



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

# **Physiologie eines erlernten Körpermodells bei *Drosophila melanogaster***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz

vorgelegt von Tammo Krause  
geboren 31.01.1983 in Achim / Verden a.d. Aller

Mainz, 25.03.2015

**Dekan:**

**1. Berichterstatter:**

**2. Berichterstatter:**

**Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2015**

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung.....	1
1.2 Der Versuchsorganismus.....	2
1.3 Die Manipulationsmöglichkeiten.....	2
1.4 Lernen und Gedächtnis.....	5
1.5 Die Konsolidierung.....	8
1.6 Das Zentralnervensystem von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
1.7 Das Kletterverhalten von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	11
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Versuchstiere .....	13
2.2 Aufzucht im Dunkeln .....	13
2.3 Visuelle Stimulation in einer LED-Arena .....	13
2.4 Stimulation in einem visuellen Reizungsparadigma .....	15
2.5 Durchführung des Kletterparadigmas.....	16
2.6 Das Motorische Lernen .....	17
2.6.1 Motorisches Lernen auf einer Kletterschiene .....	18
2.7 Verhaltensanpassungen an Verletzungen .....	20
2.8 Histologie .....	20
2.8.1 Paraffinschnitte nach der Autofluoreszenzmethode .....	20
2.8.2 Immunhistologische Färbung ganzer adulter <i>Drosophila</i> -Gehirne.....	21
2.9 Fliegenstämme.....	22
2.10 Kreuzungen.....	24
2.11 Statistik .....	24
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
3.1 Das Kletterverhalten.....	26
3.2 Gewählte Darstellungsformen.....	26
3.3 Das wildtypische Kletterverhalten .....	27
3.4 Das Kletterverhalten der Strukturmutanten <i>ocelliless</i> <sup>1</sup> -Fliegen .....	28
3.5 Das Kletterverhalten lernmutanter <i>rutabaga</i> <sup>1</sup> -Fliegen .....	30
3.6 Das Kletterverhalten lernmutanter <i>dunce</i> <sup>1</sup> -Fliegen.....	32
3.7 Das Kletterverhalten ohne visuelle Erfahrungen .....	34
3.8. Die Rettung des Körpergrößernlernens mittels cDNA.....	41
3.8.1 Die Kartierung des Körpergrößernlernens mittels <i>rut</i> -Rettung.....	43
3.8.2 Die Kartierung des Körpergrößernlernens mittels <i>dnc</i> -Rettung .....	44
3.8.3 Die Kartierung mittels distinkter Linien .....	45
3.9 Die Regulierung des Körpergrößernlernens mittels RNAi .....	49
3.10 Die spatio-temporale Induzierung des Körpergrößernlernens.....	50
3.11 Die Regulierung der Proteinkinase A .....	52
3.12 Die Regulierung des Transkriptionsfaktors CREB .....	54
3.13 Die genetischen Interaktionen möglicher cAMP-Ziele.....	56
3.14 Die Auswirkung verschiedener Adenylylzyklasen .....	58
3.15 Die Auswirkung verschiedener Phosphodiesterasen .....	63
3.16 Die Rolle von <i>amnesiac</i> beim Körpergrößernlernen.....	66
3.17 Die Kandidaten weiterer Signalwege beim Körpergrößernlernen.....	68
3.18 Das motorische Lernen beim Überqueren von Lücken .....	70
3.19 Die Rettung motorisch lernmutanter Fliegen.....	71

---

3.20 Die Module der motorischen Anpassung .....	74
3.21 Die motorische Anpassung nach Verletzungen .....	76
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>78</b>
4.1 Die wildtypische Körpergrößeneinschätzung .....	78
4.2 Mutationen mit eingeschränkter Körpergrößeneinschätzung .....	81
4.3 Die Kartierung des Körpergrößengedächtnisses .....	82
4.4 Die Rolle weiterer ACs und PDEs beim Körpergrößengedächtnis .....	83
4.5 Die Formierung des Körpergrößengedächtnisses .....	86
4.6 Ein Modell für Körperreichweitenlernen .....	89
4.7 Das motorische Lernen .....	91
4.8 Ausblicke.....	94
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	95
5.2 Summary of the Results.....	96
<b>6. Verzeichnis.....</b>	<b>98</b>
6.1 Literatur .....	98
6.2 Abbildungen .....	106
<b>7. Anhang .....</b>	<b>107</b>
7.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	107
7.1.1 CS-Männchen an Lückenbreiten von 2,0- 6,0 mm .....	107
7.1.2 <i>ocelliless</i> <sup>1</sup> -Männchen an Lückenbreiten von 2,0- 6,0 mm .....	107
7.1.3 <i>rutabaga</i> <sup>1</sup> -Männchen an Lückenbreiten von 2,0- 6,0 mm .....	108
7.1.4 <i>dunce</i> <sup>1</sup> -Männchen an Lückenbreiten von 2,0- 6,0 mm.....	109
7.1.5 Die erfolglosen Versuche dunkel aufgezogener CS-Fliegen.....	109
7.1.6 Die Größeneinschätzung durch visuelle Erfahrungen .....	110
7.1.7 Die Auswirkungen zweier <i>rutabaga</i> Allele .....	112
7.1.8 Die partielle Rettung des <i>rut</i> <sup>1</sup> -Hintergrunds.....	113
7.1.9 Die partielle Rettung des <i>dnc</i> <sup>1</sup> -Hintergrunds .....	114
7.1.10 Die Kartierung des Körpergrößenslernens mittels distinkter Linien .....	115
7.1.11 Die Regulierung des Körpergrößenslernens mittels RNAi .....	116
7.1.12 Die spatiotemporale Rettung des <i>rut</i> <sup>1</sup> -Hintergrunds.....	117
7.1.13 Die Auswirkungen verschiedener PKA- Regulationen .....	117
7.1.14 Die Regulierung von CREB.....	119
7.1.15 Die Interaktionen möglicher cAMP-Zielgene .....	120
7.1.16 Die Auswirkungen unterschiedlicher ACs .....	121
7.1.17 Die Auswirkungen unterschiedlicher PDEs .....	124
7.1.18 Die Rolle von <i>amnesiac</i> beim Körpergrößenslernen.....	126
7.1.19 Die Kandidaten weiterer Signalwege .....	127
7.1.20 Das wildtypische motorische Lernen.....	128
7.1.21 Die Rettung des <i>rut</i> <sup>2080</sup> -Defizits im motorischen Lernen.....	128
7.1.22 Detaillierten Anpassungen beim motorischen Lernen .....	130
7.1.23 Der Strategiewechsel nach Verletzungen .....	130
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>131</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>132</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit einem möglichen Körpermodell bei einem Invertebraten-Versuchsorganismus. Mittels neurogenetischer Methoden wurden motorische Anpassungen der Taufliege *Drosophila melanogaster* analysiert. Von Pick & Strauss (2005) konnte gezeigt werden, dass Fliegen ein vor ihnen liegendes Hindernis in Form einer Lücke im Laufsteg visuell vermessen und darauffolgende Überquerungsversuche auf kletterbare Lückenbreiten beschränken. Basierend auf diesen Erkenntnissen konnten während meiner Diplomarbeit dargestellt werden, dass große und kleine Vertreter derselben wildtypischen *Drosophila*-Population in der Lage sind die Kletterversuche an ihre unterschiedlichen Körperabmessungen anzupassen (Krause, 2009). Die kleinen Individuen stoppten an Lückenbreiten, die ihre größeren Artgenossen durchaus noch versuchten. Es konnten außerdem zwei Lernmutanten (*dunce*<sup>1</sup> und *rutabaga*<sup>1</sup>) gefunden werden, die nicht zu einer Größeneinschätzung in der Lage waren. Es sollte geklärt werden, auf welche Weise die Fähigkeit zur Reichweiteneinschätzung erlernt wird und welche biochemischen Grundlagen ihr zu Grunde liegen. Ein weiteres Ziel lag darin, die für diese Verhaltensanpassung verantwortlichen Gehirnstrukturen zu finden. Mittels genomischer Rettungen durch das UAS-GAL4-System wurde eine Kartierung der Körperrepräsentation denkbar, wie sie bei Säugetieren schon hinsichtlich der Funktionen des Somatosensorischen Cortex beschrieben wurde (Penfield & Rasmussen, 1950). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Fruchtfliegen durch wiederkehrendes Training in der Lage waren motorisch zu Lernen (Kienitz, 2010). Diese lokomotorischen Programme stellten sich sogar als so plastisch heraus, dass die Versuchstiere auch Strategien entwickeln konnten, um den herbeigeführten Verlust von Gliedmaßen zu kompensieren. Diese Arbeit stellt die Hypothese auf, dass auch im vermeintlich einfach strukturierten Nervensystem der Insekten die Abmessungen des Körpers repräsentiert seien. Abschließend wurde ein Model zur Diskussion gestellt, in dem mittels eines Schrittzählers und der wahrgenommenen Parallaxenverschiebung auf der Retina eine Eichung der mittleren Schrittlänge erfolgt. Dieses Modell bietet eine Erklärung, warum *Drosophila* die individuelle Körperreichweite einschätzen kann. Das Körpergrößengedächtnis hat sich als das stabilste Langzeitgedächtnis in *Drosophila* und damit in Insekten überhaupt herausgestellt. Es bietet nun die einmalige

Chance, die zellulären Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung mit den modernen Mitteln der *Drosophila*-Neurogenetik zu erforschen.

## 1.2 Der Versuchsorganismus

Wenn dieselben Fragen auch bei der Maus oder sogar bei Affen studiert werden könnten, warum sollte man sich dann auf die Fliege konzentrieren? Die Antwort stellte sich in diesem Fall als ziemlich trivial heraus: Bei *Drosophila* existiert eine viel höhere Wahrscheinlichkeit, dass die Neurone, welche für die Verhaltensanpassungen verantwortlich sind, von geringer Anzahl sind und identifiziert werden können. Mit den bestehenden genetischen Manipulationstechniken können sie daraufhin aktiviert und inaktiviert werden, um die biochemischen Mechanismen des Lernens nur in den relevanten Neuronen zu manipulieren (Kristan, 2014). Außerdem zeigen selbst die Taufliegen ein erstaunliches Repertoire an Verhaltensweisen wie z.B. Balz (Siegel & Hall, 1979), assoziatives Lernen (Davis, 1993), Orientierungsleistungen (Strauss & Pichler, 1998) (Neuser et al., 2008) und Aggression gegen art eigene Rivalen (Chen et al., 2002). Damit bietet *Drosophila melanogaster* der Neurobiologie genau die Vorteile, welche sie bereits der klassischen Genetik und Entwicklungsbiologie liefert. Namentlich sind das kurze Generationszeiten, eine große Anzahl an Nachkommen pro Generation, niedrige Haltungskosten, sowie ein geringer Platzbedarf, da Fruchtfliegen eine Körpergröße von ca. 2,5 mm aufweisen (Benzer, 1967). Für die funktionelle und strukturelle Analyse des Nervensystems steht eine Menge an eleganten neurogenetischen Methoden zur Verfügung (Strauss, 2002; Venken et al., 2011; Venken & Bellen, 2014).

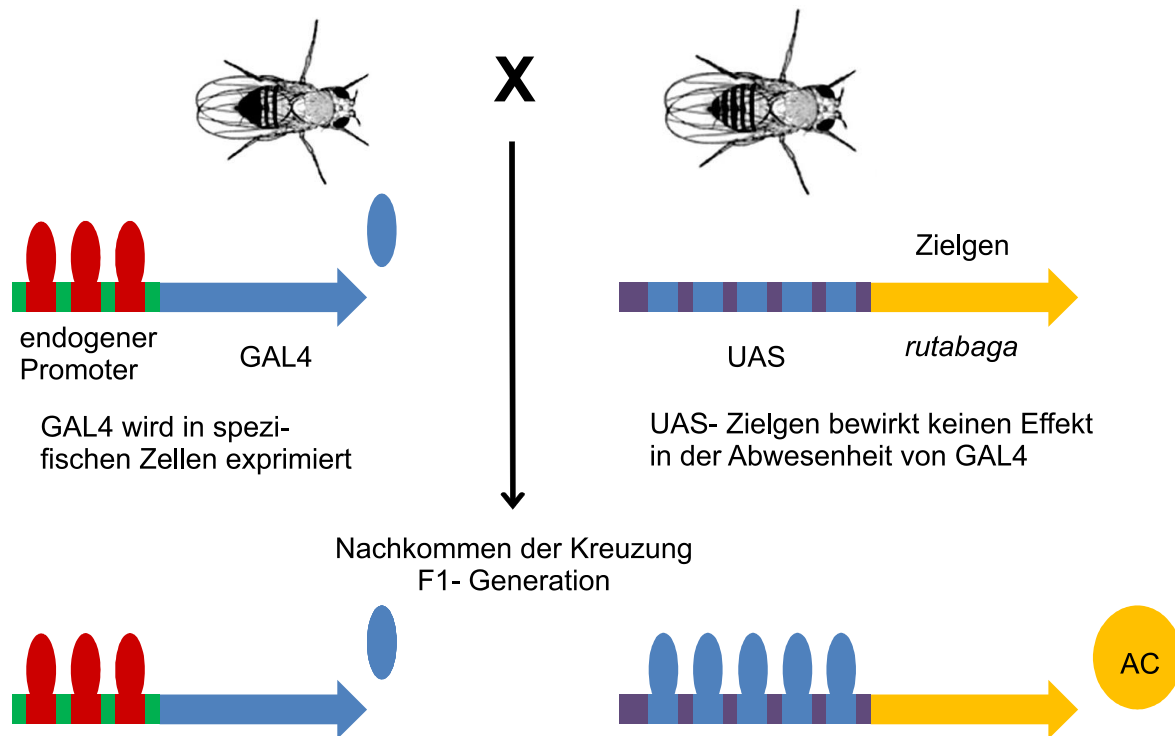
## 1.3 Die Manipulationsmöglichkeiten

Eine der bahnbrechendsten Methoden in *Drosophila* ist das GAL4-UAS-System, welche ektopische Genexpressionen ermöglicht, um das Schicksal einer Zelle maßgeblich zu verändern (Brand & Perrimon, 1993). Auf diese Weise kann ein Zielgen in spezifischen Zellen oder Geweben exprimiert werden. Der GAL4-Transkriptionsfaktor stammt wie die dazugehörige UAS-Aktivierungssequenz aus der Hefe (Abbildung 1). Das hinter die UAS-Sequenz geschaltete Hefegen wird erst abgelesen, wenn GAL4 an UAS bindet. Mittels der P-Element-Insertionstechnik werden GAL4 und UAS in verschiedenen Fliegenstämmen inseriert und somit transgenetisch getrennt. Auf diese

Weise wurde mittlerweile eine große Anzahl von Stämmen mit einem GAL4-Transkriptionsfaktor unter die Kontrolle eines Gens in *Drosophila* gestellt. Es bestehen tausende von GAL4-Linien mit spezifischen Expressionsmustern, die weltweit bestellt werden können (z.B. im Bloomington Stock Center). Dazu gibt es eine Fülle an UAS-Reportern, mit denen die Expression des GAL4-Elements visualisiert werden kann z.B. über ein grün fluoreszierendes UAS-GFP-Effektor; (Clyne et al., 2003), chemische Synapsen mittels UAS-TNT inaktiviert werden können (Sweeney et al., 1995), oder Gendefekte in kleinen Bereichen des Nervensystems zu Kartierungszwecken gerettet werden können (z.B. *rut<sup>2080</sup>*; UAS-*rutabaga<sup>+</sup>*; Zars et al., 2000). Letzteres erlaubt die Frage, ob Hirnstrukturen notwendig und hinreichend für eine bestimmte Verhaltensleistung sind. Da dieses binäre System aus einem artfremden Organismus stammt, führt GAL4 alleine in *Drosophila* zu keinem Effekt. Wenn allerdings eine GAL4-Treiberlinie und ein UAS-Effektorstamm klassisch gekreuzt werden, steht das Zielgen in der F1-Generation unter der gewünschten Kontrolle (Phelps & Brand, 1998). Probleme treten mit dieser Methode jedoch auf, wenn ein Gen im adulten Verhalten beurteilt werden soll, das aber eine essentielle Rolle bei der Entwicklung spielt. In diesem Fall ist nicht mehr zu differenzieren, welchen Grund die Verhaltensauffälligkeit besitzt. Sie entsteht entweder durch das Fehlen eines akut benötigten Syntheseprodukts, oder wegen eines minder entwickelten Gehirns. Die Lösung liegt in der Erweiterung mit so genannten Schalterkonstrukten, welche es ermöglichen nicht nur eine räumliche, sondern auch eine zeitliche Trennung zu realisieren (Leung & Waddell, 2004). Die zeitliche und räumliche Trennung des Systems ermöglicht z.B. der temperatursensitive GAL80<sup>ts</sup>-Hemmfaktor. Dieser unterdrückt bei geringen Temperaturen die Expression des Zielgens indem er an GAL4 bindet. Bei 30 °C spaltet sich dieser Hemmfaktor jedoch ab. Das Gen wird dementsprechend erst bei hohen Temperaturen transkribiert (McGuire et al., 2003). Andere Methoden beruhen auf der Temperatursensitivität des Effektors (z.B. Inaktivierung chemischer Synapsen durch UAS-*shibire<sup>ts1</sup>* (Kitamoto, 2001) oder Aktivierung von Neuronen durch UAS-*trpA1* (Rosenzweig et al., 2005) Eine weit verbreitete Methode in der Neurogenetik liegt außerdem in der Runterregulierung von Genprodukten mittels RNA-Interferenz (RNAi). Kurze, doppelsträngige RNA- Moleküle können beliebige Gene selektiv stilllegen (Fire et al., 1998). Dieser Gegenspielermechanismus beruht auf der Hybridisierung zwischen der injizierten RNA oder genetisch exprimierten RNA und der endogenen mRNA. Somit wird die Zerstörung der spezifischen mRNA vermittelt und die Translation zum Peptid verhindert (Kennerdell & Carthew, 1998). Um

diese Methode gewebespezifisch zu nutzen, wurde eine genomweite Bibliothek transgener *Drosophila*-RNAs kreiert, welche die Inaktivierung beliebiger Gene im intakten Organismus ermöglicht. Die kurzen als Inverted Repeats klonierten Genfragmente können über das binäre GAL4-UAS-System in den gewünschten Bereichen exprimiert werden (Dietzl et al., 2007). Ein Nachteil der ersten GAL4-Kollektionen war, dass diese auf der Enhancer-Trap-Methode basierten. Dabei wird ein GAL4-tragendes Transposon in eine Vielzahl zufälliger genomischer Loci inseriert. Das GAL4-Element gelangt unter die Kontrolle eines endogenen, lokalen Promoter. Jedoch kann der Insertionsort eines Transposons leider nicht kontrolliert werden, was in variablen Positionseffekten resultiert. Die eindeutige Sequenz der Elemente, welche für die Expression verantwortlich ist, bleibt verborgen. Die Weiterentwicklung erfolgte durch die Verwendung einer  $\Phi$ C31-Bakteriophagen-Integrase. Sie vermittelt die ortsgenaue Insertion eines Plasmids, welches die bakterielle Erkennungssequenz (*attB*) enthält, an die *attP*-Stelle der entsprechenden Injektionslinie (Groth et al., 2004). Durch die Ortsgebundenheit der Konstrukte können die Effekte der genomischen Umgebung konstant gehalten werden. Der Vorteil liegt darin, dass ein Gen, dessen Expression von einem spezifischen Enhancer getrieben wird, ohne die Veränderung des Expressionsmusters ausgetauscht werden kann. Der Wechsel zwischen den Treibern (z.B. GAL4, GAL80<sup>ts</sup> oder LexA) wird stark vereinfacht (Pfeiffer et al., 2008; Jenett et al., 2012). Das hauptsächliche Ziel der mit dieser Methode kreierten GAL4-Kollektionen war die Identifizierung und die spezifische Klassifizierung kleiner Neuronengruppen. Da die Expressionsmuster nicht in allen Linien die erhofften, auf einzelne Neurone beschränkten Markierungen lieferten, werden diese nach und nach über das Split-GAL4-System vereinzelt. Bei dieser Methode besteht der GAL4-Transkriptionsfaktor aus zwei Hemisphären, eine enthält die DNA-Bindedomäne und die andere enthält die Aktivierungsdomäne. Es ist möglich jeden der beiden Teiltreiber über die Kontrolle unterschiedlicher Enhancer zu treiben. Nur an den Orten wo die Expressionsmuster überlappen, fusionieren die beiden Hälften zu einem funktionellen GAL4, was die Expression des verwendeten Reportergens bewirkt. Dadurch können Treiberlinien auf kleine Neuronenpopulationen verfeinert werden (Pfeiffer et al., 2010; Venken & Bellen, 2014)





GAL4 treibt die Expression des UAS- Zielgens in zell- oder gewebespezifischen Bereichen

