in der Hitzekammer normal lernen (Wolf 1998).

Die Tatsache, daß Linien, die im einen Paradigma retten, im anderen nicht retten, weist darauf hin, daß über „rescue“ oder „nicht-rescue“ die spezifische räumliche Verteilung der Adenylatzyklase entscheidet und nicht z. B. die Gesamtmenge an AC im Gehirn (eine „Massenwirkung“ ähnlich der Lashley's) oder die Restexpression in den Geweben, die in der Immunocytochemie TAU-negativ sind.

4. 3. Diskussion der Ergebnisse von *c522* und *elav*

Wie schon erwähnt hatte bei ***c522*** das Gal4-Element einen dominant negativen Effekt auf das Lernen, weshalb diese Linie in die Gesamtbewertung nicht mit eingegangen ist. Dieses Ergebnis soll hier dennoch kurz erwähnt werden, da die Erniedrigung des Canton S-LI durch eine Kopie des Gal4-Elements auf 0.73 nicht völlig ausreicht, um

den niedrigen Lernwert (0.52) im Rettungsexperiment zu erklären. Auch könnten andere Ursachen, wie eine Erkrankung genau dieser Fliegen zur Zeit des Kontrollexperiments eine Rolle gespielt haben. Das Expressionsmuster von c522 würde die bisher gezogenen Schlußfolgerungen unterstützen. Expression ist hauptsächlich außerhalb der Pilzkörper zu finden: Im Antennallobus, im medianen Bündel, in den Ringneuronen des Ellipsoidkörpers, im Antennalnerv und innerhalb der Pilzkörper im α'/β' - System. Die Vermeidungsindices für Elektroschocks und Gerüche von c522 waren wildtypisch.

elav hatte einen LI von 0.68, was dem von 201y („partial rescue“) entspricht. Jedoch würde man erwarten, daß diese panneuronal exprimierende Linie zu einer *vollen* Rettung in der Lage ist, da sie ja auch die Pilzkörper umfaßt. Es sind mehrere Gründe denkbar, warum elav nur partiell das Lernen rettet:

-Die Bereitstellung der Adenylatzyklase Typ I in bestimmten Regionen außerhalb der Pilzkörper wirkt sich negativ auf das Gedächtnis aus.

-Das Expressionsniveau in den Pilzkörpern reicht nicht aus, um wie in den „rescue“-Linien das Lernen wieder herzustellen (so, wie es bei MB 247 nicht ausreichte, um das 30-min- und 4-h-Gedächtnis wieder herzustellen; siehe unten).

-elav hat durch die P-Element-Insertion im Genom der Fliege einen dominant negativen Effekt auf das Lernen (wurde nicht getestet).

Im Hitzelernparadigma (siehe oben) hingegen konnte das Lernen durch elav vollständig wiederhergestellt werden (Zars 2000b).

4. 4. 30 min - und 4 h - Gedächtnis

In nach Abschluß dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zum längerzeitigen Gedächtnis konnte gezeigt werden, daß MB 247-Fliegen mit jeweils zwei Kopien des Gal4-Elements und des UAS-Konstrukts mit der *rut*⁺-cDNA einen wildtypischen Gedächtniswert auch noch nach 30 min und 3 h haben (Schwaerzel 2002). Dazu waren beide Elemente auf *ein* Chromosom (3.) rekombiniert worden, so daß für dieses

Chromosom homozygote Fliegen eine größere Menge an AC I im Pilzkörper hatten als die vom Autor dieser Arbeit getesteten MB 247 Fliegen, die, wie die anderen Linien auch, nur heterozygot für die beiden Elemente waren. Die Menge an *rut*-Adenylatzyklase im Pilzkörper war offensichtlich nicht ausreichend für eine suffiziente Rettung gewesen. Bei Schwaerzel et al. war nach 3 min der *rut*-unabhängige Lernwert nur 30% des Canton S - Wertes, bei Experimenten dieser Arbeit waren es 60% (bei insgesamt höheren absoluten Werten). Möglicherweise ist die etwas veränderte Version der Verhaltensapparatur und die Verwendung von 3-Octanol statt Methylcyclohexanol als Duft dafür verantwortlich. Nach 3 h lag der *rut*-Lernwert, wie aus der Literatur bekannt, fast bei null, und damit auch der *rut*-unabhängige Anteil bei fast 0%. Deswegen ist der wildtypische LI der „rescue“ - Fliegen von ca. 0.4 nach 3 h (bei initialem Lernwert von ca. 0.6) ein besonders schlagendes Argument dafür, daß der Pilzkörper der Ort des olfaktorischen Gedächtnisses ist, und daß das Gedächtnis auch nach 3 h noch im Pilzkörper gespeichert wird.

Die Tatsache, daß nach 3 h noch Transmitterausschüttung von den Kenyon-Zellen auf die Pilzkörperausgangsneurone eine Voraussetzung für die Präsentation des gelernten Verhaltens ist, zeigt, daß das Gedächtnis auch dann noch dort zu finden ist. Die Tatsache, daß auf Transmitterausschüttung in der Zeit zwischen Lernen und Test verzichtet werden kann, zeigt zudem, daß das Gedächtnis den Pilzkörper nicht verlassen muß, um nach 3 h noch vorhanden zu sein. Diese schon seit Arbeiten aus dem Jahre 2001 (McGuire 2001; Dubnau 2001) bekannten Befunde wurden in der Arbeit von Schwaerzel et al. (2002) mit *shi*^{ts1}-Expression unter der Gal4-Linie *c772* bestätigt.

