

Abstract

Alcohol use disorders (AUD) represent a major problem for the suffering individuals, their social surroundings and even society itself. A GWAS with German patients (Treutlein et al., 2009) and two related follow-up studies (Frank et al., 2012; Juraeva et al., 2015) were performed and associated the genes *ESR1*, *PECR*, *PPP2R2B*, *XRCC5* and *GPD1L* with AUD. The aim of this thesis was the functional validation of the putative homologues genes *ERR*, *dPECR*, *twins*, *Ku80* and *GPDH* in *Drosophila melanogaster* in ethanol-related behaviour.

hang^{AE10} mutant flies were used as control for validation of the used behavioural assays since *hang* is involved in mediation of ethanol tolerance and is part of a cellular stress pathway (Scholz et al., 2005). Here it was shown that *hang* is also involved in mediation of rapid ethanol tolerance in the Florida assay that measures the loss of righting reflex (LORR), that is more comparable to mammalian data, instead of the loss of postural control measured which is measured in the inebriometer. Additionally, *hang* is involved in re-consumption after ethanol withdrawal, a behaviour that should mimic reinstatement after ethanol withdrawal as measured in mammalian models. Finally, *hang* is also involved in responses to milder stresses like starvation and oxidative stress induced by hydrogen peroxide.

The analysis of the candidate gene *ERR* revealed that it mediates ethanol tolerance and re-consumption after withdrawal similar to *hang* and also defines a cellular stress pathway regarding starvation and oxidative stress. The analysis of the candidate gene *dPECR* revealed that it mediates normal ethanol tolerance and is also involved in normal re-consumption after withdrawal behaviour. Further, *dPECR* regulates food intake and a loss of *dPECR* leads to enhanced survival upon starvation and oxidative stress. The analysis of the candidate gene *twins* revealed that it is mediating ethanol sensitivity and tolerance, but does not seem to be involved in re-consumption after withdrawal behaviour. A loss of *twins* promotes survival upon starvation and oxidative stress.

Knock-down of *Ku80* in neurons leads to increased resistance against the loss of postural control (Juraeva et al., 2015). In contrast, over-expression of *Ku80* in neurons enhances resistance against ethanol-induced sedation. In re-consumption after withdrawal *Ku80* does not seem to play a role. In regard to oxidative stress, *Ku80* might be a regulatory switch for the cellular stress responses, since both reduction and over-expression of *Ku80* seemed to enhance survival.

The analysis of the candidate gene *GPDH* revealed that it mediates ethanol sensitivity and food consumption, but not re-consumption after withdrawal.. Loss of *GPDH* promoted longer survival upon starvation and increased survival upon oxidative stress.

Similar phenotypes observed upon manipulation of different genes suggest that there are shared pathways that mediate single behaviours. *ERR* and *twins* both regulate the transcription of the transcription factor *domino* (*dom*) that could regulate the transcription of *hang*, since in both *ERR* and *twins* mutant flies *hang* transcript levels are increased. *Twins* itself is a negative regulator of the insulin pathway that is involved in mediation of ethanol sensitivity (Corl et al., 2005; Acevedo et al., 2015). Both *ERR* and *Hang* are connected to the hypoxia inducible factor (HIF) *Sima* and together possibly define the cellular stress pathway that also mediates re-consumption after withdrawal. In mammals, the *GPDH* orthologue *GPD1L* indirectly regulates the stability of HIF, and *GPDH* transcript levels were *hang* dependent as well as *hang* transcription was *GPDH* dependent. Transcription analysis further indicates that *dPECR* transcript levels are regulated by *Hang*, suggesting an ethanol tolerance pathway involving both genes. Further, *dPECR* and *GPDH* proteins are connected in a network with the alcohol dehydrogenase (*ADH*), suggesting an involvement in ethanol metabolism of both genes. Decreased enzymatic activity of *GPDH* is already associated with a decrease in metabolic ethanol tolerance that equals ethanol sensitivity (Eanes et al., 2009).

Ku80 is connected to *Hang* via the transcription factor *tramtrack* (*ttk*) and *Ku80* shows *hang*-dependent transcription that might be regulated via *ttk* and that pathway seems to regulate ethanol sensitivity and responses to cellular stress. All of the analysed genes - and thus their human orthologues - seem to be promising candidates for further AUD research. Further findings could help improve treatment for AUD, because current treatment with *Acamprosate* does not prevent relapse after ethanol withdrawal in all patients. In flies, the supplementation of flies with *Acamprosate* and also calcium chloride successfully suppresses the normal re-consumption after withdrawal behaviour that is also suppressed in a similar extent in rats treated with both substances (Spanagel et al., 2014).

Zusammenfassung

Alkoholkrankheit ist ein großes Problem für die Betroffenen, ihre sozialen Kontakte und die Gesellschaft selbst. Eine Genom-weite Assoziations Studie (GWAS; Treutlein et al., 2009) und zwei darauf bezogene Folgestudien (Frank et al., 2012; Juraeva et al., 2015) wurden durchgeführt und brachten die Gene *ESR1*, *PECR*, *PPP2R2B*, *XRCC5* and *GPD1L* in Zusammenhang mit Alkoholkrankheit. Das Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Validierung der mutmaßlichen homologen Gene *ERR*, *dPECR*, *twins*, *Ku80* and *GPDH* in Ethanol-bezogenem Verhalten in *Drosophila melanogaster*.

hang^{AE10} mutante Fliegen wurden als Kontrollen für die Validierung der verwendeten Verhaltensversuche benutzt weil *hang* in an der Vermittlung von Ethanoltoleranz beteiligt ist und auch einen Teil eines zellulären Stress Signalwegs darstellt (Scholz et al., 2005). Hier wurde gezeigt, dass *hang* auch rapide Ethanoltoleranz im Florida Testverfahren vermittelt, das den Verlust des Aufrichtungsreflexes misst und damit besser vergleichbar zu Säugetierdaten ist, anstatt den Verlust der Haltungskontrolle der im Inebriometer gemessen wird. Zusätzlich ist *hang* beteiligt am Wieder-Konsum nach Ethanolentzug, einem Verhalten das dem Rückfall nach Alkoholentzug der in Säugetiermodellen entsprechen soll. Zuletzt ist *hang* auch beteiligt an den Antworten auf leichten Stress wie Hungern und oxydativem Stress, der durch Wasserstoffperoxid hervorgerufen wurde.