### Abbildung 1: Das GAL4-UAS-System

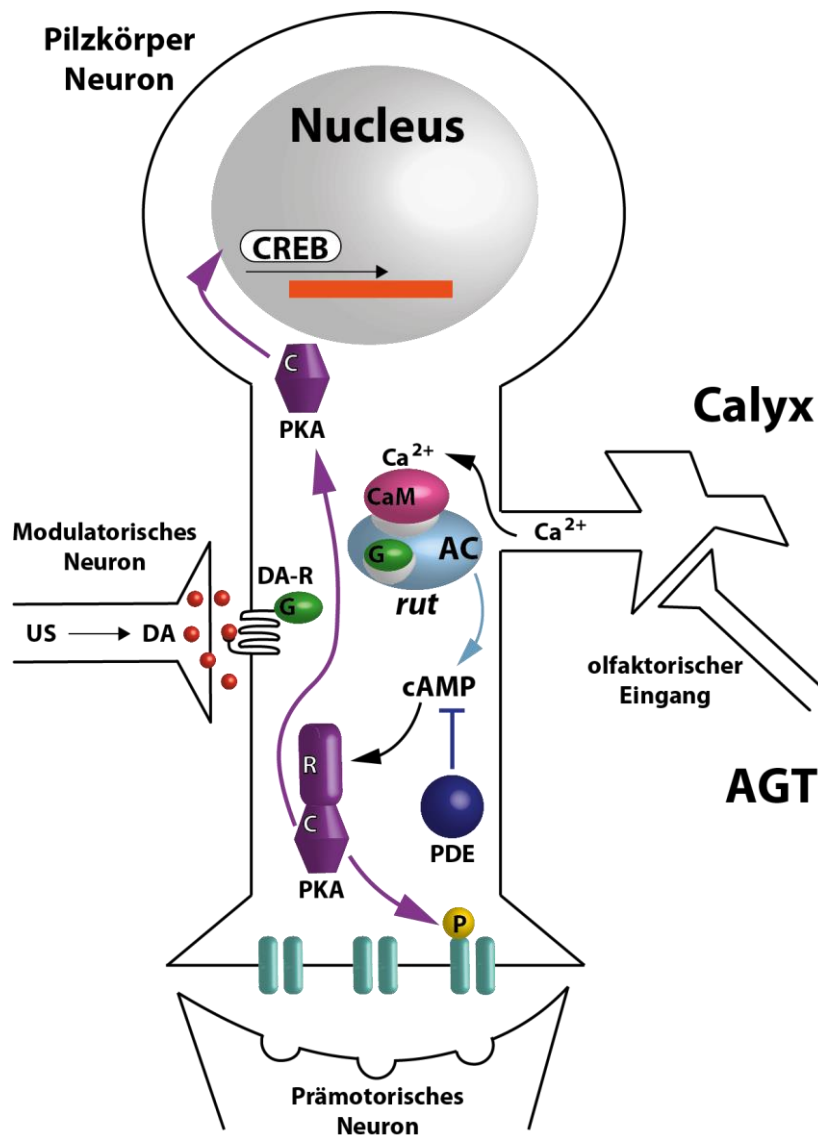
GAL4 wurde zufällig im Genom inseriert, um transgenetische Linien zu generieren, welche diesen Transkriptionsfaktor in spezifischen Geweben in Abhängigkeit genomischer Enhancer exprimieren. Das GAL4-getriebene Zielgen wird erst transkribiert, wenn die entsprechenden Fliegen mit welchen gekreuzt werden, die den Effektor unter UAS-Kontrolle inseriert haben. In diesem Beispiel wird *rutabaga* kontrolliert und in den Nachkommen der Kreuzung wird das Genprodukt, die Adenylylzyklase (AC), synthetisiert (verändert nach Brand & Perrimon, 1993; Phelps & Brand, 1998).

## 1.4 Lernen und Gedächtnis

Das Lernen wird auch als Gedächtnisbildung bezeichnet. Es resultiert aus einer Verhaltensänderung aufgrund von Erfahrungen. Die Dauerhaftigkeit dieser Anpassung führt zu einem Gedächtnis (Davis, 2005). Die strukturellen Veränderungen, die mit den Lernprozessen einhergehen, entstehen aus vielschichtigen Modifikationen des Nervensystems. Dazu gehören Veränderungen in Signaltransduktionswegen der benötigten Neuronen, in der Aktivität von Ionenkanälen, in der Struktur von Synapsen oder anderer Zell- Zellverbindungen (Davis, 1996). Vor 40 Jahren wurde in der Arbeitsgruppe von Seymour Benzer zum ersten Mal die Fähigkeit zu Lernen bei *Drosophila* beschrieben. Sie zeigten, dass Fliegen einen neutralen Geruch meiden, wenn dieser im vorherigen Training mit Elektroschocks gepaart wurde. Da die assoziative Vermeidungsreaktion durch neue Trainingsreize wieder umkehrbar war, konnten Geruchspräferenzen, Habituation oder Sensitivierung ausgeschlossen werden (Quinn et al.,

1974). Ein Langzeitgedächtnis mit einer Dauer von mehreren Tagen wird formiert, wenn hungrigen Fliegen ein neutraler Duft mit einer Zuckerbelohnung anstatt eines Elektroschocks assoziiert wird (Tempel et al., 1983). Eine komplexere und ethologisch begründete Form des Lernens besteht in der konditionierten Balzunterdrückung (Siegel & Hall, 1979). Das Verständnis dieser Interaktion zwischen Individuen benötigte einen Ansatz, bei dem eine Verhaltenssequenz in einzelne Segmente aufgeteilt wurde, um die sensorischen Reize zu differenzieren. Die Frustration eines Männchens, welches zuvor bei einem verpaarten, nicht rezeptiven Weibchen gebalzt hatte, beschreibt eine sehr eindeutige Abweichung des fixierten Verhaltensmusters (Quinn & Greenspan, 1984). Wenn dieselbe männliche Fliege nun zu einem jungfräulichen Weibchen gesetzt wird, bewirkt der Balzfrust, eine 25 % geringere Balzaktivität. Diese „Depression“ kann bis zu 2 Stunden andauern. Fruchtfliegen verwerten jedoch nicht nur die zeitlichen Verbindungen der Ereignisse ihrer Umwelt (klassischen Konditionierung), sondern sind ebenfalls in der Lage ihr Verhalten den resultierenden Konsequenzen der eigenen Handlungen anzupassen (Putz et al., 2004). Einen Aufbau mit dem diese operante Art des Lernens quantifiziert werden kann, wurde als „Hitze-Box“ beschrieben. In der länglichen Box wurde eine frei laufende Fliege konditioniert, eine Seite der Kammer zu vermeiden, indem diese sich unangenehm aufgeheizte, wann immer das Insekt die entsprechende Seite betrat (Wustmann et al., 1996). Anschließend wurde diese hitzeassoziierte Seite weiterhin vermieden, obwohl kein Temperaturschock mehr stattfand. In den 1970er Jahren begannen Kandel und Kollegen einen simplen defensiven Reflex an einer Meeresschnecke zu untersuchen und fanden diverse Lernformen: Habituation, Sensitivierung und auch assoziative Konditionierung (Mayford & Kandel, 1999). Nachdem die molekularen Grundlagen für die Formierung eines Gedächtnisses anhand des Kiemenrückzugsreflexes der Meeresschnecke *Aplysia* aufgedeckt worden waren, entstand ebenfalls ein Modell für das assoziative Duftlernen bei *Drosophila* (Davis, 1993). Dabei fungiert ein neutraler Duft als konditionierter Stimulus (CS), der über eine cAMP-abhängige Kaskade mit dem unkonditionierten Bestrafungsreiz in Verbindung gebracht wird (Abbildung 2). Der unkonditionierte Stimulus (US) wird über ein neuromodulatorisches, dopaminerges Neuron vermittelt. Die aversive Konditionierung läuft über den in den Pilzkörperneuronen exprimierten, G-Protein gekoppelten Dopaminrezeptor (Da-R). Der Weg des USs für die appetitive Konditionierung fungiert über beide G-Protein gekoppelten Rezeptoren für Oktopamin und Dopamin (Schwaerzel et al., 2003). Die Koinzidenzdetektion findet letztendlich über die doppelt regulierte, durch *rutabaga* kodierte Adenylylzyklase (AC) statt. Obwohl die

meisten darauffolgenden Ergebnisse die Grundlagen dieses Modells bestätigt hatten, zeigten neuere Studien, dass die Information, welche verschiedenen Typen von Pilzkörperneuronen präsentiert wird, zusätzlich in den anterioren gepaarten lateralen Neuronen (APLn), den dorsalen gepaarten medialen Neuronen (DPMn) und in Teilen von dopaminergen Neuronen prozessiert wird (Güven-Ozkan & Davis, 2014).



**Abbildung 2: Modell für aversives olfaktorisches Lernen.**

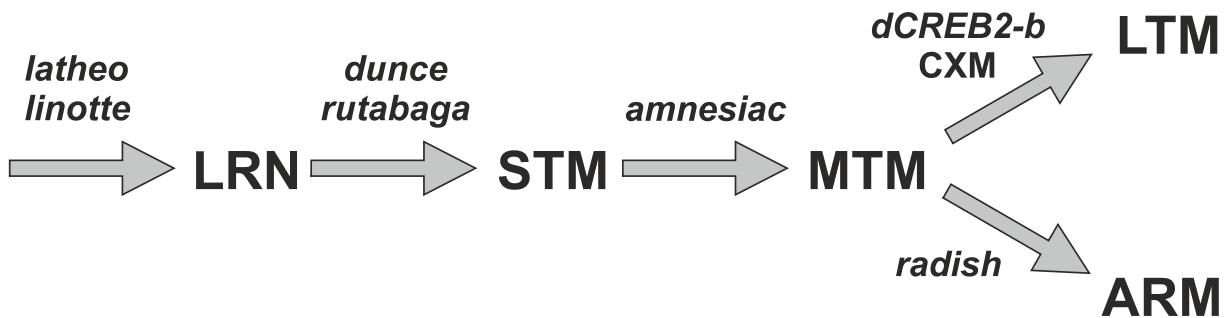
Ein duftspezifisches Pilzkörperneuron bekommt sensorischen Eingang aufgrund der Duftpräsentation über Interneurone des Antennoglomerular-Traktes (AGT), die über Synapsen den Calyx verbinden. Diese Transduktion des Duftreizes resultiert in einer vermehrten Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung, welche auf Calcium-Calmodulin (CaM) wirkt. Die gleichzeitige Elektroschockbestrafung bewirkt in einem modulatorischen Neuron die Ausschüttung von Dopamin (DA), was an den G-Protein-gekoppelten Dopaminrezeptor (DA-R) bindet. Dieser aktiviert die doppelt regulierte, durch *rutabaga* kodierte Adenylcyclase (*rut* AC). Wenn an der AC sowohl CaM, als auch das G-Protein gebunden sind, entsteht eine Koinzidenz zwischen dem unconditionierten Stimulus (US) und dem Duft. Es wird überproportional viel zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) synthetisiert, was die regulatorische Domäne (R) der Proteinkinase A (PKA) bindet, welche anschließend mit ihrer katalytischen Untereinheit (C)

entweder Ionenkanäle phosphoryliert, oder die Aktivität von CREB (cAMP response-element binding protein) heraufsetzt. Die erste Phosphorylierung führt zu einem Kurzzeitgedächtnis, wohingegen CREB als Transkriptionsfaktor Prozesse zu einem Proteinsynthese-abhängigem Langzeitgedächtnis moduliert. In Zukunft reicht der bestimmte Duft allein aus, um die Vermeidungsreaktion auszulösen. Als Gegenspieler baut das *dunce*-Genprodukt, die Phosphodiesterase (PDE), cAMP wieder ab. (verändert nach Waddell & Quinn, 2001)

## 1.5 Die Konsolidierung

Die Dauer eines Gedächtnisses hängt von der Intensität und den Wiederholungen während der Trainingsphase ab. Damit ein Langzeitgedächtnis erreicht werden kann, muss es von einer anfänglichen, störungsanfälligen in eine andauernde stabile Form überführt werden (Tully et al., 1994). Es benötigt neue Proteinsynthese und ist resistent gegen anästhetische Störungen. Die langanhaltende Form des Gedächtnisses weist eine Abhängigkeit von dem Transkriptionsfaktor CREB auf (Yin et al., 1994). Dabei treten vier funktionell unterscheidbare Phasen auf, die bestimmten Laufzeiten unterliegen. Das Kurzzeitgedächtnis (STM), das Mittelzeitgedächtnis (MTM), das anästhesie-resistente Gedächtnis (ARM) und das Langzeitgedächtnis (LTM) werden in Abhängigkeit des sich wiederholenden Trainings der Reihe nach durchlaufen (Abbildung 3). Dabei dauert das STM eine Stunde, das MTM bis zu fünf Stunden und das ARM über 24 Stunden an (Dubnau & Tully, 1998). Verhaltensgenetische Studien von *dunce* und *rutabaga* haben gezeigt, dass einzelne Genmutationen das assoziative Lernen stören können (Dudai et al., 1976; Livingstone et al., 1984). Doch selbst Nullmutationen dieser Gene sind nicht in der Lage, Lernen vollständig zu verhindern (Tully & Quinn, 1985). Eine Mutantenlinie wird auffällig, wenn die Laufzeit einer messbaren Gedächtnisphase kürzer ist, als die wildtypischer Fliegen. Nach dieser Definition werden z.B. *latheo* und *linotte* als Lern-Gene bezeichnet. Mutationen, die das Kurzzeitgedächtnis betreffen sind solche, welche unmittelbar nach dem Training eine geringere Gedächtnisleistung zeigen und bei denen sich auch während der ersten 30 Minuten kürzere Verfallszeiten beobachten lassen, was auf *dunce* und *rutabaga* zutrifft. Bei Genen, die für ein MTM verantwortlich sind, wie z.B. *amnesiac*, erscheint die Dauer der Gedächtnisabschnitte direkt nach dem Training und sieben Stunden nach dem Training wildtypisch, jedoch stellt sich das Leistungsniveau zwischen den beiden Phasen als geringer dar. Das *radish*-Gen betrifft das ARM und zeichnet sich durch geringere Gedächtnisleistungen während aller Zeitintervalle aus. Außerdem ist eine schwerwiegende Einschränkung des kälteschockresistenten Gedächtnisses zu be-

obachten. Abschließend stellt sich ein LTM als proteinsyntheseabhängiges Gedächtnis dar, welches nur durch Trainingsreize mit regelmäßigen Abständen erreicht werden kann. CREB-Mutationen und der Translationsinhibitor Cycloheximid (CXM) sind in der Lage, das Langzeitgedächtnis zu blockieren (Tully et al., 1994).



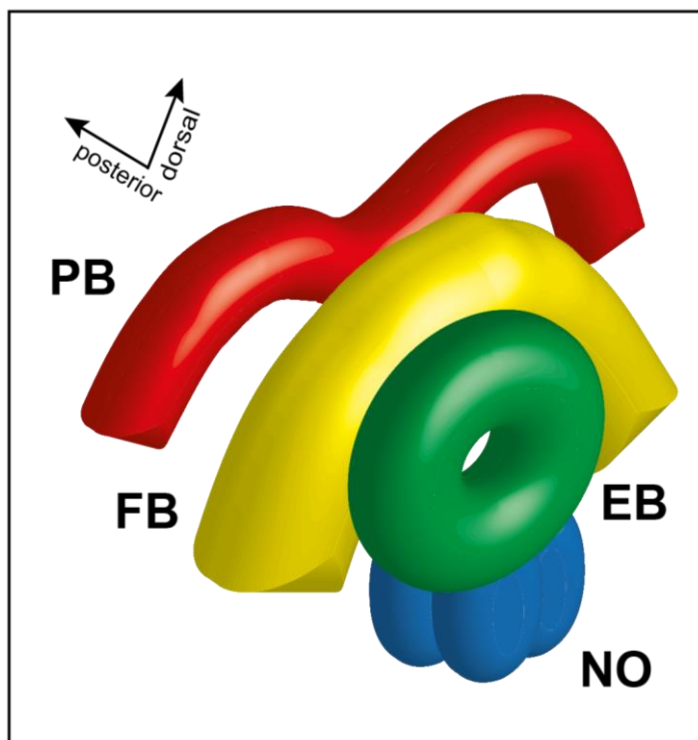
**Abbildung 3: Wege der Gedächtnisbildung nach assoziativem Lernen.**

In *Drosophila* unterbrechen einzelne Genmutationen die Gedächtnisphasen selektiv zu. Anhand dieser Mutantenlinien kann ein genetischer Pfad arrangiert werden. **LRN**: Lernen, einen bestimmten Duft durch Paarung mit einem Elektroschock zu meiden; **STM**: Kurzzeitgedächtnis (short-term memory); **MTM**: Mittelzeitgedächtnis (middle-term memory); **ARM**: Anästhesie-resistentes Gedächtnis (anesthesia-resistant memory); **LTM**: Langzeitgedächtnis (long-term memory); **CXM**: Cycloheximid (pharmakologischer Proteinsyntheseinhibitor); **dCREB2-b**: dominant negative Isoform des Enhancers CREB (verändert nach Tully et al., 1994).

## 1.6 Das Zentralnervensystem von *Drosophila melanogaster*

Damit ein Insekt in der Lage ist, zielgerichtet Laufen zu können, befinden sich lokale regulatorische Netzwerke in den thorakalen Ganglien, welche die rhythmische Sequenz der Schritte garantieren (zentrale Mustergeneratoren). Diese lokalen neuronalen Verschaltungen besitzen ähnliche Aufgaben wie das Rückenmark bei Vertebraten. Das Startsignal, Informationen über die Richtung und die Geschwindigkeit werden vom Gehirn übermittelt (Strauss, 2002). Das Fruchtfliegenhirn ist ein komplexes Oberschlundganglion und wurde eingeteilt in Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum. Die beiden erst genannten sind über dorsal zum Ösophagus gelegene Kommissuren miteinander verbunden (Power, 1943). Es besteht aus ungefähr hunderttausend Neuronen, die in einer Vielzahl von Neuropilen wie den optischen Loben, den Antennalloben, den Pilzkörpern, oder dem Zentralkomplex zusammengeschlossen sind. Diese basale Neuroarchitektur existiert hoch konserviert über alle Insektenpezies hinweg (Boyan & Reichert, 2011). Der Zentralkomplex (CX) liegt als ein höheres Steuerzentrum in der Mitte zwischen den beiden Protocerebrumhemisphären. Er vereinigt die Protocerebralbrücke (PB), den Fächerförmigen Körper (FB), den Ellipsoidkörper (EB) und die paarigen Noduli (NO) zu einer Neuropilstruktur (Abbildung 4).

Zwei weitere Bereiche sind über Projektionen von Kleinfeldneuronen sehr eng mit dem CX verbunden: Die lateralen Triangeln (LTR) und die Ventralkörper (VBO). Großfeldneurone projizieren zwischen dem CX und dem Zentralhirn (Hanesch et al., 1989); (Young & Armstrong, 2010). Als Integrationszentrum kontrolliert der CX Verhaltensmuster, die Sehen und Lokomotion erfordern. Dabei wird der PB eine topografische Repräsentation der zenitalen E-Vektor Orientierung polarisierten Lichtes in Heuschrecken (Heinze & Homberg, 2007) und die Schrittlängen Kontrolle bei der Zielausrichtung laufender Tauflieden zugeschrieben (Triphan et al., 2010). Der FB wird für das Erlernen von Objekteigenschaften benötigt, die Fliegen bei der Orientierung im Flug als Landmarken benutzen können (Liu et al., 2006). Die Ringneurone des Ellipsoidkörpers sind notwendig, um ein Orientierungsgedächtnis auszubilden. Sowohl Fliegen mit strukturellen Defekten im EB, als auch solche mit Defekten im FB sind in der Lage, sich anhand von Landmarken zu orientieren, wenn diese sichtbar sind. Im Gegensatz zur wildtypischen Form verlieren diese Fliegen jedoch sofort ihre Ursprungsrichtung, wenn die Landmarken verschwinden (Neuser et al., 2008)



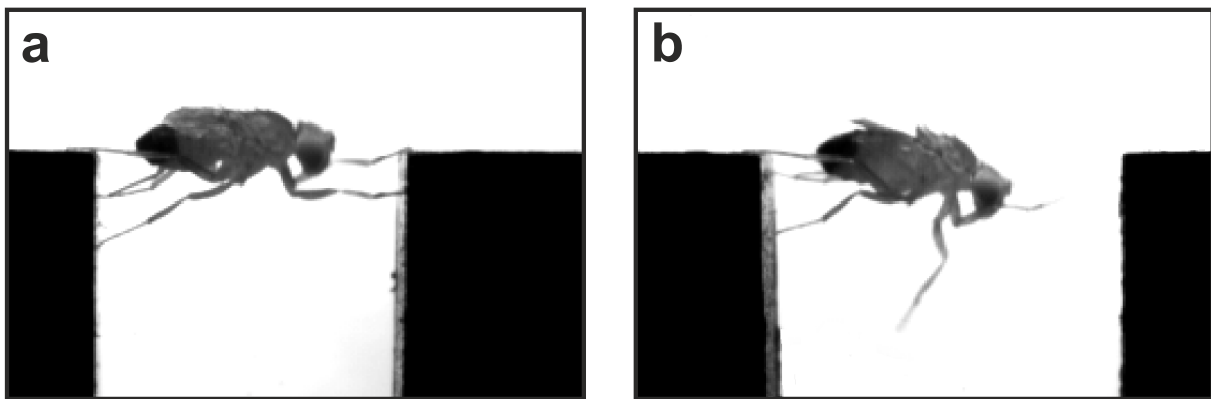
**Abbildung 4: Die Anatomie des Zentralkomplexes**

Die vier Substrukturen werden in die Protocerebralbrücke (PB in rot), den Fächerförmigen Körper (FB in gelb), den Ellipsoidkörper (EB in grün) und die paarigen Noduli (NO in blau) unterteilt (verändert nach Hanesch et al., 1989).