Es scheinen also für verschiedene *Lernleistungen*, wie Lernen im Flugsimulator, was bei gleichbleibendem Kontext ohne Pilzkörper bewerkstelligt werden kann (Liu 1999), für räumliches und olfaktorisches Lernen unterschiedliche Gehirnregionen herangezogen zu werden, aber nicht für verschiedene *Gedächtnisphasen*, wie wir es vom Säugergehirn kennen.

4. 5. Aussagekraft und Gültigkeit der Ergebnisse im Gesamt-Kontext

Hier sollen auch einige Einschränkungen erörtert werden, die die Allgemeingültigkeit der gezogenen Schlußfolgerungen relativieren.

Erstens wurde hier, wie schon mehrfach erwähnt, nur das *rut*-abhängige Gedächtnis untersucht. Die *rut*-Fliegen haben, im Gegensatz zu den pilzkörperlosen Fliegen, immer noch etwa 60% des Wildtyp-Kurzzeitgedächtnisses. Es ist nicht bekannt, ob dieses verbleibende Gedächtnis dadurch bedingt ist, daß die Mutante keine Nullmutante ist, also noch eine Restfunktion des Gens partiell Lernen ermöglicht, oder ob *rut*-unabhängige synaptische Plastizität für die 60% verantwortlich gemacht werden kann.

Zweitens ist das tatsächliche räumliche Verteilungsmuster der *rut*⁺-cDNA nicht direkt beobachtet worden, sondern nur aus der Verteilung des P(UAS_{GAL4}-TAU)-Reporters geschlossen worden. Da noch kein Antikörper gegen das *rut*-Protein verfügbar war, war die direkte Sichtbarmachung nicht möglich.

Drittens könnte zwar die Tatsache, daß selbst ein so massiver Eingriff in das AC/cAMP-System wie die G_{αs}-Expression (Connolly 1996) während der gesamten Entwicklung, wodurch ja das Lernen zu 100% zerstört wird, keine Letalität oder andere Verhaltensdefekte hervorruft, darauf hinweisen, daß die AC I oder andere durch G_{αs} beeinflusste ACs keine größere Rolle während der Entwicklung spielen, es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die Rettung im adulten Tier eine Folge des Vorhandenseins des Enzyms in der Larve ist. Gerade der γ -Lobus ist dasjenige System in den Pilzkörpern, das am frühesten in der Entwicklung angelegt wird. Die *rut*-AC könnte für synaptische Plastizität verantwortlich sein, die für die korrekte Vernetzung der Neurone in der Entwicklung sorgt. Sie ist ja auch für erfahrungsbedingte strukturelle Plastizität verantwortlich (siehe S. 50). Andererseits haben zeitlich kontrollierte „rescue“-Experimente bei *dnc*-Fliegen (siehe S. 44) den Lerndefekt entwicklungsunabhängig behoben (Dauwalder 1995). Da *dnc* den selben Signalweg betrifft wie *rut*, könnte das dafür sprechen, daß auch bei *rut* die Rettung des Lernens nicht durch Wirkungen während der Entwicklung bedingt ist.

Viertens wurde hier nur ein einziges Paar von Duftstoffen untersucht. Es könnte sein, daß der γ -Lobus nur für diese speziellen Gerüche der Ort des Kurzzeitgedächtnisses ist.

5. Resümee, Ausblick und Erörterung der Übertragbarkeit auf menschliches Gedächtnis

Mit dem erfolgreichen pilzkörperspezifischen „rescue“ des olfaktorischen Gedächtnisses schließt sich der Kreis, dessen erster Halbkreis durch die Pilzkörper-Ablationsexperimente eröffnet worden war. Die Pilzkörper sind notwendig *und* hinreichend für olfaktorisches Lernen.

Es ist keineswegs selbstverständlich, daß bei einem so einfachen Organismus wie einer Fliege mit nur etwa 200 000 Neuronen im Gehirn Erinnerungen bezüglich einzelner Verhaltensleistungen (z. B. Geruchs- und Hitzelernen) in separaten Gehirnregionen vertreten sind. Man könnte auch erwarten, daß das Zusammenspiel aller oder vieler Bereiche nötig wäre.

Die Tatsache, daß für verschiedene Lernparadigmen verschiedene Hirnregionen die Speicherung übernehmen, scheint zu zeigen, daß es für das Kurzzeitgedächtnis keinen allgemeinen Gedächtnisort überhaupt gibt. Möglicherweise werden, wie es etwa für das sogenannte nicht-deklarative Gedächtnis gefordert wird, die Gehirnregionen, die an der Verarbeitung der Reize und Informationen selbst schon beteiligt sind, auch für deren Kurzzeit-, eventuell auch Langzeitspeicherung, benutzt. Die Entwicklung neuer Lernparadigmen wird die Möglichkeit schaffen, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Gedächtnisses bei verschiedenen Formen des Lernens zu ergründen.

Die Anwendung der Hitzeschock-Flippase Technik wird die zeitliche Kontrolle der Expression der *rut*⁺-cDNA ermöglichen, um Entwicklungsdefekte auszuschließen. Dies ist bei *dnc* schon geschehen (Dauwalder 1995). Bei dieser Technik kann man durch eine Temperaturerhöhung bewirken, daß eine DNA-Region, die von zwei FRT-Regionen

flankiert ist und z. B. den UAS-Promotor von dem *rut*⁺-Gen trennt, herausgeschnitten und damit die Transkription des Gens ermöglicht wird (Golic 1989).