Die Analyse des Kandidatengens *ERR* ergab, dass es ähnlich wie *hang* an der Vermittlung von Ethanoltoleranz und Wieder-Konsum nach Entzug beteiligt ist und auch einen zellulären Stresssignalweg definiert in Bezug auf Hungern und oxydativen Stress. Die Analyse des Kandidatengens *dPECR* ergab, dass es an der Entwicklung normaler Ethanoltoleranz beteiligt ist und auch im Wieder-Konsum nach Entzug eine Rolle spielt. Des Weiteren reguliert *dPECR* Futteraufnahme und ein Verlust von *dPECR* führt zu verbessertem Überleben unter Hungerstress und oxydativem Stress. Die Analyse des Kandidatengens *twins* ergab, dass es an der Vermittlung von Ethanol sensitivität und –toleranz beteiligt ist, aber nicht am Wieder-Konsum nach Entzug. Der Verlust von *twins* fördert das Überleben unter Hungerstress und oxydativem Stress. Die Herunterregulierung von *Ku80* in Neuronen führt zu einer erhöhten Resistenz gegen den Verlust der Haltungskontrolle (Juraeva et al., 2015). Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von *Ku80* in Neuronen zu einer erhöhten Resistenz gegen Ethanol-induzierte Sedierung. Im Wieder-Konsum nach Entzug scheint *Ku80* keine Rolle zu spielen. In Bezug auf oxydativen Stress scheint *Ku80* einen regulatorischen Schalter für zelluläre Stressantworten darzustellen, weil sowohl Reduktion als auch Überexpression von *Ku80* das

Überleben verbessern. Die Analyse des Kandidatengens *GPDH* ergab, dass es Ethanol sensitivität und Futteraufnahme, aber nicht Wieder-Konsum nach Entzug vermittelt. Der Verlust von *GPDH* fördert längeres Überleben unter Hungerstress und oxydativem Stress. Die Beobachtung ähnlicher Phänotypen bei der Manipulation verschiedener Gene suggeriert, dass es gemeinsame Signalwege gibt, die einzelne Verhalten vermitteln. *ERR* und *twins* regulieren beide die Transkription des Transkriptionsfaktors *domino* (*dom*), der wiederum die Transkription von *hang* regulieren könnte, da die Transkriptionslevel von *hang* in Mutanten von *ERR* und *twins* erhöht sind. *Twins* selbst ist ein negativer Regulator des Insulinsignalweges, der Ethanol sensitivität vermittelt (Corl et al., 2005; Acevedo et al., 2015). *ERR* und *Hang* sind beide mit dem Hypoxia Induzierbarem Faktor (HIF) *Sima* verbunden und zusammen definieren sie wahrscheinlich den zellulären Stresssignalweg, der auch den Wieder-Konsum nach Entzug vermittelt. In Säugetieren reguliert das *GPDH* ortholog *GPD1L* indirekt die Stabilität vom HIF und *GPDH* Transkriptionslevel waren abhängig von *hang* als auch *hang* von *GPDH*. Die Transkriptionsanalyse weist weiter darauf hin, dass *dPECR* Transkriptionslevel von von *Hang* reguliert werden und dies suggeriert einen gemeinsamen Signalweg für beide Gene in der Vermittlung von Ethanol toleranz. Des Weiteren sind die Proteine *dPECR* und *GPDH* in einem Netzwerk mit der Alkoholdehydrogenase (*ADH*) verbunden, was eine Beteiligung beider Gene am Ethanolmetabolismus nahelegt. Reduzierte Enzymaktivität von *GPDH* ist schon mit einer Reduktion von metabolischer Ethanol toleranz ,die Ethanol sensitivität entspricht, assoziiert worden (Eanes et al., 2009). *Ku80* ist über den Transkriptionsfaktor *tramtrack* (*ttk*) mit *Hang* verbunden und *Ku80* zeigt eine *hang*-abhängige Transkription die durch *ttk* reguliert sein könnte und dieser Signalweg scheint Ethanol sensitivität und zelluläre Stressantworten zu regulieren. Alle der analysierten Gene – und damit auch ihre humanen Orthologe – scheinen vielversprechende Kandidaten für weitere Erforschung von Alkoholkrankheit zu sein. Weitere Forschungsergebnisse könnten dabei helfen die Behandlung von Alkoholkrankheit zu verbessern, weil derzeitige Behandlung mit *Acamprosate* nicht in allen Patienten den Rückfall nach Alkoholentzug vermeidet. In Fliegen führt die Ergänzung der Nahrung mit *Acamprosate* und auch *Calciumchlorid* zu einer erfolgreichen Unterdrückung des normalen Wieder-Konsums nach Entzug, der ebenso auf ähnliche Weise in mit beiden Substanzen behandelten Ratten unterdrückt wird (Spanagel et al., 2014).