## 1.7 Das Kletterverhalten von *Drosophila melanogaster*

Es werden beim Klettern gerichtete und anpassungsfähige Muskel-Koordinationen verlangt, um ein entferntes Ziel zu erreichen. Das Lückenüberwindungsparadigma eignet sich, um mit neurogenetischen Methoden die Frage zu klären, welche Untereinheiten des Zentralnervensystems an dieser neuronalen Motorkontrolle beteiligt sind (Pick & Strauss, 2005). Frei laufende Fliegen werden mit einem Spalt konfrontiert, den sie typischer Weise in sieben Stufen überqueren: 1.) Sie schreiten mit ihren Vorderbeinen ins Leere 2.) und stoppen, wenn die halbe Körperlänge über dem Abgrund hängt. 3.) Nach einer kurzen Verweildauer in dieser Position werden die Vorderbeine weit über den Kopf gehoben, um mit Suchbewegungen die gegenüberliegende Klippe zu erreichen. Dieses „Bein-über Kopf-Verhalten“ wird als Indikator für einen Kletterversuch benutzt, weil es beim normalen Laufen nicht zu finden ist (Abbildung 5). Während der Beinschläge wird die Reichweite durch eine Schwerpunktverlagerung, einen direkteren Winkel und durch eine Fußstellung, die sich näher an der Lücke befindet, erfolgreich verbessert. 4.) Sobald die Vorderbeine die andere Seite erreichen, wird der Körper an dieser aufgerichtet. 5.) Daraufhin ziehen die Fliegen das Mittelbeinpaar nach. 6.) Es folgen schließlich auch die Hinterbeine und die Schwerkraft schaukelt den Körper über die Lücke an die gegenüberliegende Wand. 7.) Ohne Verzögerung laufen die Fliegen die vertikale Klippe nach oben, überwinden die Kante und setzen das normale Laufen fort. Mit diesem motorischen Ablauf ist *Drosophila melanogaster* in der Lage, Lücken bis zu einer Breite von 4,3 mm zu überqueren. Die Kletterversuche nehmen enorm ab, sobald die Lücken breiter als 4,0 mm werden, da intakte Fliegen Entfernungen visuell abschätzen. Für die Einschätzung der Lückengröße sind die Photorezeptoren R1-R6 notwendig und hinreichend, welche das Bewegungssehen realisieren. Horizontale und vertikale Kopfbewegungen können durch Versuche, bei denen der Kopf am Thorax mit Kleber fixiert wird, ausgeschlossen werden. Die Breite der Lücke muss somit während des Anlaufes eingeschätzt werden. Dieses geschieht entweder mittels der optischen Expansion bei Annäherung eines Objektes auf der Retina, oder durch die Parallaxen-Bewegung, welche aus den latero-lateralen Oszillationen des Körpers beim Laufen resultiert. Dafür spricht, dass sich der Klettererfolg enorm verbessert, wenn die gegenüberliegende Seite der Lücke ein vertikal gestreiftes Muster aufweist. Die Kletter-Bemühungen der wildtypischen Fliegen werden somit weitgehend auf überwindbare Spaltmaße beschränkt (Pick & Strauss, 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Protocerebralbrückenmutanten zwar die Entscheidung treffen zu

klettern, dabei jedoch dramatisch die Richtung verlieren. Aufgrund dessen hält die PB vermutlich eine Repräsentation des Azimuts (Horizontalwinkel) des Ziels vor (Triphan et al., 2010). Wenn wildtypische Fliegen in einem speziellen Intervalltraining das Lückenüberwinden häufig wiederholen, sind sie in der Lage ihre Überquerungsrate zu steigern. Diese Steigerung kann am folgenden Tag noch als Langzeitgedächtnis nachgewiesen werden. Lernmutanten wie *rutabaga*<sup>2080</sup> und *dunce*<sup>1</sup> zeigen diese motorische Lernform nicht (Kienitz, 2010).



**Abbildung 5: *Drosophila* an Lücken**

**a)** Die Fliege überquert eine 3,5 mm breite Lücke indem sie eine Brücke zwischen den Vorderbeinen und den Hinterbeinen bildet. Das Mittelbeinpaar stabilisiert den Körper und drückt diesen aus der Spalte heraus.

**b)** Typisches Beispiel für eine Fliege, die ihre eigene Körperlänge nicht einschätzen kann: Mit Ruderschlägen der Vorderbeine versucht sie vergeblich eine 4,5 mm breite Lücke zu überqueren. Diese nur beim Klettern auftretenden „Bein-über-Kopf-Suchschläge“ werden als Indikator für einen Versuch verwendet. Dadurch lässt sich die Entscheidung zu erfolglosen Versuchen quantifizieren.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Sowohl die *Drosophila melanogaster*-Labor-Wildtypstämme, die Mutantenlinien, als auch die Kreuzungen wurden in zylindrischen Plexigläsern mit einer Höhe von 81 mm, einem Durchmesser von 36 mm, bei einer konstanten Temperatur von 24°-26° C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 14h/10h in einer S1-Klimakammer gezüchtet. Alle Zuchtgläser waren zu ca. 1/5 mit einem Futterbrei aus Maisgries, Bäckerhefe, Agar-Agar, Sojamehl, Zuckerrübensirup, Malzextrakt und Wasser gefüllt. Für den Feuchtigkeitshaushalt wurden spezielle Pappstreifen, beträufelt mit Nipagin und einer Hefesuspension, in den Futterbrei hineingesteckt. Die Versuchstiere wurden unter Kälteanästhesie auf extreme Größen durchsucht und in die Klassen „groß“ und „klein“ unterteilt. Außerdem wurde Ihnen mittels einer Iridektomieschere einen Tag vor dem Verhaltensexperiment die Flügel auf einen Drittel Länge gestutzt. Wenn nicht ausdrücklich anders beschrieben, waren die getesteten Fliegen männlich und in einem Alter von 3 Tagen. Nach absolvierten Verhaltensparadigmen wurde den Fliegen post mortem ihre Vorderbeine abgeschnitten. Unter hundertfacher Vergrößerung konnte die Länge der Tarsi und Tibiae mittels einer elektronischen Schublehre an einem Monitor vermessen werden. Die tatsächliche Größe wurde über ein Objektmikrometer an diesem Aufbau geeicht (1 mm entsprach 117,6 mm).

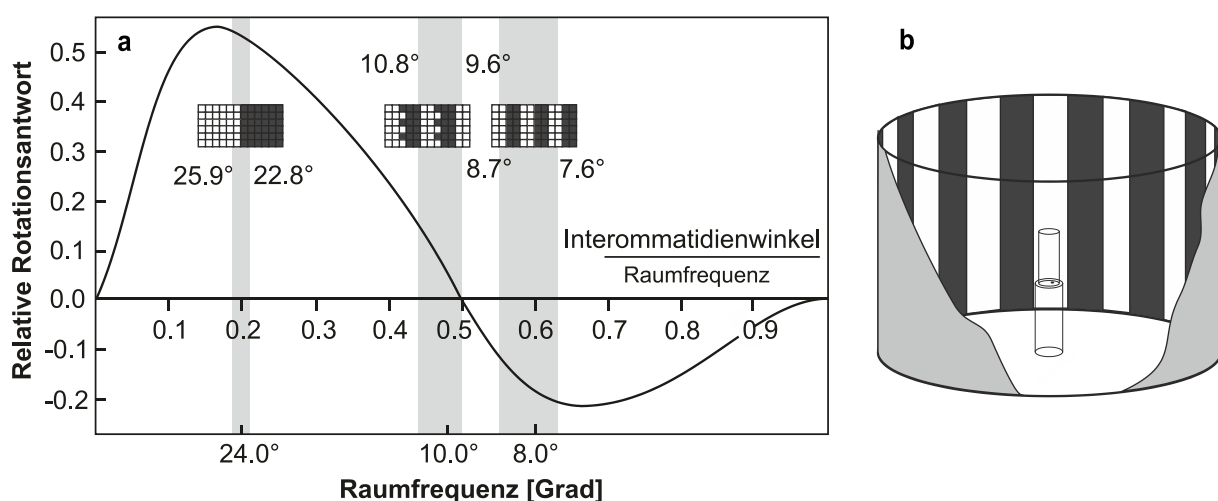
### 2.2 Aufzucht im Dunkeln

Um zu erfahren, wie *Drosophila* lernt die individuelle Körpergröße einzuschätzen, wurde ihnen ab dem Zeitpunkt des Puppenstadiums die visuelle Information genommen. Dazu wurden die Zuchtgläser in der Klimakammer mit einem Licht undurchlässigen Synthetikstoff umwickelt. Das Flügelschneiden und Sortieren erfolgte unter einer für *Drosophila* nicht detektierbaren Rotlichtglühbirne (Philips PF712E \* MO).

### 2.3 Visuelle Stimulation in einer LED-Arena

Das Bewegungssehen einer Fliege kann durch verschiedene Parameter manipuliert werden. Die Interferenz zwischen dem physiologischen Komplexaugenraster und ei-

dem entsprechend gestreiften Zylinder, welcher das Insekt umgibt, kann zur Täuschung der wahrgenommenen Richtung führen. Eine Auflösung des Bewegungsstimulus tritt auf, wenn die Raumfrequenz doppelt so groß ist wie der interommatidiale Winkel von  $4,8^\circ$ . Eine Umkehr der Richtung wird hingegen wahrgenommen, wenn die Raumfrequenz sich zwischen dem doppelten und dem einfachen interommatidialen Winkel befindet. Die optomotorische Antwort der gereizten Fliege fällt bei einer fünf- bis sechsfachen Raumfrequenz des Interommatidienwinkels am stärksten aus. Deswegen wurden dunkel gehaltene *Drosophila* drei Tage nach dem Schlüpfen verschiedenen optischen Parametern ausgesetzt (vertikale Streifenmuster mit  $24^\circ$ ,  $10^\circ$ ,  $8^\circ$  räumlicher Wellenlänge, Kontrast  $c = 0,94$ ). Die Sensitivität des Bewegungssystems wurde nach Experimenten im Flug berechnet (Heisenberg & Wolf, 1984). Die einzelne Fliege mit gekürzten Flügeln war in der Lage für 10 Minuten auf dem Boden eines leeren Polystyrolglases mit 20 mm Durchmesser frei zu laufen. Diese Beschränkung auf 20 mm in einer Arena mit 400 mm Durchmesser garantiert, dass die wahrgenommene Raumfrequenz nicht zu sehr variiert (graue Bereiche in Abbildung 6) Die Wand dieses Glases wurde dreifach mit SigmaCote beschichtet, um das Hochklettern zu verhindern. Die visuelle Stimulation erfolgte in einer Arena bestehend aus 5760 einzelnen Leuchtdioden (Strauss et al., 1997). Es war zu vermuten, dass die bei dem Laufen generierten Parallaxenbewegungen, welche proportional zur durchschnittlichen Schrittlänge auftreten, es dem Individuum ermöglichen seine eigene Körperreichweite einzuschätzen.



#### Abbildung 6: Geometrische Interferenz

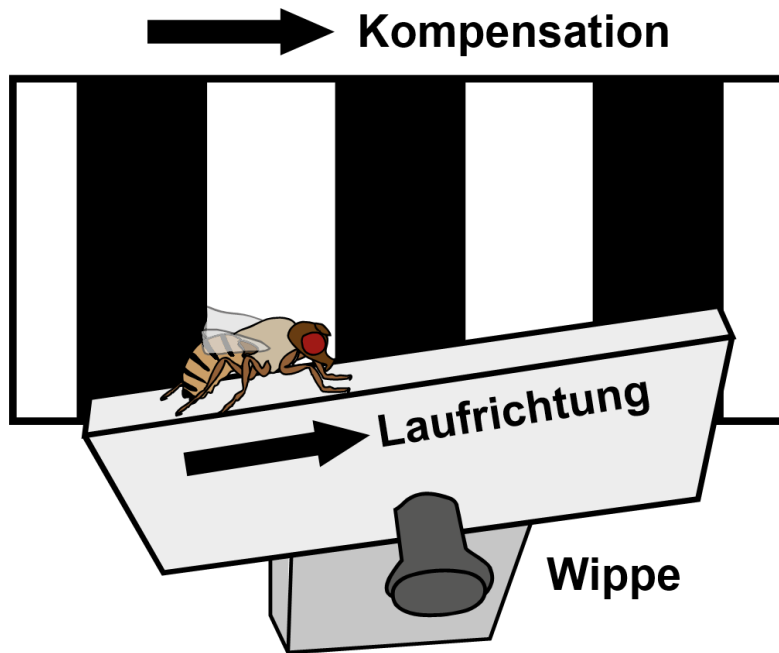
**a:** Die Sensitivität des Bewegungssystems wurde nach Experimenten im Flug von Heisenberg und Wolf (1984) berechnet. Diese ist nahezu optimal bei einer Raumfrequenz von  $24^\circ$ . Auf Grund der Geometrischen Interferenz zwischen dem Ommatidienraster und dem Umgebungsmuster liegt bei  $9,6^\circ$  die Sensitivität im Bereich von null. Eine Raumfrequenz von  $8^\circ$  sorgt hingegen für eine scheinbare Umkehr der wahrgenommenen Bewegungsrichtung. Die in der

Arena vorkommenden Blickwinkel der Fliege auf das Muster sind durch die grauen Zonen gekennzeichnet.

**b:** Die Fliege befindet sich in der Mitte einer LED-Arena. Die Plattform auf der sie sich frei in der Ebene bewegen kann ist durch ein mit Sigmacote beschichtetes Plexiglasröhrchen auf einen Durchmesser von 20 mm begrenzt.

## 2.4 Stimulation in einem visuellen Reizungsparadigma

Es wurde ein Versuchsaufbau gestaltet, mit dessen Hilfe den Fliegen unterschiedliche Parallaxenbewegungen eingespielt werden konnten. Dieses sollte dem Zweck dienen, ihnen eine veränderte Körpergröße zu suggerieren. Ein einzelnes Versuchstier wurde unmittelbar aus dem Dunkeln kommend auf einen wippe-ähnlichen Laufsteg mit dem Aspirator gesetzt. Zwei 10,5 cm hohe und 11,5 cm breite gleich geschaltete Monitore flankierten diesen Laufsteg im Abstand von 10 cm. Die Wippe war auf beiden Seiten in einem Winkel von  $10^\circ$  verstellbar und wurde eingerichtet, um eine Schräge entstehen zu lassen, welche die negative Geotaxis von *Drosophila* ansprechen sollte. Wenn das Versuchstier am Ende des Stegs angekommen war, wurde die Wippe mit einem Pinsel gekippt, was das Tier zur Umkehr bewegte (Abbildung 7). Auf den Bildschirmen (Tektronix-Identifikationsnummern: 23-24-25 & 21-22-24-25-28-52) befanden sich schwarze und grüne Streifen mit einer Breite von jeweils 2,1 cm, was in Anbetracht des 10 cm Abstandes dem optimalen Reizmuster von  $24^\circ$  entsprach. Wenn das Streifenmuster mittels des gesteuerten Frequenzgenerators (Picasso CRT Image Synthesizer) in Laufrichtung mit der Hälfte der durchschnittlichen Laufgeschwindigkeit einer *Drosophila* bewegt wurde, sollte die Fliege weniger Parallaxen wahr genommen haben und die individuelle Körpergröße dementsprechend danach kleiner einschätzen. In der Verrechnung mit der Umwelt entstand so der Eindruck für die Fliege einer geringeren mittleren Schrittlänge. Bei umgekehrten Parametern, wenn die Streifen gegen die Laufrichtung liefen, sollte die Fliege sich danach größer „fühlen“. Das Streifenmuster bewegte sich mit 7 mm/s, welches bei der durchschnittlichen *Drosophila melanogaster*-Laufgeschwindigkeit von 15 mm/s einer Kompensation zwischen 40 und 50 % entsprach (Strauss & Heisenberg, 1990). Das Training eines Individuums erfolgte mit einer Dauer von 15 Minuten. Der gesamte Aufbau befand sich in einem Dunkelraum mit einer Rotlichtquelle (Leuchtstoffröhre OsramL36W60 Rot, umwickelt mit einer dunkelroten Folie von StrandFilters).



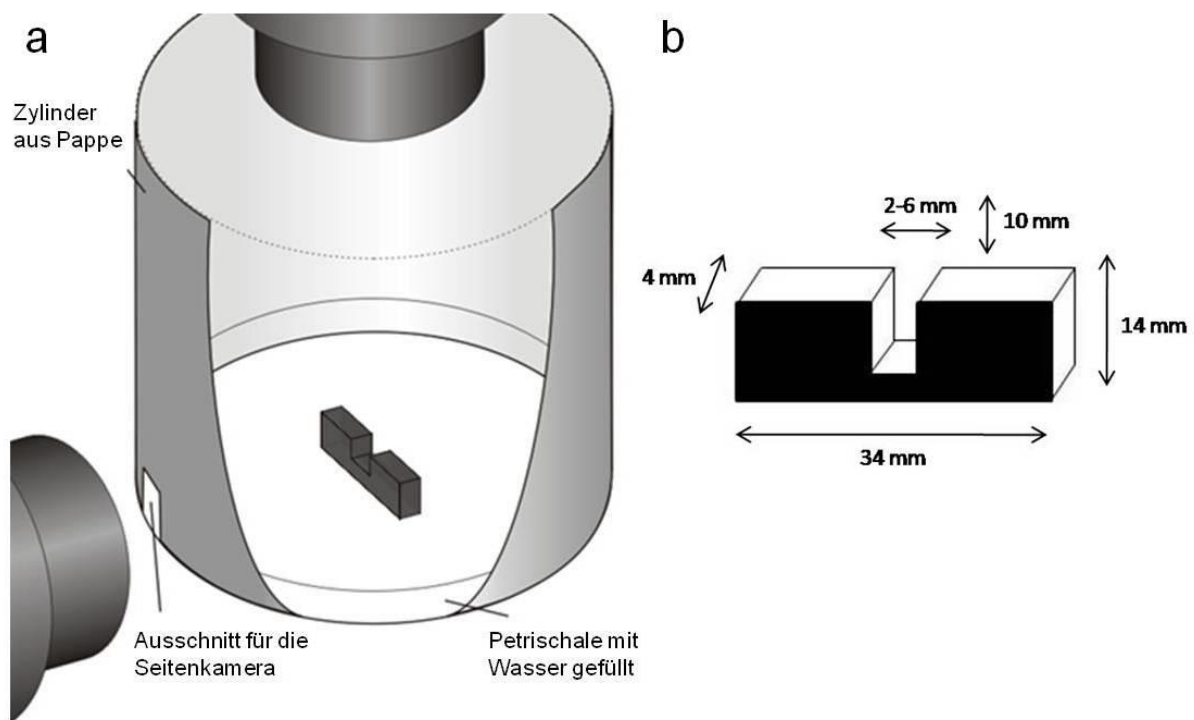
**Abbildung 7: Versuchsaufbau des visuellen Reizparadigmas**

Ein Laufsteg in Form einer Wippe zwischen 2 antiparallelen geschalteten Bildschirmen lässt sich auf beiden Seiten in einem Winkel von  $10^\circ$  verstellen. Die leichte Schräge dient der negativen Geotaxisreizung. Die Bewegung des Streifenmusters kann mittels eines Frequenzgenerators variiert werden. Die Kompensation der Parallaxen wurde so eingestellt, dass sie sich mit der Hälfte der mittleren Laufgeschwindigkeit in dieselbe Richtung bewegen. Wenn die Fliege anhält, oder die Richtung wechselt, muss ebenso der Experimentator die Kompensation stoppen, oder umkehren.