Zur Beurteilung der Frage des Expressionsniveaus von *rut*⁺ wird die Herstellung und Verwendung eines für die *rut*-AC spezifischen Antikörpers aufschlußreich sein. Die Generierung einer Nullmutante für *rut* wird die Frage der verbleibenden 60% beim LI weiter klären. Die Messung weiterer Gal4-Linien mit höherer Menge an *rut*-Protein (wie schon mit MB 247 geschehen) würde zeigen, ob auch für längerzeitiges Gedächtnis die γ -Loben eine vordringliche Bedeutung haben, oder ob, wie die *ala*-Fliegen vermuten ließen, eine Verlagerung innerhalb der Pilzkörper im Laufe der Konsolidierung bis hin zur Ausbildung von LTM stattfindet.

Die Ähnlichkeiten, die zwischen Invertebraten und Säugetieren, einschließlich des Menschen, gerade auf molekularer Ebene mehr und mehr erkannt werden, geben Grund zur Hoffnung, die bei *Drosophila* gewonnenen Erkenntnisse auch zum Verständnis der menschlichen Gedächtnisprozesse verwenden zu können. Die Evolution scheint ja mit der Adenylatzyklase und dem cAMP auf ganz elementare und damit weit verbreitete molekulare Vorgänge der Signaltransduktion, die sogar schon in Bakterien vorkommen, zurückgegriffen zu haben, um eine ganz neue Leistung, nämlich die von Lernen und Gedächtnis zu schaffen.

Zur Erforschung des Gedächtnisses erwies sich gerade *Drosophila melanogaster* als ideales Versuchsobjekt wegen der neuen Möglichkeiten der gewebespezifischen Expression von Transgenen, der Eignung für Verhaltensexperimente sowie dem niedrigen Komplexitätsgrad des Gehirns, der aber doch so hoch ist, daß Lernen und Gedächtnis in einem Maße, wie wir es von höheren Organismen her kennen, vorhanden sind. Es besteht also ein Zugang sowohl auf molekularer Ebene, auf der Verhaltensebene als auch auf der strukturellen Ebene.

Eine Brücke zum Menschen findet sich auf der *molekularen Ebene* z. B. schon hinsichtlich der Bedeutung der Proteinkinase M für LTP und der Adenylatzyklase für LTP und Lernen bei Fliegen *und* Mäusen (siehe 1.4.6. und 1.5.4.1.). Die letzten

gemeinsame Vorfahren der Mäuse mit dem Menschen liegen ca. 60 mio Jahre zurück. Dagegen trennen den Menschen von der Fliege ca. 500 mio Jahre (Campbell 2002). Die Ansicht, LTP sei eine Grundlage von Gedächtnis bei Vertebraten, ist jedoch selbst bei Mäusen umstritten. Beim Menschen gibt es hierüber keine Erkenntnisse. Auf der *strukturellen Ebene* ist der Vergleich Mensch - Fliege noch schwieriger. Bei so ungeheuer unterschiedlichen Gehirnen, sowohl hinsichtlich Größe als auch Aufbau, und vom derzeitigen Stand des Wissens aus läßt sich die beliebte Homologisierung von murinem oder menschlichem Hippocampus und Pilzkörper schwer vertreten. Hier ist zunächst noch viel Detailarbeit auf den einzelnen Gebieten notwendig. Rein äußerlich sprächen im Moment für die Homologisierung: Die Bedeutung für das Gedächtnis, die enge Verbindung zum olfaktorischen System, die starke Expression lern-relevanter Gene in beiden Systemen, das phylogenetisch hohe „Alter“ der Hippocampusformation im Vergleich zu anderen Hirnteilen. Andererseits hat der Pilzkörper womöglich eine grundlegendere Funktion in der *Entscheidungsfähigkeit* (siehe 1.5.3.), die beim Menschen eher nicht im Hippocampus liegt. Die Verbindung zum olfaktorischen System ist bei den Pilzkörpern in der Evolution erst später hinzugekommen, was man aus der unterschiedlichen Größe der Calyces bei verschiedenen Insekten folgern kann (Heisenberg 2003; Strausfeld 1998).

Bezüglich des Gedächtnisses bestehen, die Zulässigkeit des Vergleichs vorausgesetzt, folgende Unterschiede: Wie in der Diskussion erläutert, gibt es einige Hinweise, daß das Gedächtnis den Pilzkörper im Laufe der Zeit nicht verläßt. Im Gegensatz dazu wird der Hippocampus für eine *Zwischenstation* auf dem Weg der Gedächtniskonsolidierung gehalten. Verletzungen kortikaler Assoziationsareale deuten darauf hin, daß die Langzeitspeicherung in diesen Arealen erfolgt, die auch für die ursprüngliche Verarbeitung der Information vor Weitergabe an den Hippocampus verantwortlich waren (Kandel 2000, S. 1233). Hinzu kommt, daß der Hippocampus nur für das „deklarative“, nicht für das „nicht-deklarative“ Gedächtnis (*Verhaltensebene*) verantwortlich sein soll (Squire 1999), und eine solche Unterscheidung kann bei *Drosophila* noch nicht sinnvoll gemacht werden. Wenn man davon ausgeht, daß sich das explizite Gedächtnis im Laufe der Evolution erst spät ausgebildet hat, könnte man aber ein bei *Drosophila* schon vorhandenes, von unserem Standpunkt aus jetzt als

„*implizit*“ bezeichnetes, Gedächtnissystem postulieren, das seine Bedeutung neben dem expliziten Gedächtnis bei höheren Organismen nicht eingebüßt hat.

Beim impliziten Gedächtnis bestünden damit größere Ähnlichkeiten als beim Hippocampus-abhängigen. Beim hippocampektomierten Patienten „H. M.“ ließ sich mit gezielten Lerntests ein im Gegensatz zum expliziten Gedächtnis noch erhaltenes implizites/prozedurales Gedächtnis, also der Erwerb bestimmter Fähigkeiten durch Übung, nachweisen (siehe 1.2.2.). Es wäre aufgrund der Gemeinsamkeiten in der genetischen Ausstattung zu erwarten, daß dieses Gedächtnis auch ähnliche molekulare Grundlagen hat wie das in dieser Arbeit untersuchte Gedächtnis. Es wäre von den Prinzipien der Evolution her aber auch zu erwarten, daß die molekularen Mechanismen „höherer“ Gedächtnisformen nicht völlig andere sind, sondern auf schon vorhandenen aufbauen.

Die deutlichste Neuerung, die damit auch das größte Hindernis eines direkten Vergleichs Fliege - Mensch darstellt, war wohl die „Erfindung“ *sprachbezogenen* Bewußtseins und Gedächtnisses, was außer beim Menschen nur noch bei hochentwickelten Säugetieren ansatzweise vorhanden sein mag.

6. Formale Zusammenfassung

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis von *Drosophila melanogaster* in den Pilzkörpern lokalisiert ist.

Zu Beginn dieser Doktorarbeit war bekannt, daß die Pilzkörper *notwendig* für das Geruchsgedächtnis sind. Drei unabhängige Methoden der Ablation bzw. Veränderung der biochemischen Eigenschaften der Pilzkörper hatten zu dem selben Ergebnis geführt, daß funktionierende Pilzkörper unentbehrlich für den Aufbau eines Geruchsgedächtnisses sind. Noch informativer als ein Experiment, in dem durch Zerstörung einer Struktur eine Leistung unmöglich gemacht wird ist der umgekehrte Weg, der durch einen gewebespezifischen „rescue“ die Leistung wiederherstellt. Dazu wurde in dieser Arbeit das wildtypische Allel des Gens *rutabaga* in *rut*-mutanten Fliegen mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems ausschließlich in den Pilzkörpern, bzw., im Gegenexperiment, nur außerhalb der Pilzkörper zur Expression gebracht. *rut* kodiert für die Adenylatcyclase I, die mit synaptischer Plastizität bei *Drosophila*, *Aplysia* und Mäusen in Verbindung gebracht wird. Man geht davon aus, daß synaptische Plastizität die molekulare Grundlage für Lernen und Gedächtnis ist. Die AC I stellt cAMP her, dessen Menge und präzise Regulation die Übertragungsstärke an Neuronen beeinflusst. Eine Störung dieses Signalweges z. B. durch die *rut*-Mutation führt zu einer Beeinträchtigung des Gedächtnisses bei *Drosophila*.

rut wurde mit Hilfe des in *Drosophila* etablierten Gal4/UAS-Systems exprimiert: Der gewebespezifisch aktive Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 führt dazu, daß das hinter einen Gal4-spezifischen UAS-Promotor klonierte wildtypische *rut*-Gen in denjenigen Zellen transkribiert wird, in denen der Transkriptionsfaktor vorhanden ist. Dies wurde in einer *rut*-Mutante durchgeführt, so daß in allen anderen Zellen keine funktionierende AC I vorhanden war. Die *rut*-abhängige synaptische Plastizität wurde damit ausschließlich auf die gewünschten Regionen beschränkt. Das Expressionsmuster der Gal4-Linien wurde durch Immuncytochemie (Anti-Tau) sichtbar gemacht.

Diese Fliegen wurden in einem klassischen Konditionierungsexperiment auf ihr Geruchs-Gedächtnis untersucht. Dazu wurden einer Gruppe von Fliegen nacheinander 2 Gerüche präsentiert, von denen einer mit Elektroschocks gepaart war. Nach ca. 2 min konnten diese Fliegen sich für einen der beiden Gerüche entscheiden, die nun gleichzeitig aus 2 unterschiedlichen Richtungen dargeboten wurden. Je nach Lernleistung entschieden sich mehr oder weniger Fliegen für den vorher unbestraften Geruch.

Es ergab sich, daß der Ort im Gehirn, an dem die wildtypische AC I exprimiert wurde, über die Höhe des Gedächtniswertes entschied: Die AC I ausschließlich in den Pilzkörpern gewährte ein völlig normales Gedächtnis, wogegen die AC I außerhalb der Pilzkörper das Gedächtnis nicht gegenüber der *rut*-Mutante verbessern konnte. Die Analyse der Expressionsverteilung von insgesamt 9 getesteten Fliegenlinien mißt überdies dem γ -Lobus des Pilzkörpers eine besondere Bedeutung bei und läßt den Schluß zu, daß das hier untersuchte Gedächtnis ausschließlich in den γ -Loben lokalisiert ist.

Dieses erfolgreiche *rut*-„rescue“- Experiment zeigt, daß *rut*-abhängige synaptische Plastizität ausschließlich in den Pilzkörpern ausreichend für ein wildtypisches Gedächtnis ist. Dieses Ergebnis vervollständigt die Erkenntnisse von den Pilzkörper-Ablationsexperimenten insofern, als nun die Aussage zutrifft, daß die Pilzkörper notwendig *und hinreichend* für das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis sind.

7. Literaturverzeichnis

Aceves-Pina E., Quinn W., 1979. Learning in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *Science* 206: 93-96.

Aceves-Pina E., Booker T., Duerr J., Livingstone M., Quinn W., Smith R., Sziber P., Temper B., Tully T., 1983. Learning and memory in *Drosophila*, studies with mutants. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48: 831-839.