## 2.5 Durchführung des Kletterparadigmas

Dieses Paradigma erlaubte es, das Verhalten der Fruchtfliegen an Lückenweiten von 2,0 mm; 2,5 mm; 3,0 mm; 3,5 mm; 4,0 mm; 4,5 mm; 5,0 mm; 5,5 mm und 6,0 mm mit Hilfe einer Stereolupe (Zeiss OPMI 1-F) zu beobachten. Die Beleuchtung erfolgte mit einer einarmigen Kaltlichtquelle (Schott KL1500). Pro Lückenweite wurden jeweils 15 große und 15 kleine Individuen getestet. Die Größe wurde per Augenmaß klassifiziert und nach dem Verhaltensversuch quantifiziert. Die Flügel wurden immer am vorherigen Tag geschnitten (wie in Abschnitt 2.1 beschrieben). Pro Individuum sind zehn Anläufe erforderlich. Dabei gibt es die möglichen Aktionen der Fliege: Umkehren (U), Runterlaufen (R), Klettern (X) und Fallen (F). Außerdem werden die Aktionen mit einem + komplettiert, sofern das Bein-über-Kopf-Verhalten stattfindet. Es handelt sich um einen Indikator für einen Kletterversuch (Pick & Strauss, 2005). Immer wenn diese Suchschläge auftraten, obwohl danach keine Überquerung stattfand, wurde der Kletterversuch als erfolglos bewertet. Diese von dem gewöhnlichen Laufen abgegrenzten Suchbewegungen erlaubten also eine Quantifizierung der Kletter-Entscheidungen. Das Experiment wurde entwickelt, um motorische Fertigkeiten und die lokomotorische

Kontrolle an einer komplexen Verhaltensweise zu studieren (Triphan et al., 2010). Ein PVC-Kletterblock mit der zu überquerenden Lücke befindet sich auf einer Plattform, die von einem Wassergraben in einer Petrischale umgeben ist (Abbildung 8). Damit der Laufsteg für die Fliege schneller und leichter zu erklimmen ist, befinden sich noch 45° steile Rampen aus Plexiglas an den Enden des Kletterblocks. Wegen des natürlichen Explorationsverhaltens von *Drosophila*, welches bewirkt, dass die Umgebung erkundet wird (z.B. auf der Suche nach Nahrung), kommen im Versuchsaufbau ausreichend Anläufe zustande.



**Abbildung 8: Kletter-Versuchsaufbau**

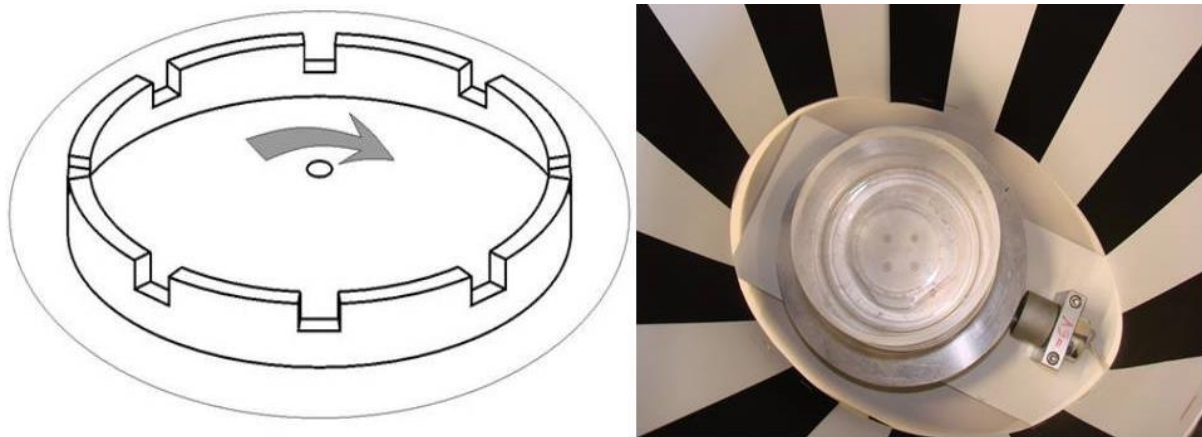
**a:** Ein PVC-Block mit der gewünschten Lückengröße befindet sich in einer Petrischale, welche mit demineralisiertem Wasser gefüllt ist. Durch einen Ausschnitt in dem Pappzylinder kann entweder mittels einer Hochgeschwindigkeitskamera oder direkt per Stereolupe die Fliege während ihrer Aktionen beobachtet werden.

**b:** Abmessungen der PVC-Blöcke mit variierenden Lückenbreiten.

## 2.6 Das Motorische Lernen

In diesem Verhaltensparadigma wurden Fliegen mit gekürzten Flügeln darauf trainiert schneller und erfolgreicher Lücken zu überqueren (Kienitz, 2010). Auf einem 8 Lücken umfassenden Ring mit einem Durchmesser von 70 mm wurde ein einzelnes Individuum für eine Minute pro Durchgang platziert. Ein Wassergraben umzog den Laufring,

welcher die Flucht des Insektes verhindern sollte. Dieser befand sich auf einer Drehscheibe, welche mit 3 Umdrehungen pro Minute rotierte. Eine Fliege musste also exakt 24 Überquerungen absolvieren, um die Rotation komplett auszugleichen. Zwecks einer optomotorischen Stimulation wurde der gesamte Aufbau von einem schwarz-weißen Streifenzyylinder mit einer Raumfrequenz von  $24^\circ$  umrahmt (Abbildung 9). Die Beleuchtung erfolgte mit einer einarmigen Kaltlichtquelle (Schott KL1500). Jedes Versuchstier musste 5 ein-minütige Trainingseinheiten in 20 Minuten Intervallen durchlaufen. Nach 24 Stunden erfolgte ein weiterer Testlauf, um ein motorisches Langzeitgedächtnis zu überprüfen. Die erfolgreichen Überquerungen wurden durch direkte Beobachtung vom Experimentator protokolliert. Die Breite der Lücken bestimmte die Verhaltensweise im ersten Lauf. Das Training wurde nur fortgesetzt, wenn die naive Fliege zwischen 8 und 16 Überquerungen geschafft hatte. Während der Entwicklung des Paradigmas konnte gezeigt werden, dass für die Ausbildung eines motorischen Langzeitgedächtnisses mindestens 50 Überquerungen von Nöten waren. Jedoch musste die Herausforderung in Form der Lückengröße so ausgewählt werden, dass weiterhin Steigerungspotential existierte (Kienitz, 2010). Je nach individueller Körpergröße wurden deswegen Lücken zwischen 2,7 und 3,4 mm getestet.



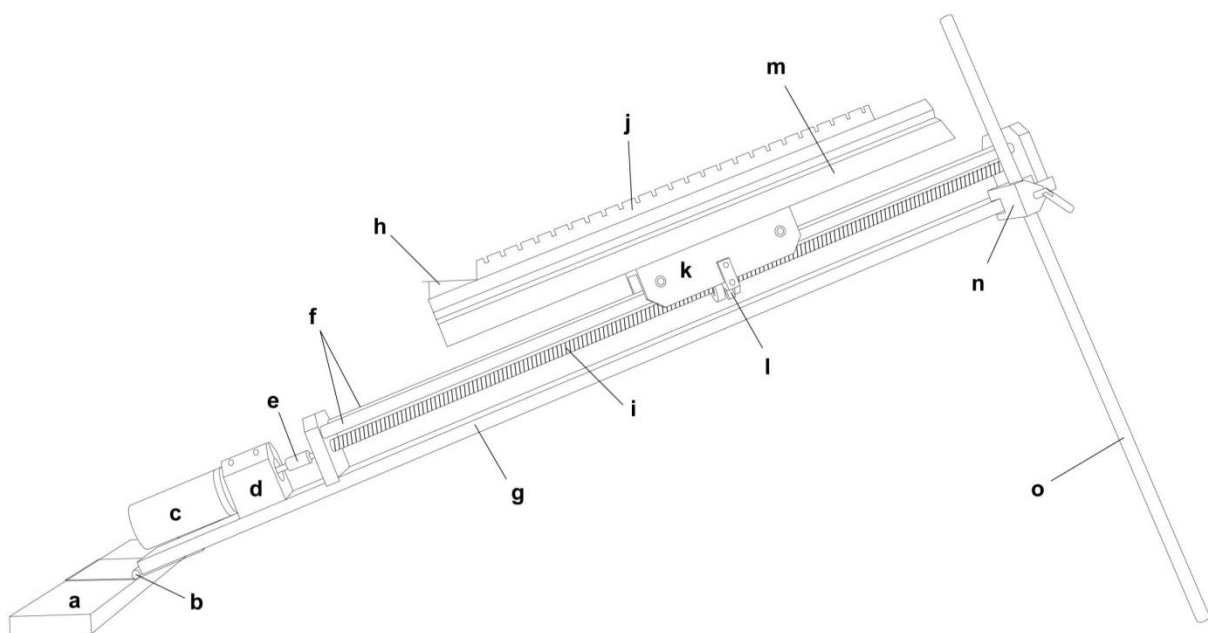
**Abbildung 9: Aufbau für motorisches Lernen an Lücken**

Eine Fliege wird auf einem Ring von 70 mm Durchmesser trainiert. Der Laufsteg befindet sich in einer Höhe von 10 mm, welcher durch 8 gleich breite, 5 mm tiefe Lücken unterbrochen wird. Außerdem befinden sich diese in dem gleichen Abstand zueinander. In Abhängigkeit der Körpergröße der Fliegen können Lückenbreiten von 2,7- 3,4 mm getestet werden. Der gesamte Versuchsaufbau wird umrahmt von einem Streifenzyylinder mit einer Raumfrequenz von  $24^\circ$ .

### 2.6.1 Motorisches Lernen auf einer Kletterschiene

Dieser Versuchsaufbau wurde entwickelt, um die einzelnen Parameter, welche sich für die motorische Verbesserung beim Lückenüberwinden verändern, zu analysieren. Es

entstanden enorme Schwierigkeiten die Fliege dauerhaft im Fokus der Hochgeschwindigkeitskamera zu halten, während sich diese auf dem Ring bewegte. Deswegen wurde eine Lösung bevorzugt bei der die linear angeordneten 24 Lücken über einen Motor wie auf einem Laufband bewegt wurden, sodass die Laufgeschwindigkeit der Fliege mit der des Hindernisses übereinstimmt (Abbildung 10). Dadurch konnte das kletternde Individuum auf Höhe des festen Standpunktes der Kamera gehalten werden. Aufgrund des negativen gravitaktischen Verhaltens wurde eine Schräge von  $20^\circ$  für die Kletterschiene gewählt. Die vierkantige Kletterschiene beinhaltete 24 gleichbreite 5 mm tiefe Lücken mit unterschiedlichen Breiten in den Ausführungen von 2,9 - 3,4 mm in 0,1 mm-Schritten. Wie bei der Durchführung auf dem Ring absolvierte jede Fliege mit gekürzten Flügeln fünf Trainingsdurchgänge in 20 minütigen Abständen und einen Testlauf nach 24h. Im Hintergrund befand sich eine Tapete mit 7 schwarzen- und 7 weißen vertikalen Streifen (3 mm breit, 28 mm hoch). Auf der Höhe des Kameraaufnahmebereichs blieb ein weißes Rechteck (10 mm breit, 7 mm hoch) im Hintergrund frei von Streifen. Die Hochgeschwindigkeitskamera, welche sich auf einem Stativ vor der Kletterschiene befand, wird im nächsten Abschnitt beschrieben. Es wurde die Zeit gemessen bis das Versuchstier am Ende der Kletterschiene angekommen war. Es wurden nur Fliegen trainiert, die im naiven Lauf schon achtmal erfolgreich geklettert hatten.



**Abbildung 10: Versuchsaufbau der Kletterschiene**

In diesem Verhaltensparadigma kann eine Fliege bei der Lückenüberquerung auf der Höhe des Fokus der Hochgeschwindigkeitskamera gehalten werden. Eine Kletterschiene befindet sich auf einem Schlitten, der von einem Motor angetrieben wird. **a:** Sockel, **b:** Scharnier, **c:** 24

V Motor, **d**: Motorbefestigung, **e**: Kupplung, **f**: 2 Schienen aus zylindrischen Edelstahlstangen, **g**: Basisplatte aus Aluminium, **h**: 20° Keil als Platzierungsplateau, **i**: Kurbelwelle aus Edelstahl, **j**: PVC-Kletterschiene, **k**: Schlitten, **l**: Messingring zur Fixierung auf der Welle, **m**: optische Bank, **n**: Schraubzwinde, welche einen zylindrischen Eisenstab (**o**) als Stativ fixiert (Eckert, 2013).

## 2.7 Verhaltensanpassungen an Verletzungen

In diesem Experiment bekamen Taufliiegen mittels einer Iridektomieschere die Segmente eines Mittelbeintarsus entfernt. Die verletzten Individuen wurden 10 Minuten nach der Operation mit einer Hochgeschwindigkeitskamera gefilmt während sie versuchten an einer überquerbaren Lücke zu klettern. Die monochrome Kamera vom Typ Pulnix JAI TM-6740 GE der Firma Stemmer Imaging stellt eine Bildfrequenz von 200 Bildern pro Sekunde zur Verfügung. Sie hat 640 x 480 Pixel bei einer Pixelgröße von 7,4 µm und wird per Ethernet mit dem Computer verbunden. Das eingehende Signal wird mit einer Software namens Common Vision Blox bearbeitet. Ein besonderes Werkzeug dieser Software, CVB Movie diente der Aufnahme der Filme als AVI-Dateien. Die Kamera war mit einem Makroobjektiv der Firma Jos. Schneider Optische Werke GmbH (Variogen 1,8/ 12,5-75) bestückt. Anhand der resultierenden Videosequenz wurden in dem Programm ImageJ die Bewegungen des lädierten Beins verfolgt und somit eine Laufspur visualisiert. An dem folgenden Tag wurde dasselbe Tier abermals mit der Lücke konfrontiert, um eine mögliche Anpassung an den verletzten Körperzustand zu dokumentieren. Zusätzlich zu den Laufspuren wurden die Erfolgsraten der Kletterversuche verglichen.

## 2.8 Histologie

Die getesteten Strukturmutanten-Linien wurden nach den Verhaltensexperimenten in neuroanatomischen Präparaten untersucht, um die Grobmorphologie der prominenten Neuropile im Gehirn zu analysieren. Es wurden sowohl Paraffinschnitte, als auch neuroanatomische Präparate hergestellt.

### 2.8.1 Paraffinschnitte nach der Autofluoreszenzmethode

Die 7 µm dünnen Gehirnschnitte wurden nach der Kragenmethode angefertigt (Heisenberg & Böhl, 1979). Es wurden immer zehn Individuen (ein weißäugiges



Markertier, zwei Wildtypen, ein baräugiges Markertier und sechs Fliegen der jeweiligen Mutantenlinie) auf einen Kragen gefädelt. Hierzu werden die herunter gekühlten und somit betäubten Fliegen am Flügelansatz mit einer Feinpinzette gegriffen, um sie am Thorax in den Spalt des Kragens zu schieben. Nach dieser "Beladung" erhalten die Krägen eine vierstündige Carnoy-Fixierung (30ml Ethanol, 15ml Chloroform, 5ml Eisessig). Anschließend werden sie zweimal für jeweils 30 Minuten in Ethanol (98%) überführt, um die Flüssigkeit aus dem Gewebe der Fliegen zu entziehen. Die Behandlung wird mit Ethanol-Trocken für eine Stunde fortgesetzt. Anschließend werden die Krägen mindestens über Nacht und bis hin zu einer Woche im Intermedium Methylbenzoat aufbewahrt. Alle bisherigen Schritte erfolgen bei Zimmertemperatur. Die folgenden Schritte werden in einem Wärmeschrank bei 64°C durchgeführt. Nach einem 50%-igen Methylbenzoat-Paraffin-Gemisch-Zwischenschritt für eine Stunde werden die Krägen achtmal über 20 Minuten mit Paraffin inkubiert, um abschließend in einer Silikonform in Blöcke gegossen zu werden. Die ausgehärteten Paraffinblöcke werden mit einer Rasierklinge abgesprengt, wodurch die Fliegenköpfe im Paraffin verbleiben und die Körper im Kragen verworfen werden. Ein Trimmen der Blöcke erfolgt an der Kopfreihe, um sie an einem Mikrotom in 7 µm dünne Schnitte zu schneiden und auf einen mit Eiweißglycerin bestrichenen Objektträger zu überführen. Die Schnitte werden bei 60° C mit Xylol entparaffiniert und zur Konservierung mit Entellan eingedeckelt. Aufgrund der Eigenfluoreszenz durch den Augenfarbstoff konnten die Schnitte an einem UV-Lichtmikroskop Olympus BX-FLA ausgewertet und mit einer Digitalkamera fotografiert werden. Die Zellkörper fluoreszieren gelblich, das Neuropil grünlich.

### **2.8.2 Immunhistologische Färbung ganzer adulter *Drosophila*-Gehirne**

Die Fliegengehirne wurden in eisgekühltem PBS (Tabelle 1) aus der Kopfkapsel mittels jeweils einer Feinpinzette in jeder Hand präpariert. Anschließend wurde das Gehirn von dem Rüssel, Luftsäcken und Tracheen befreit. Die Fixierung erfolgte in 4-prozentigem Paraformaldehyd-PBS-Gemisch für 30 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (RT) und abermals in 4-prozentigem Paraformaldehyd-Gemisch, allerdings wurde dieses mit 0,3 % PBT angesetzt. Es folgten Waschungen der Präparate in 0,5 %iger PBT-Lösung zunächst 2-mal für 5 Minuten, danach 3-mal für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde das Gewebe mit 4 %igem Pferdeserum- 0,3% PBT-Gemisch für eine Stunde geblockt, um eine unspezifische Bindung mit der anschließenden Antikörperreaktion zu verhindern. Dieser primäre Antikörper (Anti-GFP

aus chicken IgY der Firma Aves, 1:3000) inkubierte in 4 prozentigem Pferdeserum-PBT-Gemisch für 48h bei 4°C. Nach dieser Prozedur wurde erneut in 0,5%igem PBT für 2-mal 5 min und für 6-mal 20 min bei RT gewaschen. Nach dem 30 minütigen Blocken folgte eine weitere Immunreaktion für 48h mit dem sekundären Antikörper (Goat Anti-Chicken IgY H & L Alexa Fluor 488 der Firma Invitrogen, 1:2000) in dem Pferdeserum-PBT-Gemisch bei 4°C. Zuletzt erfolgten die gleichen Waschschriffe wie nach der Inkubation des primären Antikörpers mit dem Unterschied, dass zusätzlich zwei Mal für fünf Minuten in PBS gewaschen wurde, bevor die Gehirne in 1:1 PBS-Glycerin mindestens 12 h absinken sollten, um in Vectashield auf Objektträger übertragen zu werden. Als Abstandhalter dienten 2 mit Nagellack fixierte Deckgläschen. Zwecks Herstellung eines Dauerpräparates wurde das abschließende Deckglas ebenfalls mit Nagellack umrandet. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Leica SP8 Laser-Mikroskops und der Bedienungssoftware LAS AF Lite. Es wurden die Objektive Leica HC PL APO 20x/0,75 IMM CORR CS2 und Leica HC PL APO 40x/1,30 OIL CORR CS2 mit dem Leica Type F Immersion Liquid verwendet. Das Übereinanderlegen der Z-Projektionen erfolgte nach maximaler Intensität in der Software ImageJ.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Standardlösungen**

<b>Lösung</b>	<b>Konzentration</b>
PBS (pH 7,4)	3,8 g NaCl / 0,625 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 0,207 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 500 ml H <sub>2</sub> O
PBT 0,1%	5 ml 10%ige Triton X-11-ddH <sub>2</sub> O (Merck) in 500 ml PBS

## 2.9 Fliegenstämme

Es wurden sowohl die wildtypischen Stämme Canton-Spezial (CS) als auch Wildtyp-Berlin (WTB) als Kontrollen verwendet, da die getesteten Lern- bzw. Strukturmutanten jeweils auf einem der beiden genetischen Hintergründe basierten. In der folgenden Tabelle 2 wurden alle für diese Dissertation verwendeten Fliegen-Linien aufgelistet. Die Stämme stammten entweder aus der Mainzer Sammlung, wurden in Bloomington (BL) bzw. Wien (VDRC) bestellt oder kamen von einer anderen Arbeitsgruppe.

**Tabelle 2: Herkunft der verwendeten Fliegenlinien**

<b>Stämme</b>	<b>Chromosom</b>	<b>Donor</b>
Wildtyp CS	Laborwildstamm	Strauss (JGU Mainz)
Wildtyp Berlin	Laborwildstamm	Strauss (JGU Mainz)
<i>amnesiac</i> [1] / FM7a	X	BL5954
<i>CrebB</i> [S162]	X	BL4720
<i>dunce</i> [1]	X	Strauss (JGU Mainz)
<i>homer</i> [R102]	II	BL9564
<i>ocelliless</i> [1] XattX	X	Strauss (JGU Mainz)
<i>pka-C1</i> [H2] / CyO	II	BL4101
<i>rutabaga</i> [1]	X	Strauss (JGU Mainz)
<i>rutabaga</i> [2080]	X	Strauss (JGU Mainz)
<i>leonardo</i> [P1375] / CyO	II	BL9403
<i>leonardo</i> [2-3] / CyO	II	BL9573
<b>Treiberlinien</b>		
007Y-GAL4	III	BL30812
201Y-GAL4	II	BL4440
210Y-GAL4	III	Poeck (JGU Mainz)
217YY-GAL4	III	Poeck (JGU Mainz)
c305a-GAL4	II	BL30829
c309-GAL4	II	BL6906
c739-GAL4	II	BL7362
H24-GAL4	III	BL51632
Hsp70-GAL4	III	BL1799
mb247-GAL4	III	Heisenberg (JMU Würzburg)
NP2320-GAL4	II	Poeck (JGU Mainz)
OK107-GAL4	IV	BL854
R55G08-GAL4	III	BL50422
R65A06-GAL4	III	BL39330
R73D06-GAL4	III	BL46692
Tub-GAL80 [ts]	II	BL7108
Tub-GAL80 [ts]	III	BL7018
<b>Effektorlinien</b>		
<i>dnc</i> [1] ; UAS- <i>dnc</i> [+] / Cyo	X; II	Schwaerzel (FU Berlin)
<i>rut</i> [1] / Fm7a;; UAS- <i>rut</i> [+] / TM3, Sb	X; III	Heisenberg (JMU Würzburg)
<i>rut</i> [2080] ; UAS- <i>rut</i> [+]	X; II	BL9405
UAS-AC39E [RNAi]	III	BL28626
UAS-ACACC [RNAi] (CG43373)	II	VDRC102057KK
UAS-ACCG32305 [RNAi]	II	VDRC101103KK
UAS-AC76E [RNAi]	II	VDRC106232KK
UAS-AC78C [RNAi] / CyO	II	VDRC51978GD
UAS-AC35C [RNAi]	II	VDRC110750KK
UAS-ACXA [RNAi]	II	VDRC104283KK
UAS-ACXB [RNAi]	II	VDRC104248KK
UAS-ACXD [RNAi]	III	BL35589
UAS-CREB [17a]	III	BL9232
UAS-d-CREB [2-b]	X	Davis (Stanford University)
UAS- <i>dnc</i> [RNAi]	II	VDRC107967KK

UAS-mCD8::GFP	II	Poeck (JGU Mainz)
UAS-PDE1c [RNAi]	III	BL28728
UAS-PDE6 [RNAi]	III	BL25828
UAS-PDE8 [RNAi]	II	VDR101413KK
UAS-PDE9 [RNAi]	III	BL32412
UAS-PDE11 [RNAi]	III	BL34611
UAS- <i>PKA-C1</i> [RNAi]	II	VDR101524KK
UAS- <i>PKA-R1</i> [RNAi]	II	VDR103720KK
UAS- <i>PKA-C1</i> [F5.9] /Tm3, Sb	III	Kalderon (Columbia N.Y.)
UAS- <i>PKA-C3</i> [RNAi]	III	Kalderon (Columbia N.Y.)
UAS- <i>rut</i> [RNAi]	III	VDR5569GD
UAS-CD4-tdGFP / CyO	II	BL35839

## 2.10 Kreuzungen

Es wurden Kreuzungen mit GAL4-Treiberlinien und UAS-Effektorlinien angesetzt, um Gehirn-Kartierungen mittels partieller Rettungen, Überexpressionen und RNA-Interferenzen durchzuführen. Pro Ansatz wurden 20 jungfräuliche Weibchen aus den jeweiligen Fliegenstämmen unter Kohlendioxid-Anästhesie gesammelt und mit mindestens 5 männlichen Fliegen zusammengebracht. Die Aufzucht erfolgte bei 25°C in 81mm hohen Futtergläsern. Die Konstrukte, welche Temperaturschalter wie GAL80<sup>ts</sup> oder Hsp70 enthielten, erforderten eine Aufzucht bei 17°C. Nach fünf Tagen wurde die Parentalgeneration entfernt, um sicherzustellen, dass alle adulten Tiere aus der F1-Generation stammten.

## 2.11 Statistik

Die Rohdaten wurden mithilfe des Programmes Microsoft Excel 2007 ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte in Statistica 8.0 (2007). Die Daten wurden mittels der Tests Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors und Shapiro-Wilk's W auf Normalverteilung getestet. Wenn die Überquerungen, als auch die erfolglosen Versuche nicht normalverteilt waren, wurde der Mann-Whitney U Test für die Signifikanz-Berechnungen verwendet. Es konnten nicht alle Datensätze zur gleichen Zeit alternierend getestet werden, deswegen wurde der Kruskal-Wallis-Test für Multiple Vergleiche verwendet. Dieser basiert auf Medianen und berechnet post-hoc-Wahrscheinlichkeiten für einen zweiseitigen Signifikanztest auf Grund multipler Vergleiche der mittleren Ränge für jedes Paar von Gruppen. Da die Vorderbeinlängen jedoch normalverteilt waren, wurden diese mit

dem ungepaarten Student'schen t-Test verglichen. Wenn der Lernerfolg derselben Individuen überprüft werden musste, wurde bei Normalverteilung der gepaarte Student'sche t-Test verwendet und für nicht parametrische Verfahren der Wilcoxon's W-Test. In den Medianen Häufigkeitsdarstellungen werden die signifikanten Unterschiede mit Sternchen dargestellt (\*: signifikant, \*\*: hoch signifikant, \*\*\*: höchst signifikant, n.s. nicht signifikant).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Das Kletterverhalten

Wenn flügellose Fliegen mit einer Lücke konfrontiert werden, lassen sich verschiedene komplexe Verhaltensweisen analysieren. Auf das visuelle Vermessen der vor ihnen liegenden Lücke folgt ein Entscheidungsprozess, ob sie einen Kletterversuch starten wollen. Es gibt erfolgreiche Überquerungen, erfolglose Versuche und das Verlassen der Lücke ohne einen Kletterversuch. Ein Versuch wird dadurch definiert, dass die Fliegen anlaufen und die Vorderbeine tastend nach vorne strecken, um die andere Seite der Lücke zu erreichen. Das „Bein-über-Kopf-Verhalten“ wurde als Indikator für einen Kletterversuch gewertet, da es im normalen Laufverhalten nicht vorkommt. Durch die Suchschläge mit den Beinen lassen sich also die Entscheidungen quantifizieren. An unüberwindlich breiten Lücken kehren die Fliegen ohne ein solches „Bein-über-Kopf-Verhalten“ um oder sie laufen in die Lücke hinein, um sie zu durchschreiten. Eine Lückenbreite, die größer als 4 mm ist, kann von *Drosophila melanogaster* praktisch nicht überklettert werden (1%-ige Chance bis maximal 4,3 mm). An dieser gerade noch oder nicht mehr überwindbaren Lückenbreite finden die meisten erfolglosen Kletterversuche statt (Pick & Strauss, 2005). Je größer die Lückenbreite wird, desto seltener kommt es noch zu Kletterversuchen. Diese energieaufwendigen, motorisch komplexen Bewegungsabläufe werden von wildtypischen Fliegen nicht sinnlos initiiert. Die individuelle Körpergröße wird bei der Entscheidung zu Klettern in Betracht gezogen (Krause, 2009). Mit den folgenden Versuchen sollen die Fragen beantwortet werden auf welche Weise diese adaptive Anpassung gelernt wird, wo im Zentralnervensystem das Verarbeitungszentrum liegt und über welche biochemischen Prozesse diese Plastizität erreicht wird. Abschließend wird zur Diskussion gestellt, ob ein Körperzustandsgedächtnis bei Insekten existiert.

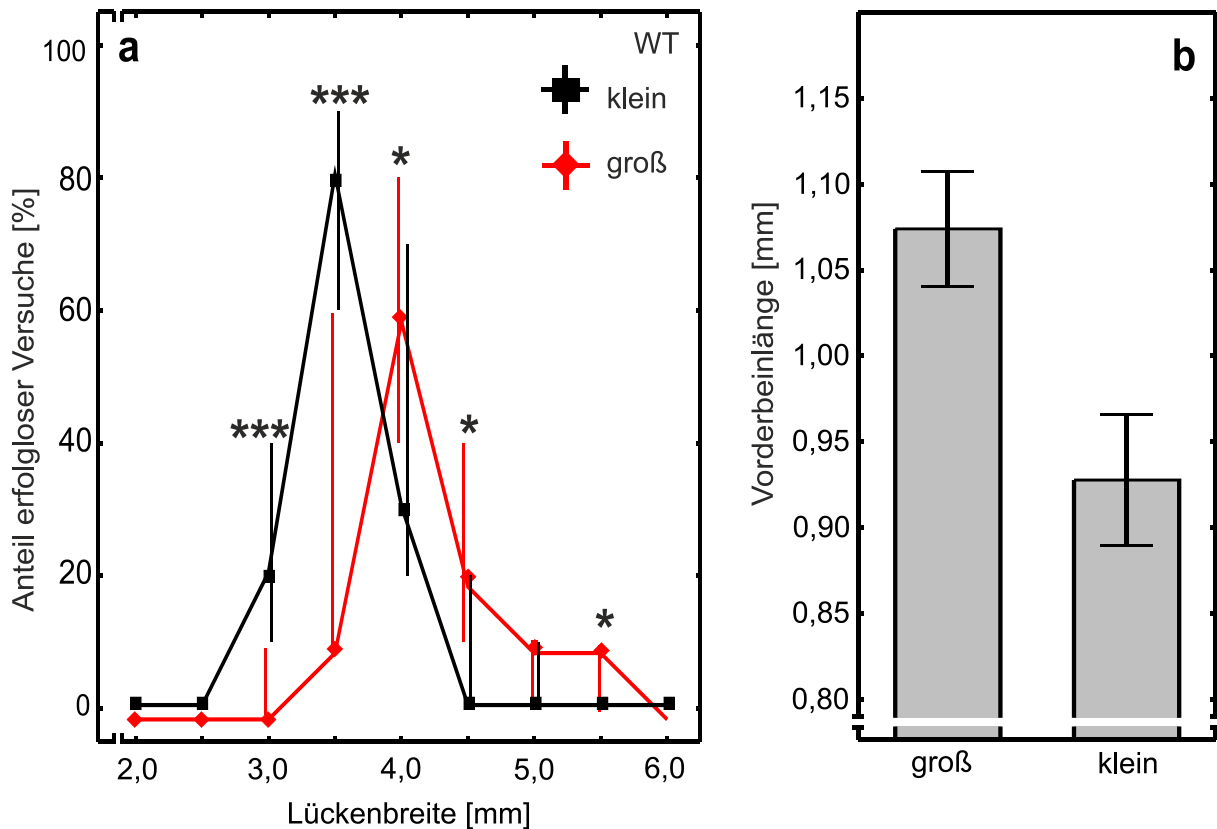
#### 3.2 Gewählte Darstellungsformen

Die Häufigkeit der Aktionen an der Lücke war selten normalverteilt, weswegen diese mit medianen Boxplots dargestellt wurden. Die Boxen zeigen die 25%- und 75%-Quartile der Verteilung an, während ein Quadrat in der Box den Medianwert darstellt. Die Fehlerbalken beschreiben 5 %- und 95 %-Perzentile der Daten. Ausreißer und Ext-

remwerte wurden nicht grafisch dargestellt. Die Vorderbeinlängen waren normalverteilt, weswegen sie in Säulendiagrammen mit Standardabweichung dargestellt wurden.

### 3.3 Das wildtypische Kletterverhalten

Aus der breiten wildtypischen Canton Spezial- (CS) Population wurde per Augenmaß auf Größenunterschiede selektioniert, um sie in die Klassen „groß“ und „klein“ einzuordnen. Diese beiden verschiedenen Gruppen wurden mit unterschiedlich breiten Lücken konfrontiert. Dabei stieg die Breite in 0,5 mm Schritten von 2,0 mm bis 6,0 mm an. Die geringe Breite von 2,0 mm stellt für eine durchschnittliche *Drosophila melanogaster* keine stärkere Herausforderung als die eines großen Schritts dar. Die größte getestete Breite von 6,0 mm entspricht hingegen einer unüberwindlichen Spalte. Fliegen versuchen Lücken zu überqueren, welche breiter als ihre maximale Schrittlänge sind. Während des Anlaufs wird die Größe des Hindernisses mittels Parallaxenverschiebungen auf der Retina eingeschätzt. Wenn die Lücke unüberwindlich erscheint, wird kein Überquerungsversuch initiiert (Pick & Strauss, 2005). Kleinere Fliegen kehrten an Lückenbreiten um, die von größeren Individuen durchaus noch probiert wurden. Die nachträgliche Vermessung der Vorderbeine bewies einen 14 prozentigen Größenunterschied zwischen den eingeteilten Fliegen. Ein durchschnittliches „großes“ Vorderbein wies eine Länge von 1,07 mm auf, während ein durchschnittliches „kleines“ Vorderbein 0,93 mm lang war (Abbildung 11). Die kleinen wildtypischen CS-Männchen versuchten erheblich weniger häufig die 4,0 mm breite Lücke zu überwinden (mediane Häufigkeit erfolgloser Versuche = 30 %) als ihre größeren Artgenossen desselben genetischen Hintergrunds (medianer Anteil = 60 %). An der unüberwindbaren 4,5 mm breiten Spalte zeigten die kleinen Individuen überhaupt keine Suchschläge. Die großen Fliegen hingegen versuchen noch mit einer medianen Häufigkeit von 20 % diese zu überschreiten. An der zwar überquerbaren 3,5 mm Lücke, welche jedoch eine motorische Herausforderung darbietet, konnte ein größenbedingter Vorteil aufgezeigt werden. Die kleineren Fliegen liefen mit einer Häufigkeit von 80 % höchst signifikant erfolgloser als ihre größeren Artgenossen. Diese absolvierten nämlich nur bei 10 % der Anläufe einen erfolglosen Kletterversuch. Die entstehende Kurve des Datensatzes der kleinen Exemplare verschiebt sich im Vergleich zu der Kurve großer Männchen in die Richtung schmaler Lücken. Diese erstaunlichen Ergebnisse zeigten auf, dass wildtypische Fliegen ihre individuelle Reichweite einschätzen können.



**Abbildung 11: CS-Männchen an unterschiedlichen Lückenbreiten**

**a:** Vergleich besonders großer und kleiner Fliegen hinsichtlich ihrer Kletterversuche. Die schwarze Kurve verbindet die mediane Häufigkeit erfolgreicher Versuche der kleinen Individuen, während die rote Kurve das Kletterverhalten der großen Tiere abbildet. Pro Lückenbreite kletterten jeweils 15 kleine bzw. 15 große Fliegen desselben Genotyps. Die einzelne Fliege hatte 10 Anläufe zu absolvieren. Die Daten der kleinen Fliegen (schwarz) sind zur besseren Darstellung um 1 % nach oben verschoben; die Kurve der großen Fliegen ist um 1 % nach unten verschoben. Die Fehlerbalken liegen zwischen den 25 % bis 75 % Quartilen. Die signifikanten Unterschiede werden mit Sternchen dargestellt: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

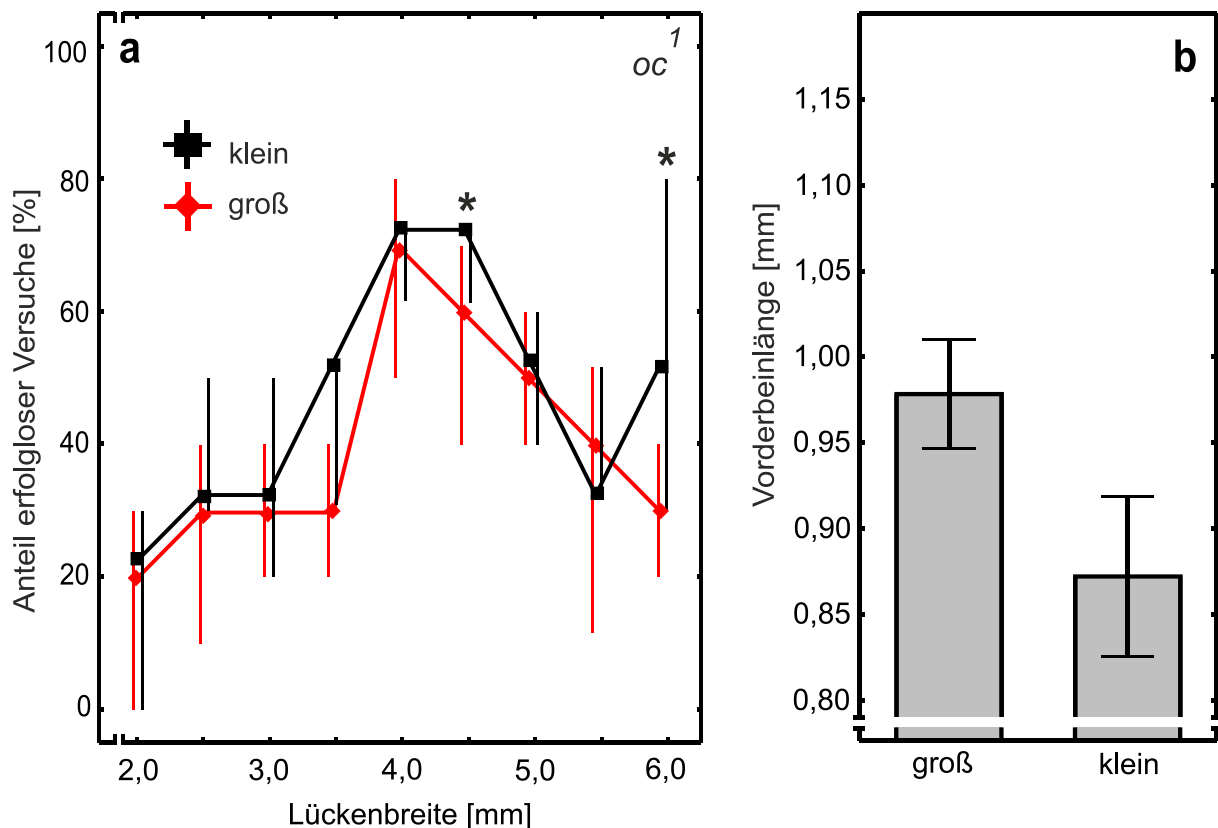
**b:** Größenkontrolle der post mortem vermessenen Vorderbeine.  $N = 75$ . Säulendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichung. Der Größenunterschied liegt bei 15,8 %.