Adams R. D., Victor M., Ropper A., 2001. *Principles of Neurology*. McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

Alberini C., Ghirardi M., Metz R., Kandel E., 1994. C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 76: 1099-1114.

Bacsikai B., Hochner B., Mahaut-Smith M., Adams S., Kaang B., Kandel E., Tsien R., 1993. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 260: 222-226.

Baddeley A. D., Hitch G. J., 1974. Working memory. In: *The psychology of learning and motivation: Advances in research and theory*, Vol. 8, edited by G. A. Bower. New York: Academic Press, 47-90.

Bailey C. H., Chen M. C., 1983. Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science* 220: 91-93.

Bao J., Kandel E., Hawkins R., 1998. Involvement of presynaptic and postsynaptic mechanisms in a cellular analog of classical conditioning at *Aplysia* sensory-motor neuron synapses in isolated cell culture. *The Journal of Neuroscience* 18: 458-466.

Barth M., Heisenberg M., 1997. Vision affects mushroom bodies and central complex in *Drosophila melanogaster*. *Learning & Memory* 4: 219-229.

Bartsch D., Ghirardi M., Skehel P. A., Karl K. A., Herder S. P., Chen M., Bailey C. H., Kandel E. R., 1995. *Aplysia* CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell* 83: 979-992.

Bartsch D., Casadio A., Karl K. A., Serodio P., Kandel E. R., 1998. CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* 95: 211-223.

Blitzer R., Wong T., Nouranifar R., Iyengar R., Landau E., 1995. Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in CA1 region. *Neuron* 15: 1403-1414.

Bourne H. R., Nicoll R. 1993. Molecular machines integrate coincident synaptic signals. *Cell* 72/Neuron 10 (Suppl.), 65-75.

Bourtchuladze R., Frenguelli B., Blendy J., Cioffi D., Schutz G., Silva A. J., 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79: 59-68.

- Boynton S., Tully T. 1992. Latheo, a new gene involved in associative learning and memory in *Drosophila melanogaster*, identified from P element mutagenesis. *Genetics* 131: 655-672.
- Brand A. H., Perrimon N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
- Cameron H., McKay R., 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature Neuroscience* 2: 894-897.
- Campbell N. A., Reece J. B., 2002. *Biology*. World Student Series, Pearson education, Inc., San Francisco
- Carew T. J., Pinsky H. M., Kandel E. R., 1972. Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 175: 451-454.
- Castellucci V. F., Carew T. J., Kandel E. R., 1978. Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Science* 202: 1306-1308.
- Cheng Y., Endo K., Wu Kwok., Rodan A., Heberlein U., Davis R., 2001. *Drosophila fasciiclinII* is required for the formation of odor memories and for normal sensitivity to alcohol. *Cell* 105: 757-768.
- Coleman S. R., Gormezano I., 1971. Classical conditioning of the rabbit's (*Oryctolagus cuniculus*) nictitating membrane response under symmetrical CS-US interval shifts. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 77: 447-455.
- Connolly J. B., Roberts I. J. H., Armstrong J. D., Kaiser K., Forte M., Tully T., O'Kane C. J., 1996. Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science* 274: 2104-2107.
- Crittenden F. R., Skoulakis E. M. C., Han K., Kalderon D., Davis R. L., 1998. Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learning & Memory* 5: 38-51.
- Dash P., Hochner B., Kandel E., 1990. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345: 718-721.
- Dauwalder B., Davis R. L., 1995. Conditional rescue of the dunce learning/memory and female fertility defects with *Drosophila* or rat transgenes. *J. Neuroscience* 15: 3490-3499.
- Davis R. 1996. Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. *American Physiological Society. Physiological Reviews*. 76: No. 2.
- De Belle J. S., Heisenberg M., 1994. Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263: 692-695.
- DeZazzo J., Tully T., 1995. Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci.* 18: 212-218.
- DeZazzo J., Sandstrom D., De Belle S., Velinzon K., Smith P. et al. 2000. nalyot, a mutation of the *Drosophila* myb-related Adf1 transcription factor, disrupts synapse formation and olfactory memory. *Neuron* 27: 145-158.

- Drain P., Folkers E., Quinn W. G., 1991. cAmp-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron* 6: 71-82.
- Drier E., Tello M., Cowan M., Wu P., Blace N., Sachtor T., Yin J., 2002. Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nature Neuroscience* 5: 316-324.
- 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., Zvi S., 1984. Adenylate cyclase in the *Drosophila* memory mutant *rutabaga* displays an altered Ca²⁺ sensitivity. *Neuroscience Letters* 47: 119-124.
- Dudai Y., Corfas G., Hazvi S. 1988. What is the possible contribution of Ca²⁺-stimulated adenylate cyclase to acquisition, consolidation and retention of an associative olfactory memory in *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. A* 162: 101-109.
- Duerr J. S., Quinn W. G., 1982. Three *Drosophila* mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3646-3650.
- Dujardin F. 1850. Memoire sur le systeme nerveux des insectes. *Ann. Sci. Nat. Zool.* 14: 195-206.
- Dura J.-M., Preat T., Tully T., 1993. Identification of linotte, a new gene affecting learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* 9: 1-14.
- Ebbinghaus H., 1885. Über das Gedächtnis. In H. A. Ruger and C. E. Bussenius, trans. (New York:Dover).
- Eichenbaum H., 2002. *The cognitive neuroscience of memory*. Oxford University Press.
- Erber J., Masuhr T., Menzel R., 1980. Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifica*. *Physiol. Entomol.* 5: 343-358.
- Eriksson P., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A., Norborg C., Peterson D. et al, 1998. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature Medicine* 4: 1313-1317.
- Flexner L. B., Loss of memory in mice as related to regional inhibition of cerebral protein synthesis. *Tex. Rep. Biol. Med.* (United States), Spring 1966, 24: 3-19
- Folkers E., 1982. Visual learning and memory of *Drosophila melanogaster* wild-type CS and the mutants *dunce*, *amnesiac*, *turnip* and *rutabaga*. *J. Insect Physiol.* 28: 535-539.
- Folkers E., Drain P. F., Quinn W. G., 1993. *radish*, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8123-8127.
- Frost W. N., Castellucci V. F. Hawkins R. D., Kandel E. R., 1985. Monosynaptic connections from the sensory neurons of the gill-and siphon-withdrawal reflex in *Aplysia* participate in the storage of long-term memory for sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8266-8269.