### 3.4 Das Kletterverhalten der Strukturmutanten *ocelliless*<sup>1</sup>-Fliegen

Adulte Fliegen, welche die Strukturmutation *ocelliless*<sup>1</sup> (*oc*<sup>1</sup>) tragen, weisen eine unterbrochene Protocerebralbrücke im Zentralhirn auf. Es sind nur noch die beiden äußeren Glomeruli vorhanden (Abbildung 13). Allerdings wird eine intakte PB benötigt, damit die Fliege mittels der visuellen Information die gegenüberliegende Seite der Lücke zielgerichtet erreichen kann (Hirth et al., 1995; Triphan et al., 2010). In der Tat führte dieser Strukturdefekt zu einer geringeren Überquerungsrate an überwindbaren Lücken. Es stellte sich anschließend die Frage ob dieses Neuropil ebenfalls bei der Körpergrößeneinschätzung eine Rolle spielt. Deswegen wurden große und kleine *oc*<sup>1</sup>-



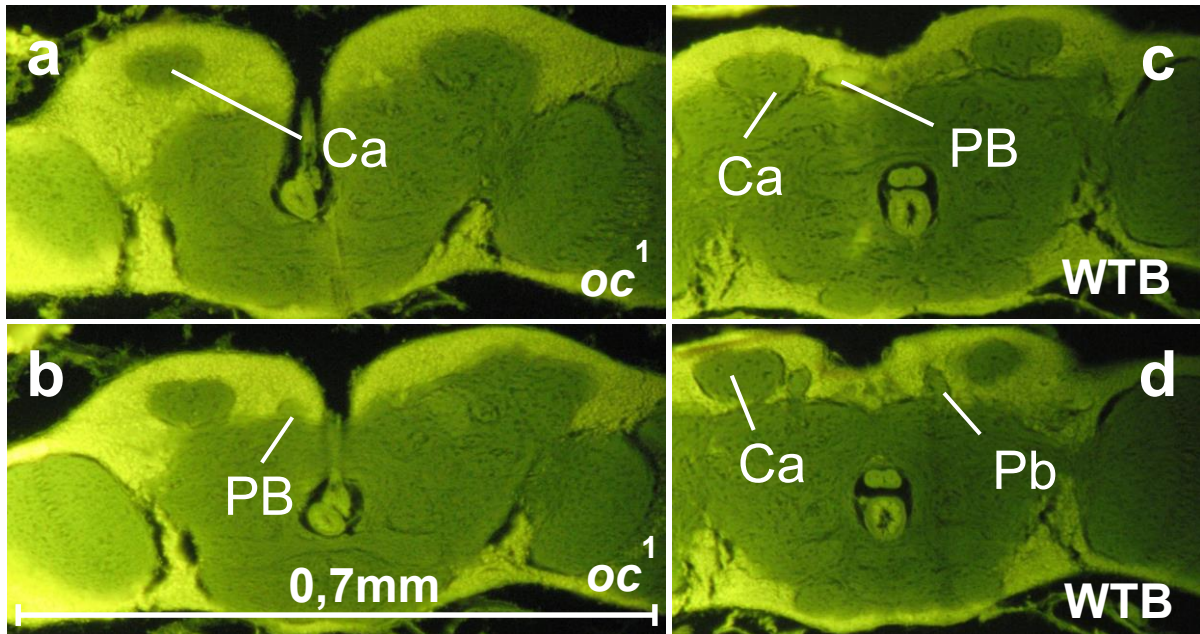
Männchen mit unterschiedlich breiten Lücken konfrontiert. Die nachträgliche Beinvermessung ergab einen höchst signifikanten Größenunterschied zwischen den *oc<sup>1</sup>*-Fliegen von 12,2 %. Das durchschnittliche Vorderbein der großen Exemplare hatte eine Länge von 0,98 mm, während das der kleinen Fliegen nur 0,87 mm aufwies (Abbildung 12b). Bei den wildtypischen Männchen waren an den geringen Lückenbreiten 2,0 und 2,5 mm alle Versuche erfolgreich (Abbildung 11a). Unabhängig von der individuellen Größe der getesteten *oc<sup>1</sup>*-Fliegen traten an der schmalen 2,0 mm-Lücke erfolgreiche Versuche mit einer Häufigkeit von 20 % auf (Abbildung 12a). Es gab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der erfolglosen Versuche zwischen den kleinen und den großen Fliegen an den unüberwindlichen Lücken 5,0 und 5,5 mm. Die 5,0 mm breite Spalte wurde sowohl von den kleinen als auch von den großen Exemplaren mit einer medianen Häufigkeit von 50 % erfolglos versucht. Bei den wildtypischen Männchen traten ab dieser Breite nahezu keine Kletterbemühungen mehr auf (Abbildung 11a). Selbst die größte Lückenbreite im Experiment (6,0 mm) wurde von den kleinen *oc<sup>1</sup>*-Männchen noch zu 50 % versucht. Die großen Individuen versuchten diese Lückenbreite mit 30 % etwas weniger häufig. Es lässt sich schlussfolgern, dass der PB-Strukturdefekt in einer defizitären Körpergrößeneinschätzung resultiert. *oc<sup>1</sup>*-Fliegen besitzen keine Kenntnis über ihre Körperreichweite.



**Abbildung 12:** *ocelliless<sup>1</sup>*-Männchen an unterschiedlichen Lückenbreiten

**a:** Vergleich besonders großer und kleiner *oc*<sup>1</sup>-Fliegen hinsichtlich ihrer Kletterversuche. Die schwarze Kurve verbindet die medianen Häufigkeiten erfolgloser Versuche der kleinen Individuen, während die rote Kurve das Kletterverhalten der großen Tiere abbildet. Pro Lückenbreite liefen jeweils 15 kleine bzw. 15 große Fliegen desselben Genotyps. Konventionen wie in Abbildung 11.

**b:** Größenkontrolle der post mortem vermessenen Vorderbeine. N= 75. Säulendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichung. Der Größenunterschied liegt bei 12,2 %.



### Abbildung 13: Frontale Paraffinschnitte männlicher *oc*<sup>1</sup>- und WT-B-Fliegen

Die 7µm Schnitte wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop fotografiert. Der Augenfarbstoff sorgt dafür, dass Zellkörper in gelber Tönung und neuropile Strukturen als grüne Färbung erscheinen.

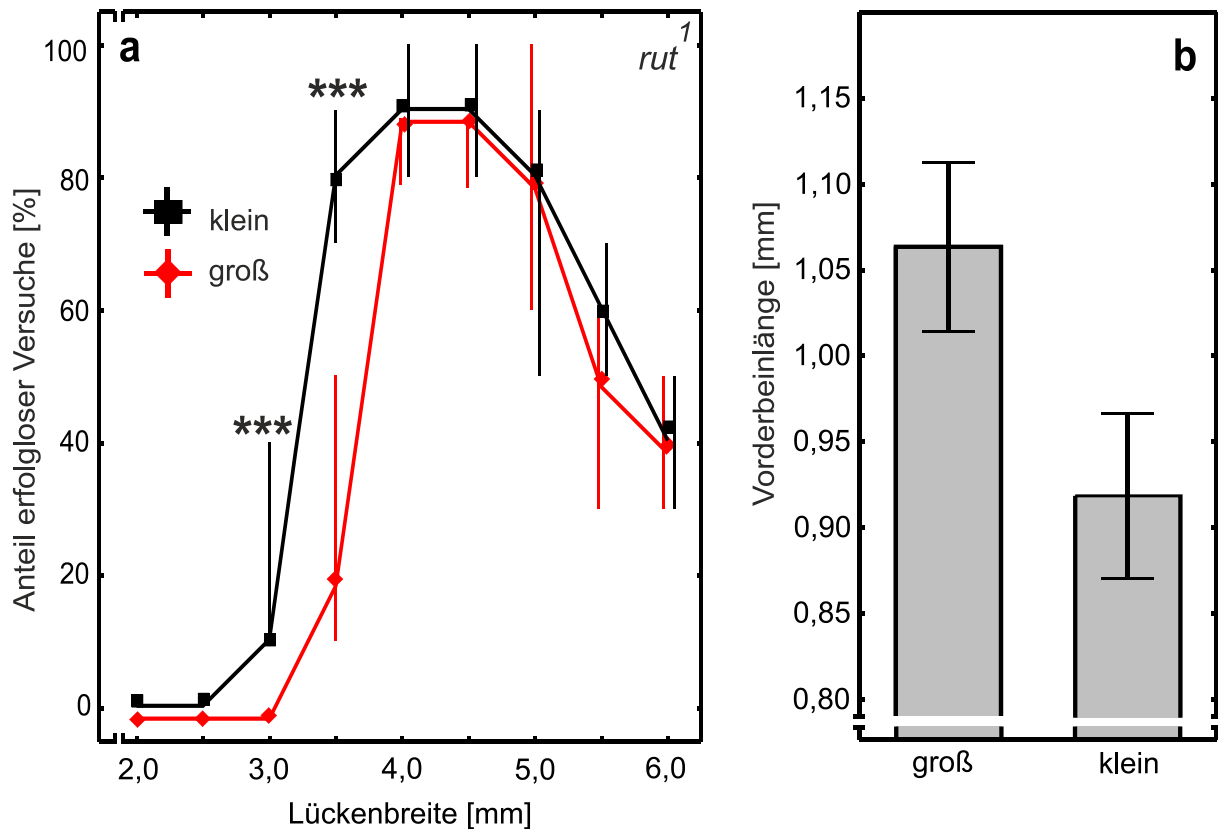
**a&b:** *oc*<sup>1</sup>: Die Calices (Ca) der Pilzkörper sind in beiden Ebenen deutlich zu erkennen. Die Protocerebralbrücke (PB) fehlt fast vollständig. Das Protocerebrum ist durch eine Furche median unterbrochen, sodass nur die caudalen Enden der Pb vorhanden sind. Die anderen nicht dargestellten Bereiche des *oc*<sup>1</sup>-Gehirns weisen eine wildtypische Struktur auf.

**c&d:** WT-B (Wildtyp-Berlin): Die beiden Calices und die Protocerebralbrücke zeigen sich in den gewählten Ebenen deutlich. Die Schnitte befinden sich auf demselben Objektträger wie a&b

## 3.5 Das Kletterverhalten lernmutanter *rutabaga*<sup>1</sup>-Fliegen

Fliegen des Stamms *rutabaga*<sup>1</sup> (*rut*<sup>1</sup>) absolvieren die meisten Aufgaben mit einer schlechteren Lern- und Gedächtnisleistung als ihre wildtypischen Artgenossen. Sie haben einen geringeren Lernindex bei der Assoziation eines konditionierten Duftes (Tempel et al., 1983) oder bei der Vermeidung einer aufgeheizten Kammerseite in einem Auswahltest (Wustmann et al., 1996). Die *rut*<sup>1</sup>-Männchen zeigen ebenfalls eingeschränkte Lernleistungen in der konditionierten Balzunterdrückung (Gailey et al., 1984). Die Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch, welcher die Enzymaktivität der Adenylylzyklase lahm legt (Levin et al., 1992). Die Funktion dieses Enzyms

liegt in der Koinzidenzdetektion zwischen dem konditionierten- und dem unkonditionierten Stimulus (Tomchik & Davis, 2009). Es war zu vermuten, dass die *rut<sup>1</sup>*-Fliegen sich beim Körpergrößelernen ebenfalls eingeschränkt verhalten könnten. Besonders kleine und große Exemplare dieser Lernmutationslinie wurden mit unterschiedlich breiten Lücken als Hindernisse konfrontiert (Abbildung 14a). Die nachträgliche Beinvermessung ergab einen relevanten Größenunterschied zwischen den *rut<sup>1</sup>*-Fliegen von 15,9 %. Das durchschnittliche Vorderbein der großen Exemplare hatte eine Länge von 1,06 mm, während das der kleinen Fliegen nur 0,92 mm aufwies (Abbildung 14b). An den schwer überquerbaren, bzw. unüberwindlichen Lücken ab 4,0 mm gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchen der großen und der kleinen *rut<sup>1</sup>*-Fliegen. Da die großen Exemplare an der überwindbaren 3,5 mm breiten Lücken erheblich mehr Überquerungen schafften, hatten sie mit einer medianen Häufigkeit von 20 % höchst signifikant weniger erfolglose Versuche als die kleineren Artgenossen desselben Stammes mit einem Anteil von 80 %. Unabhängig von ihrer individuellen Körpergröße, versuchten wildtypische Fliegen keine Lücken zu überqueren, welche breiter als 5,0 mm waren (Abbildung 11a). Sowohl die großen als auch die kleinen *rut<sup>1</sup>*-Fliegen versuchten diese 5,0 mm breite Lücke mit einer Häufigkeit von 80 % erfolglos zu überklettern. Selbst die 6,0 mm breite Spalte wurde von beiden Gruppen noch mit einem medianen Anteil von 40 % erfolglos versucht. Aus diesem Verhalten ließ sich schließen, dass *rut<sup>1</sup>*-Fliegen ihre individuelle Körperreichweite nicht einschätzen können.



**Abbildung 14: *rutabaga*<sup>1</sup>-Männchen an unterschiedlichen Lückenbreiten**

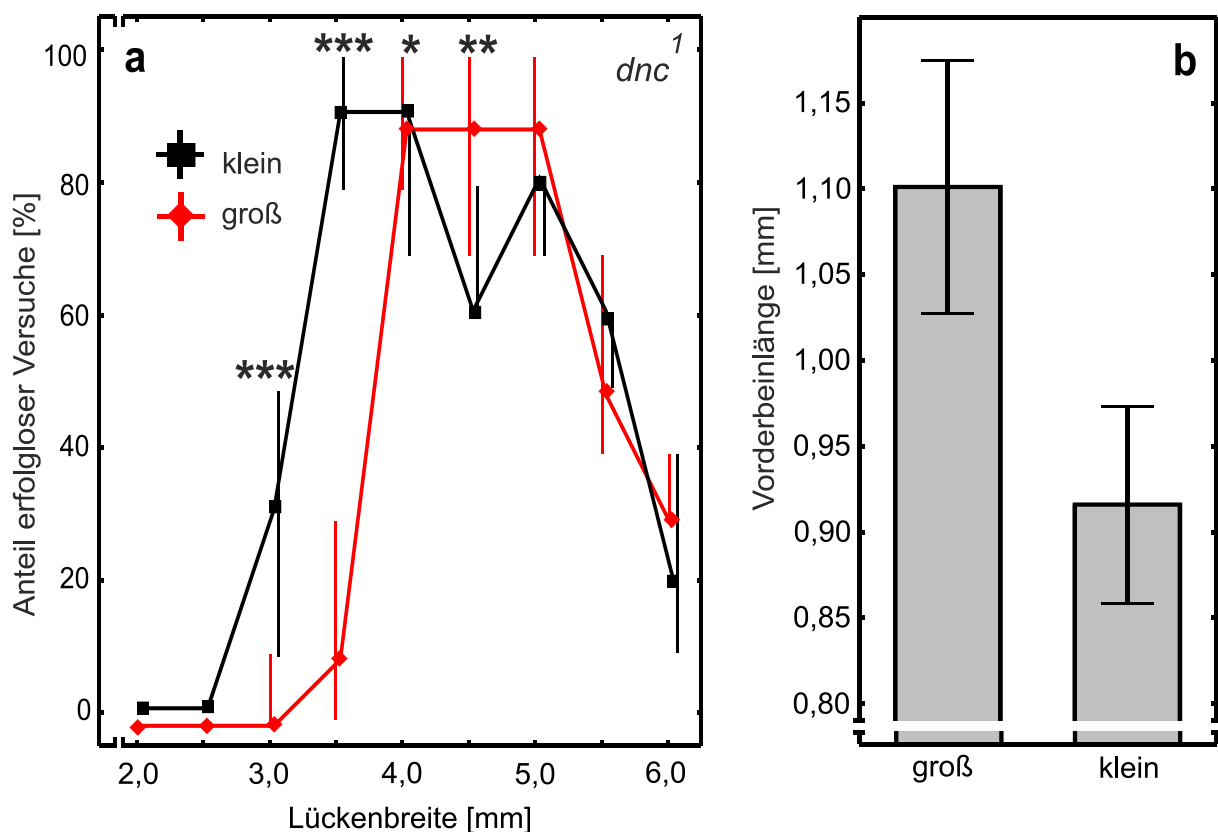
**a:** Vergleich besonders großer und kleiner *rut*<sup>1</sup>- Fliegen hinsichtlich ihrer Kletterversuche. Die schwarze Kurve verbindet die medianen Häufigkeiten erfolgloser Versuche der kleinen Individuen, während die rote Kurve das Kletterverhalten der großen Tiere abbildet. Pro Lückenbreite liefen jeweils 15 kleine bzw. 15 große Fliegen desselben Genotyps. Die einzelne Fliege hatte 10 Anläufe zu absolvieren. Konventionen wie in Abbildung 11.

**b:** Größenkontrolle der post mortem vermessenen Vorderbeine. N= 75. Säulendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichung. Der Größenunterschied liegt bei 15,9 %.

### 3.6 Das Kletterverhalten lernmutanter *dunce*<sup>1</sup>-Fliegen

Ähnlich der im vorherigen Abschnitt beschriebenen *rut*<sup>1</sup>-Linie absolvieren Fliegen des Stamms *dunce*<sup>1</sup> (*dnc*<sup>1</sup>) die meisten Aufgaben mit einer schlechteren Lern- und Gedächtnisleistung als ihre wildtypischen Artgenossen. Sie sind nicht in der Lage die Kombination zwischen einem Elektroschock und einem neutralen Duft zu lernen. Dementsprechend vermeiden sie den mit Bestrafung assoziierten Duft anschließend nicht (Dudai et al., 1976). Die *dnc*<sup>1</sup>-Männchen lassen sich im Gegensatz zu wildtypischen Exemplaren auch nicht durch den Misserfolg bei verpaarten Weibchen balzkonditionieren (Gailey et al., 1984). Die Punktmutation führt zu einer hypomorphen, verringerten Phosphodiesterase-Aktivität (Nighorn et al., 1991). Fliegen dieses Stammes versuchten ebenfalls unüberwindbare Lückenbreiten zu überqueren. Am häufigsten von

den nicht kletterbaren Lücken wurde die 5,0 mm-Lücke probiert. Die kleinen Exemplare probierten diese bei 80 % der Anläufe zu überqueren, während die großen Fliegen sogar in 90 % der Beobachtungen Kletterversuche zeigten (Abbildung 15a). Dieser Größenunterschied von 20,2 % war der stärkste während des gesamten Zeitraums für diese Doktorarbeit (Abbildung 15b). Unabhängig von ihrer Körpergröße versuchten die wildtypischen Individuen nur in Ausnahmefällen unüberwindbare Lücken ab einer Breite von 5,0 mm zu überschreiten (Abbildung 11a). An überkletterbaren Lückenbreiten erwies sich ein wildtypähnliches Verhalten. Auch die großen *dnc*<sup>1</sup>-Männchen nutzten ihren Größenvorteil, um höchst signifikant weniger erfolglos an den überquerbaren Lücken mit einer Breite von 3,0 mm bzw. 3,5 mm zu klettern. Aus dem Verhalten an unüberwindbaren Lücken kann geschlossen werden, dass *dnc*<sup>1</sup>-Fliegen ihre Körperlänge bei einem Kletterversuch nicht in Betracht ziehen.



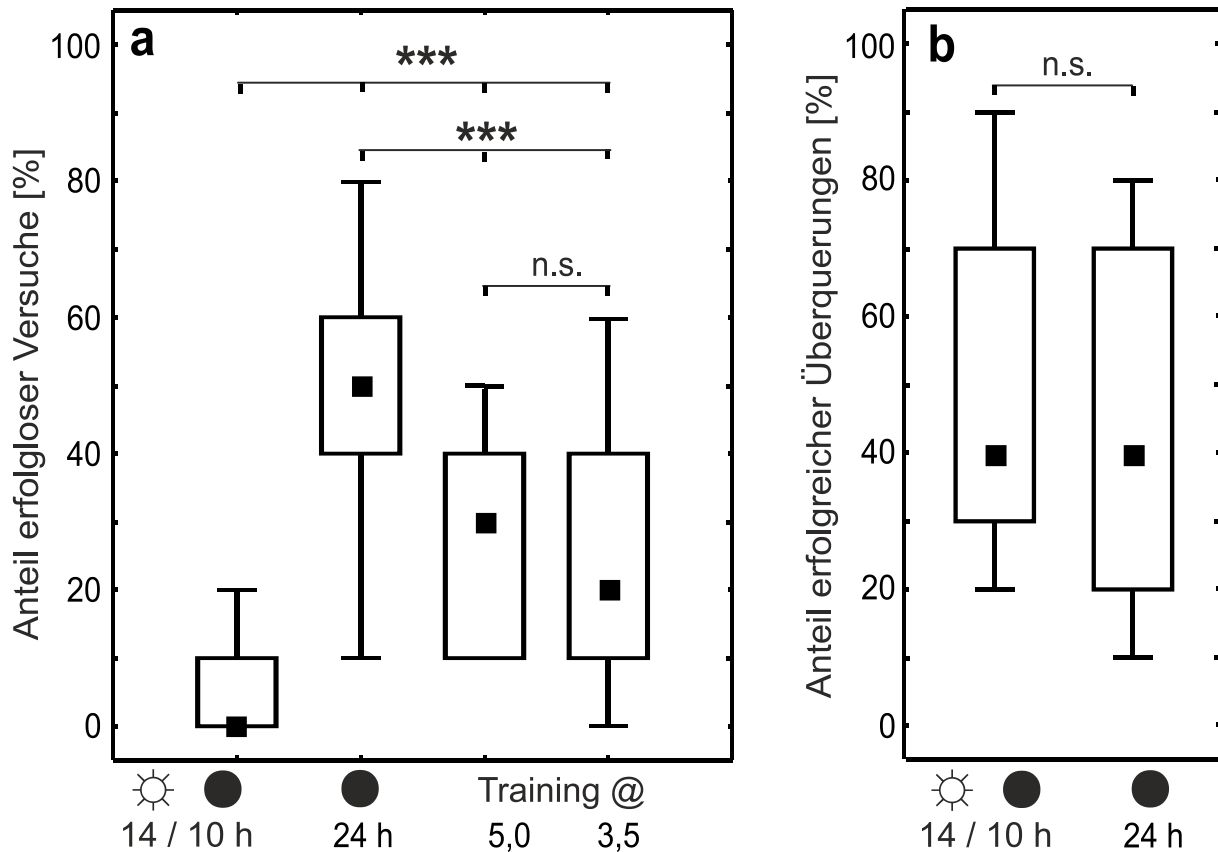
**Abbildung 15: *dunc*<sup>1</sup>-Männchen an unterschiedlichen Lückenbreiten**

**a:** Vergleich besonders großer und kleiner *dnc*<sup>1</sup>-Fliegen hinsichtlich ihrer Kletterversuche. Die schwarze Kurve verbindet die medianen Häufigkeiten erfolgloser Versuche der kleinen Individuen, während die rote Kurve das Kletterverhalten der großen Tiere abbildet. Pro Lückenbreite liefen jeweils 15 kleine bzw. 15 große Fliegen desselben Genotyps. Die einzelne Fliege hatte 10 Anläufe zu absolvieren. Konventionen wie in Abbildung 11.

**b:** Größenkontrolle der post mortem vermessenen Vorderbeine. N= 75. Säulendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichung. Der Größenunterschied liegt bei 20,2 %.

### 3.7 Das Kletterverhalten ohne visuelle Erfahrungen

Es trat die Fragestellung auf, ob die Einschätzung der individuellen Körperreichweite erlernt wird oder genetisch determiniert ist. Das eingeschränkte Verhalten der lernmutanten Fliegen gab Hinweise für ein erlerntes Körpergrößengedächtnis. Es wurde vermutet, dass eine Tauflye, die während ihrer adulten Entwicklungsphase keinerlei Möglichkeiten zu visuellen Erfahrungen hatte, kein Körpergrößengedächtnis besitzt. Dazu wurden wildtypische CS-Fliegen ab der Puppenphase in die vollkommene Dunkelheit überführt. Drei Tage alte männliche, wildtypische Fliegen, welche in der Dunkelheit aufgezogen wurden, versuchten unüberwindliche Lücken zu überqueren (Abbildung 16a). Es traten erfolglose Versuche mit einer medianen Häufigkeit von 50 % auf. Es ergab sich somit ein höchst signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Fliegen, welche unter den normalen Beleuchtungsbedingungen aufgezogen wurden. Diese verschwenden nahezu keine Kletterversuche an der unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke. Die dunkel aufgezogenen Insekten verbesserten sich höchst signifikant, wenn sie nach 10 absolvierten Anläufen an dem Lückenhindernis und einer anschließenden Dunkelphase, am folgenden Tag ein weiteres Mal getestet wurden. Dabei spielte es überraschenderweise keine signifikante Rolle, ob die Erfahrung an einer unüberwindbaren 5,0 mm Lücke (Median = 30 %) oder an einer überquerbaren 3,5 mm breiten Lücke (Median = 20 %) gesammelt wurde. Es wäre denkbar gewesen, dass die Fliegen bei erfolgreichen Überquerungen mehr über ihre Körperreichweite gelernt hätten, als bei dem Anlauf an eine zu breite Spalte. Die dunkel aufgezogenen Fliegen waren an der überwindbaren 3,5 mm breiten Lücke nicht weniger erfolgreich als ihre Artgenossen aus dem Tag-Nacht-Rhythmus. Beide Gruppen schafften Überquerungen mit einer medianen Häufigkeit von 40 % (Abbildung 16b). Der 50 %-Anteil erfolgloser Versuche an der 5,0 mm breiten Lücke von dunkelaufgezogenen CS-Fliegen spricht dafür, dass die Körpergröße mittels visueller Erfahrungen gelernt wird. Die 10 Anläufe als Trainingsmöglichkeiten reichten zwar nicht aus, um genauso wenig erfolglose Versuche wie die Tag-Nacht-Rhythmus-Exemplare zu absolvieren, jedoch verhielten sie sich höchst signifikant erfolgreicher als Fliegen, welche keine visuellen Erfahrungen sammeln konnten. Die Fähigkeit die Körperreichweite einschätzen zu können ist somit nicht angeboren.



### Abbildung 16: Das Kletterverhalten dunkel aufzogener CS-Männchen

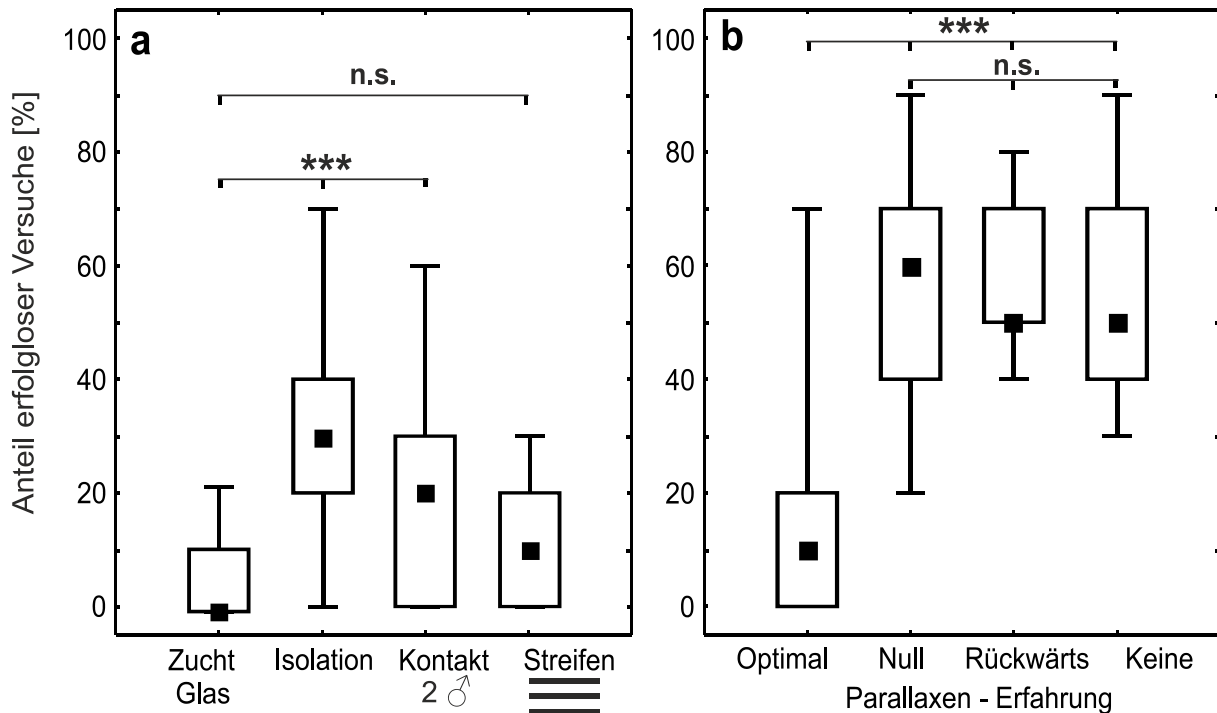
**a:** Vergleich der erfolglosen Versuche wildtypischer CS-Männchen an einer 5,0 mm breiten Lücke mit unterschiedlichen vorherigen visuellen Erfahrungen. Als Kontrolle dient eine Gruppe Fliegen, welche zu Standard Beleuchtungsbedingungen aufgezogen wurde (14 / 10 h). Die nächste Gruppe hatte keine Beleuchtung mehr zur Verfügung ab der Puppenphase bis zum Verhaltensexperiment (24 h). Zwei weitere Gruppen wurden ebenfalls in der Dunkelheit gehalten, hatten aber schon den Tag zuvor eine Trainingserfahrung über 10 Anläufe an einer unüberwindbaren (5,0 mm) oder einer kletterbaren 3,5 mm breiten Lücke. Pro Datensatz: N= 30, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung; die Quadrate repräsentieren den Median; die Boxen zeigen die 25 % - 75 % Quartile; Die Fehlerbalken geben die 5 % - 95 % Perzentile der Verteilung an. Die signifikanten Unterschiede werden mit Sternchen dargestellt: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001.

**b:** Vergleich der erfolgreichen Überquerungen wildtypischer CS-Männchen an einer 3,5 mm breiten Lücke. Die Fliegen, die unter normalen Beleuchtungsbedingungen aufgezogen wurden (14 / 10 h), schaffen nicht signifikant mehr Überquerungen als diejenigen, welche aus der Dunkelheit kommen (24 h). Pro Gruppe: N= 15, n= 10. Darstellung wie in a.

Da das Training an einer Lücke nicht zu einer wildtypischen Körpergrößeneinschätzung geführt hatte, sollte in einem weiteren Verhaltensexperiment die eventuelle Notwendigkeit sozialer Interaktionen für die Bildung eines Körpergrößengedächtnisses überprüft werden. Dazu wurden *Drosophila*-Puppen isoliert und anschließend in schmalen Röhrchen, jedoch unter normalen Beleuchtungsbedingungen, bis unmittelbar vor dem Experiment gehalten. Die isolierten Fliegen, die keine Möglichkeiten zum Sozialkontakt hatten, absolvierten an der 5,0 mm breiten Lücke ähnlich viele erfolglose Versuche wie dunkel aufgezogene Artgenossen. Selbst die Männchen, welche zu zwei weiteren Männchen in Kontakt standen, versuchten mit einer medianen Häufigkeit von

20 % nicht signifikant weniger die 5,0 mm Lücke zu überwinden (Abbildung 17a). Das spricht dafür, dass ein Körpergrößengedächtnis nicht mittels sozialer Kontakte formiert wird. Allerdings absolvierten isolierte Fliegen, die einen schwarz-weißen Streifenzyylinder um das Röhrchen befestigt hatten, kaum erfolglose Versuche. Deren mediane Häufigkeit von 10 % unterschied sich nicht signifikant von dem Kletterverhalten aus einem gängigen Zuchtglas stammender Fliegen. Das Ergebnis, dass im Streifenzyylinder aufgewachsene Fliegen weniger Versuche an unüberwindbaren Lücken zeigten, führte zu einer gewagten Hypothese: Das Körperreichweitengedächtnis könnte über die Eichung zwischen der Schrittlänge und der resultierenden Parallaxenbewegung beim Laufen gebildet werden. Die Überprüfung dieser These schloss ein definiertes Trainingsexperiment an (Abbildung 6). Dunkelaufgezogenen Fliegen wurden definierte Streifenmuster in einer LED-Arena zehn Minuten lang präsentiert (berechnet für den Interommatidien-Winkel einer *Drosophila*, die sich am Mittelpunkt der Arena befindet). Nur die Gruppe, welche das mit 24° „optimale“ Muster als Parallaxen-Erfahrung zur Verfügung hatte, zeigte am darauffolgenden Tag höchst signifikant weniger erfolglose Versuche (mediane Häufigkeit = 10 %) als die dunkel aufgezogenen Fliegen, die keinen visuellen Stimulus präsentiert bekamen (Abbildung 17b). Diese versuchten mit einer Häufigkeit von 50 % die unüberwindbare Lücke zu überschreiten. Sowohl die Männchen, die das Null-Muster, als auch diejenigen, die das Rückwärts-Muster zu visuellen Erfahrungen nutzen konnten, versuchten häufig die 5,0 mm breite Lücke zu klettern (60 % bzw. 50 % der Anläufe). Damit unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant von den Fliegen, die überhaupt keinen visuellen Stimulus zur Verfügung hatten. Das konnte nur bedeuten, dass *Drosophila* das Körpergrößengedächtnis tatsächlich mittels Parallaxen bildet.





**Abbildung 17: Die Größeneinschätzung durch visuelle Trainingsmöglichkeiten**

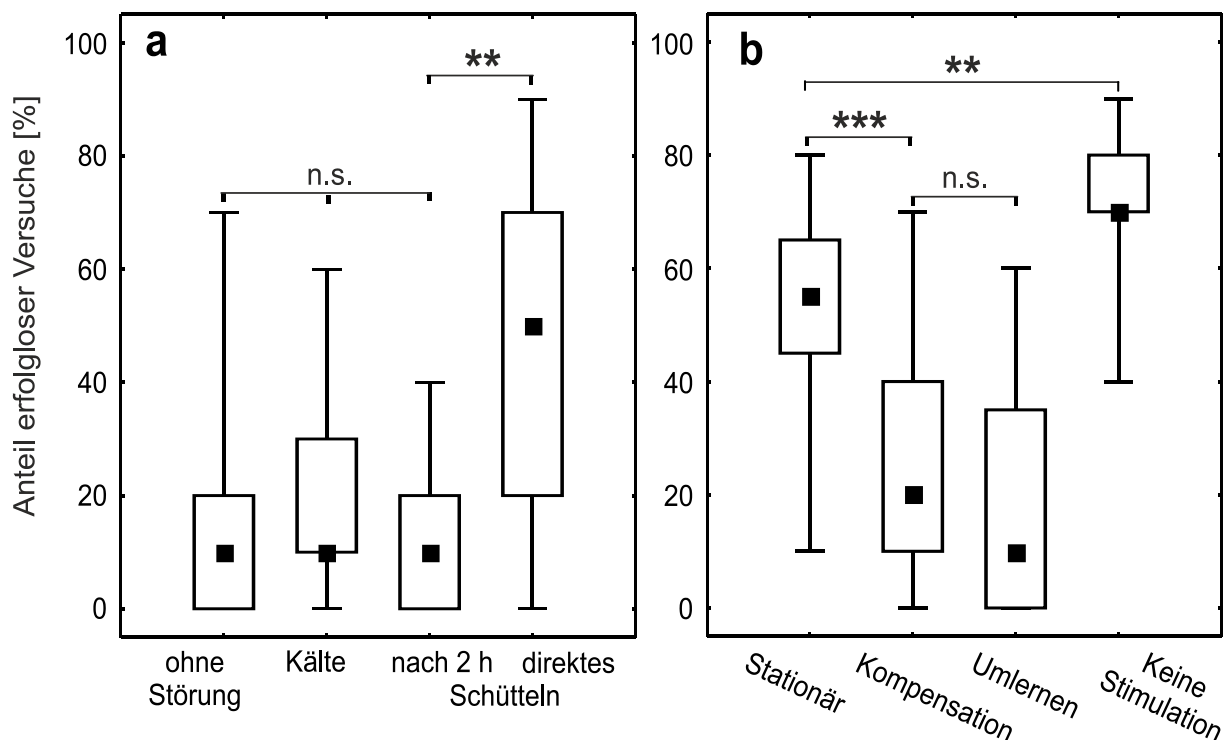
**a:** Vergleich unterschiedlich aufzogener CS-Männchen an einer 5,0 mm breiten Lücke. Als Kontrolle dient eine Gruppe von wildtypischen Fliegen, die in einem standardisierten Zuchtglas aufgezogen wurden. Als „Isolation“ wird eine Gruppe bezeichnet, deren Individuen als Puppen einzeln in schmale Röhrrchen überführt wurden. Andere Fliegen wurden ebenfalls schon ab dem Puppenstadium isoliert, bekamen aber jeweils den „Kontakt“ zu zwei weiteren Männchen. Die letzte Gruppe dieses Vergleichs wurde ebenfalls ab der Puppe in Röhrrchen isoliert, hatte aber über den gesamten Zeitraum ein schwarz-weißes Querstreifenmuster um dieses geklebt. Alle Fliegen wurden unter Zucht- Beleuchtungsbedingungen gehalten. Pro Datensatz: N=30, n=10.

**b:** Vergleich dunkel aufzogener CS-Männchen an einer 5,0 mm breiten Lücke, welchen am vorherigen Tag für 10 Minuten unterschiedliche Streifenmuster in einer LED-Arena präsentiert wurde. Das „Optimal“-Muster hat einen Winkel von 24°; bei dem „Null“-Muster beträgt der Winkel 10° und der „Rückwärts“-Streifenzyylinder wird mit einem 8° Winkel präsentiert. Die Fliegen, die keine Möglichkeit zu Parallaxen-Erfahrungen bekamen, verlassen die Dunkelheit erst unmittelbar vor dem Test an der Lücke. Pro Datensatz: N=15, n=10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

Daraufhin trat die Fragestellung auf wie störungsanfällig die Körpergrößeneinschätzung nach dem Lernen mittels der optimalen Stimulation sei. Es wurden Individuen einzeln in der LED-Arena „optimal“ visuell gereizt und unmittelbar im Anschluss in ein Gemeinschaftsglas überführt, welches auf einem Laborschüttler in der Dunkelheit hin und her rollte. Diese Störung der Konsolidierung dauerte bis zu dem Verhaltenstest an der 5,0 mm breiten Lücke am Folgetag an (Abbildung 18a). Mit einer medianen Häufigkeit von 50 % versuchten diese Fliegen hoch signifikant mehr erfolglose Versuche als die Gruppe, welche ohne Störung in der Dunkelheit gehalten wurde. Diese versuchte mit einer medianen Häufigkeit von 10 % nur selten die unüberwindbare Lücke zu klettern. Die Formierung des Körperreichweitengedächtnisses bedarf somit einer

Konsolidierungsphase. Die Gedächtnisbildung bei der konditionierten Balzunterdrückung kann ebenfalls durch Schlafentzug verhindert werden (Ganguly-Fitzgerald et al., 2006). Weitere Männchen wurden erst zwei Stunden nach der „optimalen“ visuellen Stimulation auf dem Schüttler gestört. Diese wurden ebenfalls bis zu der Beobachtung an der 5,0 mm Lücke am darauf folgenden Tag durchgängig in der Dunkelheit gerollt. Allerdings versuchten diese mit 10 % nicht häufiger die Lücke zu überqueren als die Fliegen ohne Konsolidierungsstörung. Das Körpergrößengedächtnis scheint innerhalb dieser zwei Stunden konsolidiert zu werden ohne den typischen Nachtschlaf zu benötigen. Zusätzlich wurde eine Gruppe männlicher Fliegen eine Minute lang kälteanästhesiert, direkt nachdem sie in der LED-Arena die visuelle Stimulation erhalten hatte. Es traten jedoch mit 10 % erfolglosen Versuchen keine signifikanten Unterschiede zu dem Verhalten der Fliegen auf, die ohne Störung gehalten wurden. Das assoziative Duftgedächtnis kann unmittelbar nach dem Training mittels Kälteanästhesie gestört werden. Es wird erst zwischen 10 bis 30 min nach der Trainingsphase in eine anästhesieresistente Gedächtnisform überführt (Quinn & Dudai, 1976). Das Körperreichweitengedächtnis stellte sich als stabiler heraus, da es durch unmittelbare Kälteanästhesie überhaupt nicht gestört werden kann. Da *Drosophila* nach der visuellen Erfahrung anhand eines 24°-Musters vergebliche Versuche an der 5,0 mm breiten Lücke vermeidet, wird ein Lernen der individuellen Körpergröße mittels Integration der mittleren Schrittlänge und der wahrgenommenen Parallaxen vermutet (Abbildung 17b). Dementsprechend sollte die partielle Kompensation der Parallaxenbewegung in der Lernphase große Fliegen dazu veranlassen, sich wie kleine Exemplare zu verhalten. Es wurden dunkel gehaltene, naive Fliegen auf einer Wippe zwischen zwei Oszillografen-Monitoren für 15 Minuten trainiert. Auf diesen Bildschirmen lief ein hell-dunkles Muster vertikaler Streifen mit der halben mittleren Laufgeschwindigkeit einer *Drosophila melanogaster* in Laufrichtung der Fliege mit. Wenn die Fliege stoppte, hielt auch das Driften des Musters an. Ein Richtungswechsel des Insekts führte ebenfalls zu dem Richtungswechsel der Streifen (Abbildung 7). Die trainierten Fliegen kamen anschließend zurück in die Dunkelheit und wurden am Folgetag an der gerade nicht mehr überwindbaren 4,5 mm breiten Lücke getestet (Abbildung 18b). Diese absolvierten mit 20 % höchst signifikant weniger häufig Kletterversuche als die Fliegen, welche das stationäre Muster bei dem Laufen auf der Wippe zur Verfügung hatten. Diese kletterten mit einer medianen Häufigkeit von 50 % erfolglos. Die Hypothese, dass sich dunkel aufgezogene Fliegen, die mit einem kompensierten Muster trainiert wurden, sich wie kleine Individuen verhalten, bestätigte sich. Sechzehn Männchen hatten die Möglichkeit, nachdem sie mit dem kompensierten Muster trainiert wurden, am folgenden Tag

nochmals an dem stationären Muster umzulernen. Sie zeigten jedoch daraufhin an der 4,5 mm breiten Lücke nicht signifikant mehr Kletterversuche mit einer Häufigkeit von 10 %. Als Kontrolle diente eine Gruppe Männchen, die keine visuellen Erfahrungen vor dem Verhaltenstest sammeln konnte. Diese Fliegen versuchten zu 70 % am häufigsten die unüberwindbare Lücke zu überqueren. Das Umlernen anhand des stationären Musters führte erstaunlicherweise nicht dazu, dass sich Fliegen wieder größer „fühlen“. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass mit einer längeren Trainingsdauer ein Umlernen möglich wäre.