- Gailey D. A., Jackson F. R., Siegel R. W., 1984. Conditioning mutations in *Drosophila melanogaster* affect an experience-dependent behavioral modification in courting males. *Genetics* 106: 613-623.
- Golic K. G., Lindquist S., 1989. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59: 499-509.
- Griffith L. C., Verselis L. M., Aitken K. M., Charalambos P. K., Danho W., Greenspan R. J., 1993. Inhibition of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase in *Drosophila* disrupts behavioral plasticity. *Neuron* 10: 501-509.
- Grotewiel M., Beck C., Wu K., Zhu X., Davis R., 1998. Integrin-mediated short-term memory in *Drosophila*. *Nature*; 391: 455-460
- Guo A., Liu L., Xia S. Z., Feng C. H., Wolf R., Heisenberg M., 1996. Conditioned visual flight orientation in *Drosophila*; dependence on age, practice and diet. *Learning & Memory* 3: 49-59.
- Guo H., Tong J., Hannan F., Luo L., Zhong Y., 2000. A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. *Nature* 403: 895-898.
- Han P.-L., Levin L. R., Reed R. R., Davis R. L., 1992. Preferential expression of the *Drosophila rutabaga* gene in mushroom bodies, neural centers for learning in insects. *Neuron* 9: 619-627.
- Han K., Millar N. S., Grotewiel Michael S., Davis Ronald L., 1996. DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* 16: 1127-1135.
- Hawkins R., Abrams T., Carew T., Kandel E., 1983. A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation. *Science* 219: 400-405.
- Hebb D. O., 1949. *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. New York: Wiley.
- Hegde A. N., Inokuchi K., Pei W., Casadio A., Ghirardi M., Chain D. G., Martin K. C., Kandel E. R., Schwartz J. H., 1997. Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 89: 115-126.
- Heisenberg M., Boehl K., 1979. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila melanogaster* by histological means. *Z. Naturforsch. C* 34: 143-147.
- Heisenberg M., Wolf R., 1984. *Vision in Drosophila*. Vol. XII, of *Studies of Brain Function*, ed. V. Braitenberg. Berlin: Springer.
- Heisenberg M., Borst A., Wagner S., Byers D., 1985. *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *Journal of Neurogenetics* 2: 1-30.
- Heisenberg M., 1989. Genetic approach to learning and memory (mnemogenetics) in *Drosophila melanogaster*. *Progress in Zoology*, Vol. 37. Rahmann (Ed.): *Fundamentals of Memory Formation: Neuronal Plasticity and Brain Function*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Heisenberg M., 1990. Über Universalien der Wahrnehmung und ihre genetischen Grundlagen, in: H. v. Ditfurth und E. P. Fischer (Hrsg.), *Mannheimer Forum 89/90*, München 1990.

Heisenberg M., 1992. Gedanken zu einer biologischen Theorie der Wahrnehmung. Forum für interdisziplinäre Forschung 1/1992. S. 41-48.

Heisenberg M., 1994. Central brain function in insects: Genetic studies on the mushroom bodies and central complex in *Drosophila*. Progress in Zoology, Vol 39. Schildberger, K. and Elsner (Ed.): Neural basis of Behavioural Adaptations. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Heisenberg M. 1994b. Voluntariness (Willkürfähigkeit) and the general organization of behavior. Flexibility and Constraint in Behavioral Systems, Greenspan and Kyriacou; 1994, John Wiley & Sons Ltd.

Heisenberg M., Heusipp M., Wanke T., 1995. Structural plasticity in the *Drosophila* brain. J. Neurosci. 15: 1951-1960.

Heisenberg M., 1998. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. Learning & Memory 5: 1-10

Heisenberg M., 2003. Mushroom body memoir. From maps to models. Nat. Rev. Neurosci. 4: 266-275.

Hintzman D. L., 1974. Theoretical implications of the spacing effect. In Theories in Cognitive Psychology: The Loyola Symposium R. L. Solso, ed. (Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Assoc.) pp. 77-99.

Holst E., Mittelstaedt H., 1950. Das Reafferenzprinzip. Naturwissenschaften 37: 464-476.

Ito K., Sass H., Urban J., Hofbauer A., Schneuwly S., 1997. GAL4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy and development of the *Drosophila* central nervous system. Cell Tissue Res. 290:1-10.

Ito K., Suzuki K., Estes P., Ramaswami M., Yamamoto D., Strausfeld N. J., 1998. The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster*. Learning and Memory 5: 52-77.

James W., 1890. Principles of psychology. New York, Holt.

Jonescu C. N. 1909. Vergleichende Untersuchungen über das Gehirn der Honigbiene. Z. Naturwiss. 45: 111-180.

Kamb A., Tseng-Crank J., Tanouye M. A., 1988. Multiple products of the *Drosophila* shaker gene contribute to potassium channel diversity. Neuron 1: 421-430.

Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessel T. M., 1996. Neurowissenschaften-Eine Einführung. Spektrum-Verlag; Heidelberg .

Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M., 2000. Principles of neural science. McGraw-Hill Companies, Inc.

Kunze K. (Hrsg.) 1999. Praxis der Neurologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York.

Kempermann G., Kuhn H., Gage F., 1998. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. Journal of Neuroscience 18: 3206-3212.

- Lashley K. S., 1929. Brain mechanisms and intelligence. Chicago, 1929, ix + 186.
- Lashley K. S., Wiley L. E., 1933. Studies, etc. IX. Mass action in relation to the number of elements in the problem to be learned. *Journal of Comparative Neurology* 57: 3-55.
- Lashley K. S., 1950. In search of the engram. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 4: 454-481.
- Levin L.R., Han P.-L., Hwang P. M., Feinstein P. G., Davis R. L., Reed R. R., 1992. The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* 68: 479-489.
- Ling, D.S.F. et al., 2002. Protein kinase M ζ is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nature Neuroscience* 5: 295-296.
- Liu L., Wolf R., Ernst R., Heisenberg M., 1999. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* 400: 753-756.
- Livingstone M. S., Tempel B. L., 1983. Genetic dissection of monoamine transmitter synthesis in *Drosophila*. *Nature* 303: 67-70.
- Livingstone M. S., Sziber P. P., Quinn W. G., 1984. Loss of Calcium/Calmodulin responsiveness in adenylyl cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* 37: 205-215.
- Livingstone M. S., 1985. Genetic dissection of *Drosophila* adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5992-5996.
- Martin J.-R., Ernst R., Heisenberg M., 1998. Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learning & Memory* 5: 179-191.
- McBride S., Giuliani G., Choi C., Krause P., Correale D., Watson K., Baker G., Siwicki K., 1999. Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 24: 967-977.
- McGuire S., Phuong T., Davis R., 2001. The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* 293: 1330-1332.
- Médioni J., Vaysse G., 1975. Suppression conditionnelle d'un reflexe chez la Drosophile (*Drosophila melanogaster*): acquisition et extinction. *C. R. Soc. Biol.* 169: 1386-1391.
- Menzel R., Erber J., Masuhr T., 1974. Learning and memory in the honeybee. *Experimental analysis of insect behaviour* (ed. L. Barton-Brown), pp. 195-217. Springer, Berlin, Germany.
- Milner B., 1966. Amnesia following operation on the temporal lobes. In: Whitty and Zangwill (eds). *Amnesia*. London: Butterworths, 109-133.
- Milner B., Squire L. R., Kandel E. R., 1998. *Cognitive neuroscience and the study of memory*. *Neuron* 20: 445-468.
- Mishkin M., Appenzeller T., 1987. The anatomy of memory. *Scientific American*, June, S. 62-71.

- Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S., Baudry M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, APV. *Nature* 319: 774-776.
- Murphy G., Glanzman D., 1997. Mediation of classical conditioning in *Aplyia californica* by long-term potentiation of sensory-motor synapses. *Science* 278: 467-470.
- Nässel D. R., Klekes K., 1992. Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tiss. Res.* 267: 147-167.
- Pascual A., Pr at T., 2001. Localisation of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294: 1115-1117.
- Penfield W., Roberts L., 1959. *Speech and Brain-Mechanisms*, Princeton. Princeton University Press.
- Quan F., Thomas L., Forte M., 1991. *Drosophila* stimulatory G protein α subunit activates mammalian adenylyl cyclase but interacts poorly with mammalian receptors: implications for receptor-G protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1898-1902.
- Quinn W. G., Harris W. A., Benzer S., 1974. Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71 3: 708-712.
- Rahmann H., Rahmann M., 1988. *Das Gedächtnis; neurobiologische Grundlagen*. München: Bergmann; New York; Berlin; Heidelberg: Springer.
- Rescorla R. A., 1968. Probability of shock in the presence and absence of CS in fear conditioning. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 66: 1-5.
- Sachs L., 1992. *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag, Berlin.
- Schmidt S. (Hrsg), 1991. *Gedächtnis: Probleme und Perspektiven der interdisziplin ren Gedächtnisforschung*. Frankfurt am Main; Suhrkamp.
- Schulz R., Chromey C., Lu M., Zhao B., Olson E., 1996. Expression of the D-MEF2 transcription in the *Drosophila* brain suggests a role in neuronal cell differentiation. *Oncogene* 12: 1827-1831.
- Schwaerzel M., Heisenberg M., Zars T., 2002. Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron*, 35: 951-960.
- Scoville, W. und Milner B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 20: 11-21.
- Skinner B. F., 1966. *The behavior of organisms*. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Skoulakis E., Kalderon D., Davis R., 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.
- Skoulakis E., Davis R., 1996. Olfactory learning deficit in mutants for *leonardo*, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 Protein. *Neuron* 17: 931-944.

- Smith R., Choi K., Mardon G., Tully T., Quinn W., 1986. Deficient protein kinase C activity in turnip, a *Drosophila* learning mutant. *Molecular neurobiology of Drosophila*. Cold Spring Harbor, New York.
- Squire L., Kandel E., 1999. *Gedächtnis: Die Natur des Erinnerns*. Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl.
- Strausfeld N. J., Hansen L., Li J., Gomez R. S., Ito K., 1998. Evolution, discovery, and interpretation of arthropod mushroom bodies. *Learning and Memory* 5: 11-37.
- Stryer L., 1996. *Biochemie*. 4. Auflage – Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verl.
- Sunahara K., Dessauer W., Gilman G., 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 461-480.
- Sweeney S., Brodie K., Keane J., Niemann H., O’Kane C., 1995. Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14: 341-351.
- Tang S., Guo A, 2001. Choice behavior of *Drosophila* facing contradictory visual cues. *Science* 294: 1543-1547.
- Tarpy R. M., 1997. *Contemporary learning theory and research*. McGraw-Hill Companies, Inc.
- Technau G., 1984. Fiber number in the mushroom bodies of adult *Drosophila melanogaster* depends on age, sex and experience. *J. Neurogenet.* 1: 113-126.
- Tempel B., Livingstone M., Quinn W., 1983. Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1482-1486.
- Tempel B., Livingstone M., Quinn W., 1984. Mutations in the dopa decarboxylase gene affect learning in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3577-3581.
- Thorndike E. L., 1911. *Animal intelligence: Experimental studies*. New York: Macmillan.
- Tully T. und Quinn W., 1985. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* 157:263-277.
- Tully T., Preat T., Boynton S., Vecchio M., 1994. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79: 35-47.
- Tulving E., 1972. Episodic and semantic memory. In: *Organization of memory*. New York: Academic Press, 381-403.
- Urban N., Barrionuevo G., 1996. Induction of hebbian and non-hebbian mossy fiber long-term potentiation by distinct patterns of high-frequency stimulation. *The Journal of Neuroscience* 16: 4293-4299.
- Villacres E., Wong S., Chavkin C., Storm D., 1998. Type I adenylyl cyclase mutant mice have impaired mossy fiber long-term potentiation. *J. of Neuroscience* 18: 3186-3194.

- Vosshall L., Wong A., Axel R., 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102: 147-159.
- Waddell S., Armstrong J., Kitamoto T., Kaiser K., Quinn W., 2000. The *amnesiac* gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell* 103: 805-813.
- Waddell S., Quinn G., 2001a. Learning how a fruit fly forgets. *Science*; 293: 1271-1272.
- Waddell S., Quinn G., 2001b. What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends in Genetics* 17 (12): 719-726.
- Wolf R., Heisenberg M. 1986. Visual orientation in *Drosophila* is an operant behavior. *Nature* 323: 154-156.
- Wayman G., Impey S., Wu Z., Kindsvogel W., Prichard L., Storm D., 1994. Synergistic activation of the type I adenylyl cyclase by Ca^{2+} and $G_{\alpha s}$ -coupled receptors in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 25400-25405.
- Wolf R., Wittig T., Liu L., Wustmann G., Eyding D., Heisenberg M., 1998. *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning. *Learning & Memory* 5:166-178.
- Wu Z., Steven T., Villacres E., Xia Z., Simmons M., Chavkin C., Palmiter R., Storm D., 1995. Altered behavior and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. *PNAS* 92: 220-224.
- Wustmann G., Heisenberg M., 1997. Behavioral manipulation of retrieval in a spatial memory task for *Drosophila melanogaster*. *Learning & Memory* 4: 328-336.
- Xia Z., Revsdal C., Merchant K., Dorsa D., Storm D., 1991. Distribution of mRNA for the Calmodulin-sensitive adenylyl-cyclase in rat brain: Expression in areas associated with learning and memory. *Neuron* 6: 431-443.
- Xia Z., Choi E., Wang F., Blazynski C., Storm D., 1993. Type I calmodulin-sensitive adenylyl cyclase is neural specific. *Journal of Neurochemistry* 60: 305-311.
- Yin J. C. P., Wallach J. S., Vecchio M. D., Wilder E. L., Zhou H., Quinn W. G., Tully T., 1994. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79: 49-58.
- Yin J. C. P., Vecchio M. D., Zhou H., Tully T., 1995. CREB as a memory modulator: Induced expression of a cCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 81: 107-115.
- Zars T., Fischer M., Schulz R., Heisenberg M., 2000a. Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288: 672-675.
- Zhong Y., Wu C. F., 1991. Altered synaptic plasticity in *Drosophila* memory mutants with a defective cyclic AMP cascade. *Science* 251: 198-201.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. M. Heisenberg und dem Institut für Genetik und Neurobiologie für die Möglichkeit, dort meine medizinische Doktorarbeit anfertigen zu können.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. K. V. Toyka, daß er die Betreuung der Arbeit von medizinischer Seite übernommen hat.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. A. Warnke für die Anfertigung des 1. Koreferates.

Lebenslauf

Name: Fischer
Vorname: Matthias
Geburtsdatum: 11. November 1973
Geburtsort: Bad Kissingen
Familienstand: ledig

Ausbildung:

Besuch der Grundschule in Motten 1980 - 1984

Besuch des Gymnasiums in Bad Brückenau 1984 - 1993

Klavierstudium an der Musikhochschule München 1993 - 1994

Medizinstudium an der JMU Würzburg 1995 - 2002

Anfertigung der medizinischen Doktorarbeit am Institut für Genetik und Neurobiologie
1999/2000

Praktisches Jahr 2001/2002 an der Universitätsklinik Würzburg in den Fächern
Innere Medizin, Chirurgie und Neurologie

Drittes Staatsexamen im Juni 2002

AiP an der Neurologischen Universitätsklinik in Würzburg seit August 2002

Stipendiat des MD/PhD-Programms des IZKF (Interdisziplinäres Zentrum
für Klinische Forschung) der Universität Würzburg seit dem WS 2002

Veröffentlichungen: „Localization of a Short-Term Memory in Drosophila“;
Science, 28 April 2000, Volume 288, pp. 672-675