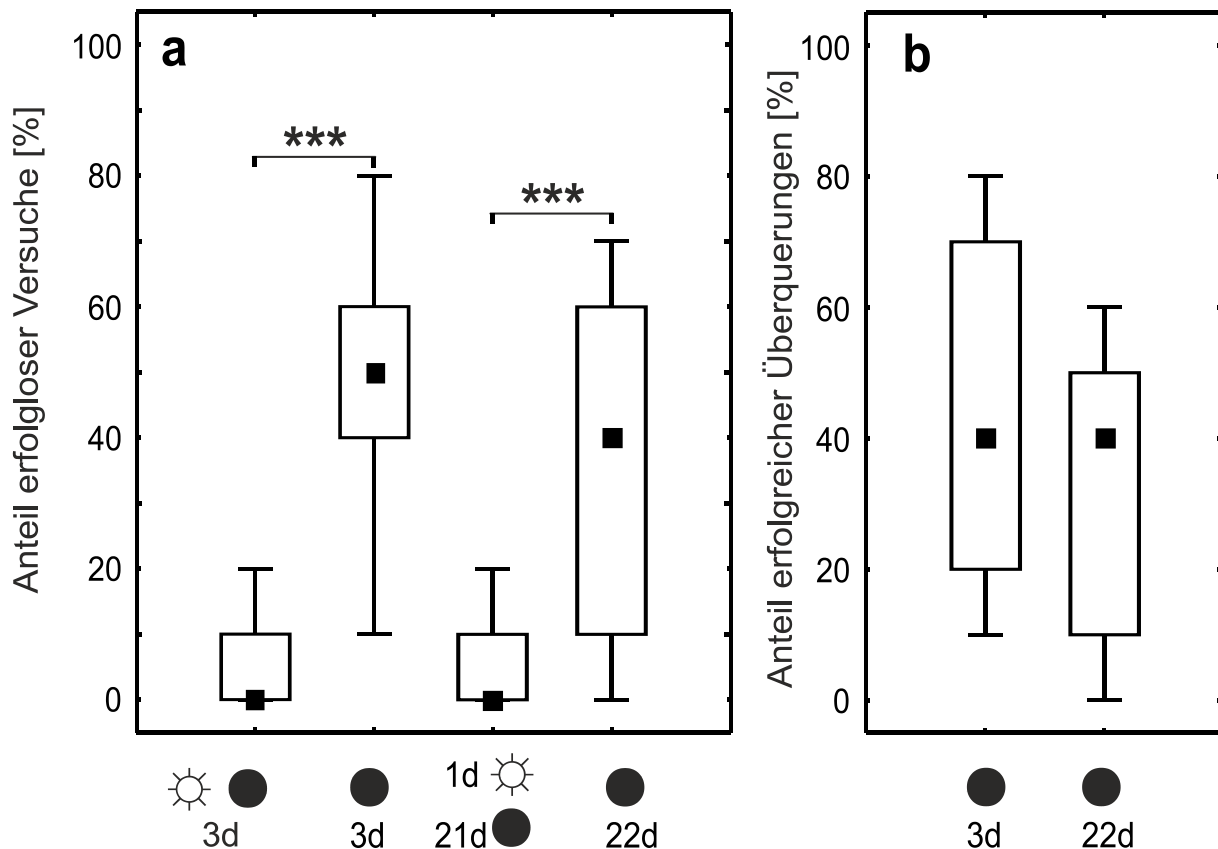
**Abbildung 18: Die Störung und die Kompensation visueller Trainingsmöglichkeiten**

**a:** Die erfolglosen Versuche an einer 5,0 mm breiten Lücke der dunkel gehaltenen CS-Männchen. Alle Gruppen wurden den vorherigen Tag in einer LED-Arena „optimal“ visuell stimuliert, allerdings unterschieden sich die Möglichkeiten zur Konsolidierung. Die „Kälte“-Gruppe wurde unmittelbar nach der visuellen Erfahrung in ein Röhrchen überführt, welches für eine Minute in Eiswasser fixiert wurde. Andere Fliegen rollten direkt im Anschluss oder 2 Stunden nach der Stimulation in einem Zuchtglas auf einem Laborschüttler. Sie wurden erst unmittelbar vor dem Kletterverhaltensexperiment dem Schüttler und der Dunkelheit entnommen. Pro Datensatz:  $N=15$ ,  $n=10$ ; nicht parametrische Median- Darstellung wie in Abbildung 16.

**b:** Die partielle Kompensation der wahrgenommenen Parallaxenverschiebung. Alle Fliegen wurden im Dunkeln gehalten und hatten vor dem Verhaltenstest keine Erfahrung mit Lücken-Überwindung. Sie wurden mit der gerade nicht mehr überwindbaren 4,5 mm breiten Lücke konfrontiert. Das Training erfolgte am vorherigen Tag mit jeweils einer einzelnen Fliege für 15 min auf einer Wippenkonstruktion. Die Parallaxenbewegung, welche das Insekt wahrnimmt, wurde teilweise kompensiert, indem die hellen und dunklen Streifen auf zwei Oszillografen-Bildschirmen mit der halben mittleren Laufgeschwindigkeit in Laufrichtung drifteten. Als Kontrollgruppe dienten Fliegen, die ebenfalls auf der Wippe trainiert wurden, jedoch das stationäre Muster zur visuellen Stimulation erhalten hatten. Für die Vergleichbarkeit wurden zusätzlich Männchen direkt aus der Dunkelheit (keine Stimulation) an der 4,5 mm breiten Lücke getestet. Zusätzlich hatte eine Gruppe, nachdem sie mit den kompensierten Streifen trainiert wurde, die

Möglichkeit am folgenden Tag umzulernen, indem sie nochmals mit dem stationären Muster stimuliert wurde. Pro Datensatz: N= 16, n= 10.

Die vorherigen Experimente mit dunkel aufgezogenen Fliegen wiesen darauf hin, dass sich nach einer 2-stündigen Konsolidierungsphase ein stabiles Körpergrößengedächtnis ausbilden ließe, was zu der brennenden Frage führte, wie lange dieses Gedächtnis andauern könnte. Dafür wurden einen Tag alte, adulte Fliegen aus dem gewöhnlichen Beleuchtungszyklus für 21 Tage in die Dunkelheit überführt. Anschließend wurden sie mit der unüberwindbaren Spalte konfrontiert (Abbildung 19a). Erstaunlicherweise verhielten sie sich nicht signifikant unterschiedlich zu den normal beleuchteten Fliegen. Es traten nahezu keine erfolglosen Versuche auf. Der eine Tag im Licht schien somit für genug Erfahrungen ausgereicht zu haben, um trotz fehlender visueller Rückmeldung die Körperreichweite 3 Wochen lang nicht mehr zu vergessen. Die Exemplare, welche als Vergleichsgruppe 22 Tage lang nie Licht zu Gesicht bekam, verhielten sich mit 40 % Versuchen höchst signifikant erfolgloser. Als Kontrolle der Aktivität wurden dunkel gehaltenen 3 Tage alte Tiere mit ihren 22 Tage alten Artgenossen an einer kletterbaren, 3,5 mm breiten Lücke verglichen (Abbildung 19b). Beide Gruppen überquerten mit einer medianen Häufigkeit von 40 % die überwindbare Lücke. Die älteren Fliegen waren noch in der Lage diese Aufgabe zu bewältigen. Eine generelle Vermeidung von Kletterversuchen aufgrund von Altersschwäche kann also ausgeschlossen werden. Die Fliegen, die einmal ihre Körperreichweite erlernt haben, vergessen diese auch über 21 Tage ohne visuelle Rückmeldung nicht mehr. Es handelt sich bei der Fähigkeit einer Körperreichweitereinschätzung um eine äußerst lang andauernde Gedächtnisform.



**Abbildung 19: Die Beständigkeit des Körpergrößengedächtnisses**

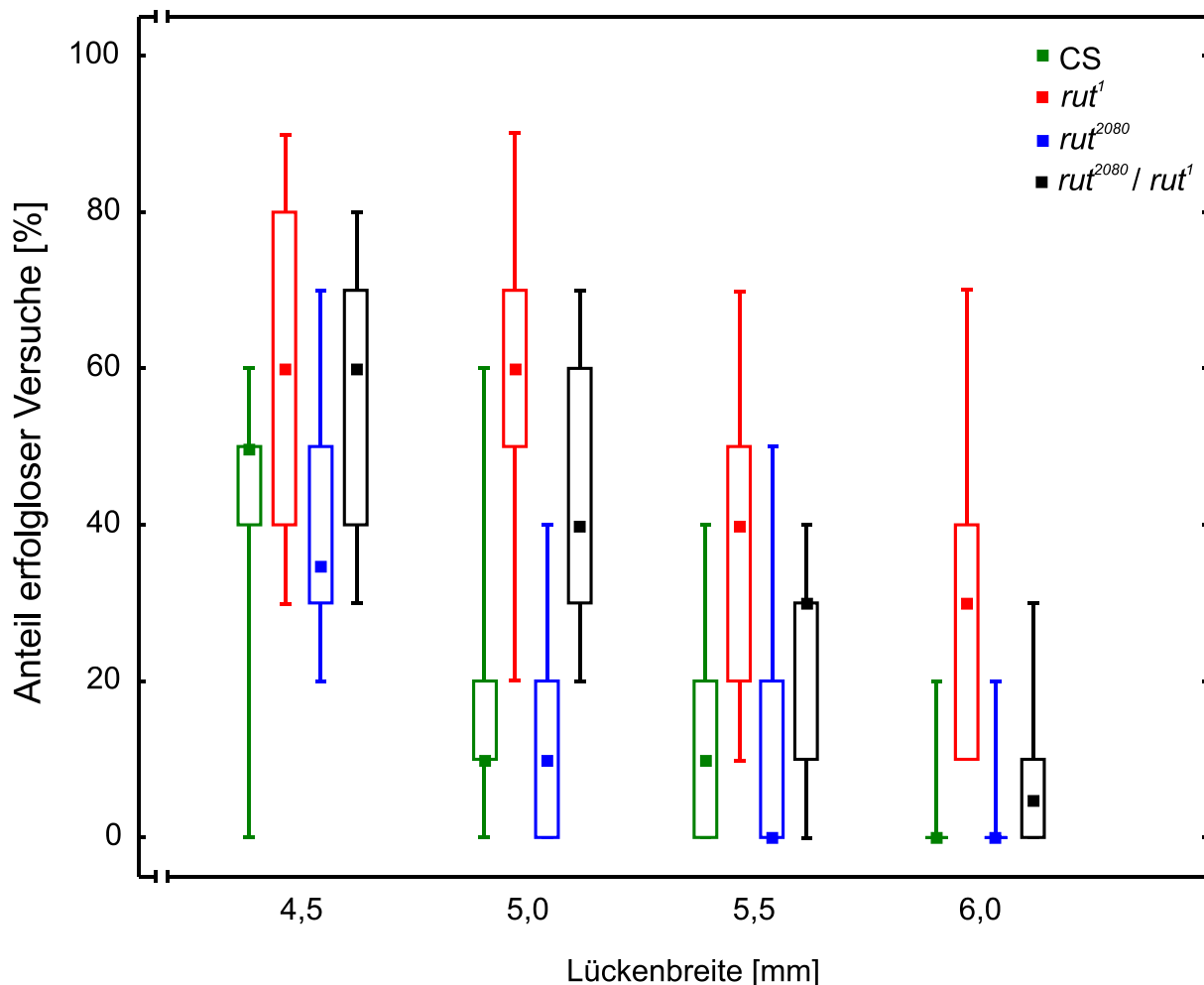
**a:** Die erfolglosen Versuche an einer 5,0 mm breiten Lücke der dunkel aufgezogenen CS-Männchen wurden mit unterschiedlichen vorherigen visuellen Erfahrungen verglichen. Als Kontrolle dient eine Gruppe 3 Tage alter Fliegen, welche zu Standard-Beleuchtungsbedingungen aufgezogen wurde (14 / 10 h). Die nächste Gruppe war in demselben Alter, hatte aber ab der Puppen-Phase bis zum Verhaltensexperiment keine Beleuchtung mehr zur Verfügung. Die folgenden Exemplare hatten nur einen Tag Licht zur Verfügung und befanden sich anschließend bis zu ihren Anläufen 21 Tage in der Dunkelheit. Die letzte Fraktion wurde 22 Tage lang überhaupt keinem Licht ausgesetzt. Pro Datensatz: N=15, n=10.

**b)** Dieses Experiment diente einer Aktivitätskontrolle für das Alter der Fliegen. Es wurden dunkel gehaltenen 3 Tage alte Tiere mit ihren 22 Tage alten Artgenossen an einer kletterbaren, 3,5 mm breiten Lücke verglichen. Pro Datensatz: N=15, n=10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

### 3.8. Die Rettung des Körpergrößenslernens mittels cDNA

Das Verhalten von *rut<sup>1</sup>*-, *dnc<sup>1</sup>*- und *oc<sup>1</sup>*-Fliegen an unüberwindbaren Lücken führte zu der Vermutung, dass eine regulierte cAMP/PKA-Kaskade in der Protocerebralbrücke für das Lernen bzw. das Gedächtnis der eigenen Körpergröße benötigt wird. Es wurden deswegen Rettungsexperimente in *rut<sup>1</sup>*- und *dnc<sup>1</sup>*-mutierten Fliegen mittels GAL4-Treiberlinien durchgeführt, die in verschiedenen Abschnitten von Protocerebralbrückenneuronen exprimieren. Der ursprüngliche publizierte UAS-*rutabaga<sup>+</sup>*-Rettungsstamm befand sich im *rut<sup>2080</sup>*-mutierten Hintergrund (Zars et al., 2000). Allerdings absolvierten *rut<sup>2080</sup>*-Fliegen im Gegensatz zu *rut<sup>1</sup>*-Exemplaren kaum Kletterversuche an

unüberwindbaren Lückenbreiten (Abbildung 20). Am deutlichsten wurde der unterschiedliche Verhaltensphänotyp der beiden *rut*-Allele an der 5,0 mm breiten Lücke. Während die *rut*<sup>1</sup>-Weibchen mit einer medianen Häufigkeit von 60 % versuchten, die zu breite Lücke zu überschreiten, absolvierten die *rut*<sup>2080</sup>-Fliegen sowie die wildtypischen Weibchen mit einem Anteil von 10 % kaum erfolglose Kletterversuche. Der Anteil an den erfolglosen Versuchen der F1-Nachkommen der *rut*<sup>2080</sup>/*rut*<sup>1</sup>-Kreuzung lag mit 40 % zwischen den Phänotypen parentaler Stämme. Selbst an der größten Lücke im Test (6,0 mm) setzte sich dieses Bild fort. Die *rut*<sup>1</sup>-Weibchen versuchten mit 30 % hoch signifikant häufiger zu klettern als die Nachkommen der *rut*<sup>2080</sup>/*rut*<sup>1</sup>-Kreuzung mit 10 %. Sowohl die wildtypischen, als auch die *rut*<sup>2080</sup>-Fliegen absolvierten mit einer medianen Häufigkeit von 0 % nur in Ausnahmefällen einen Kletterversuch an der unüberwindbaren 6,0 mm breiten Lücke.

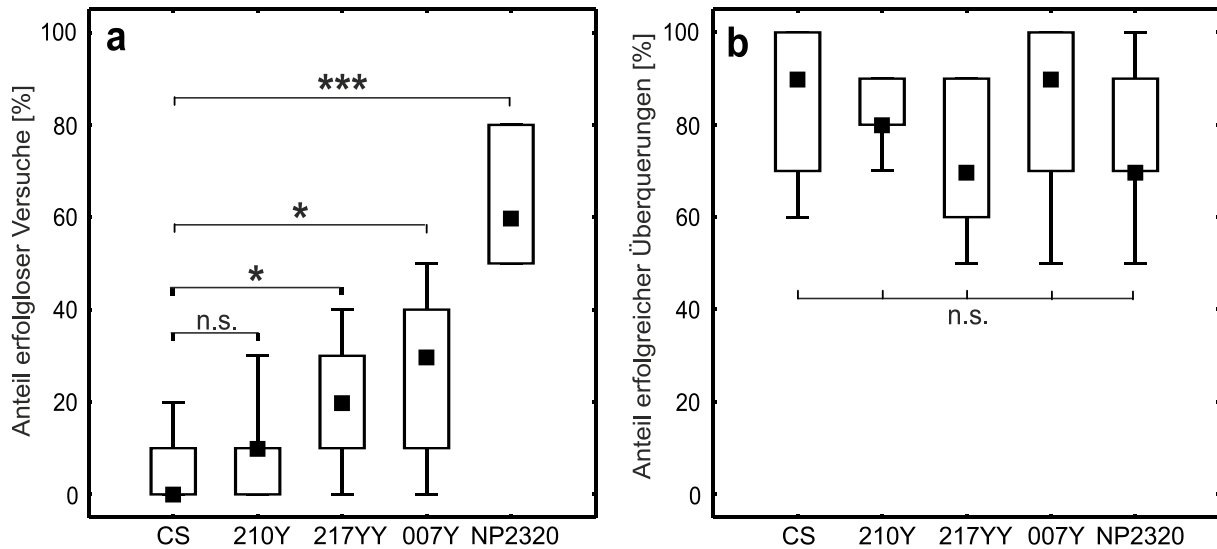


**Abbildung 20: Das Kletterverhalten weiblicher Fliegen zweier *rutabaga*-Allele**

Weibchen des Stammes CS, *rut*<sup>1</sup>, *rut*<sup>2080</sup> und *rut*<sup>2080</sup> gekreuzt mit *rut*<sup>1</sup> wurden mit den unüberwindbaren Lückenbreiten 4,5-, 5,0-, 5,5- und 6,0 mm konfrontiert. Pro Datensatz: N= 10, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung der erfolglosen Versuche wie in Abbildung 16. Der Übersicht halber ist die zu Grunde liegende statistische Auswertung in Tabelle 15 zu finden.

### 3.8.1 Die Kartierung des Körpergrößenslernens mittels *rut*-Rettung

Es wurde versucht das Körpergrößengedächtnis im *rut*<sup>1</sup>-mutanten Hintergrund in jeweils kleinen Neuronenpopulationen zu retten. Dazu wurden *rut*<sup>1</sup>;UAS-*rut*<sup>+</sup>-Weibchen mit Männchen verschiedener gewebespezifischer GAL4-Linien gekreuzt. Aufgrund des eingeschränkten Körpergrößengedächtnisses der *oc*<sup>1</sup>-Strukturmutanten wurde die Protocerebralbrücke als relevantes Neuropil vermutet (Abbildung 12). Deswegen wurden GAL4-Linien ausgewählt, welche in der PB exprimieren. 007Y-GAL4 treibt in kolumnären Neuronen, den sogenannten w-, x-, y- und z-Bündeln, die zwischen der Protocerebralbrücke und dem Fächerförmigen Körper projizieren. Die Linie 210Y-GAL4 führt zu einer Expression in anderen, latero-lateral orientierten Neuronen (Poeck et al., 2008). Die Linie 217YY-GAL4 steht für die Rekombination beider zuvor genannten Treiber. Aufgrund des Expressionsmusters in den Kolumnarneuronen des Fächerförmigen Körpers, fungierte das NP2320-Konstrukt als Negativkontrolle (Liu et al., 2006). Die *rut*<sup>1</sup>/Y;;UAS-*rut*<sup>+</sup>/210Y-GAL4-Fliegen absolvierten nicht signifikant mehr erfolglose Kletterversuche als die wildtypischen Männchen (Abbildung 21a). Sie versuchten mit einer medianen Häufigkeit von 10 % kaum die unüberwindbare 5,0 mm breite Lücke zu überqueren. Die Körpergrößeneinschätzung konnte also mit dem Expressionsmuster von 210Y gerettet werden. Die *rut*<sup>1</sup>/Y;;UAS-*rut*<sup>+</sup>/007Y-GAL4-Fliegen versuchten zwar mit einer Häufigkeit von 30 % signifikant seltener die 5,0 mm Lücke zu überqueren als die Männchen der NP2320-Kreuzung. Sie versuchten es jedoch signifikant öfter als ihre wildtypischen Artgenossen. Erstaunlicherweise zeigten *rut*<sup>1</sup>/Y;;UAS-*rut*<sup>+</sup>/217YY-GAL4-Fliegen, welche die Rekombination von 210Y und 007Y in sich vereinten, einen signifikanten Unterschied zu den wildtypischen Tieren. Sie versuchten bei 20 % der Anläufe eine aussichtslose Überquerung. Mit einem Anteil von 60 % erfolglosen Versuchen verhielten sich die *rut*<sup>1</sup>/Y;;UAS-*rut*<sup>+</sup>/NP2320-GAL4-Männchen ohne Körperreichweiteinschätzung. Fliegen von keinem der in diesem Experiment beobachteten Stämme unterschieden sich signifikant an der überquerbaren 3,0 mm breiten Lücke. Zwischen 70 % und 90 % der Anläufe endeten erfolgreich. Eine verminderte Anzahl der Kletterversuche wegen motorischer Einschränkungen, oder aufgrund inaktiver Fliegen konnte somit ausgeschlossen werden.



### Abbildung 21: Die Rettung des *rutabaga*<sup>1</sup>-Hintergrunds.

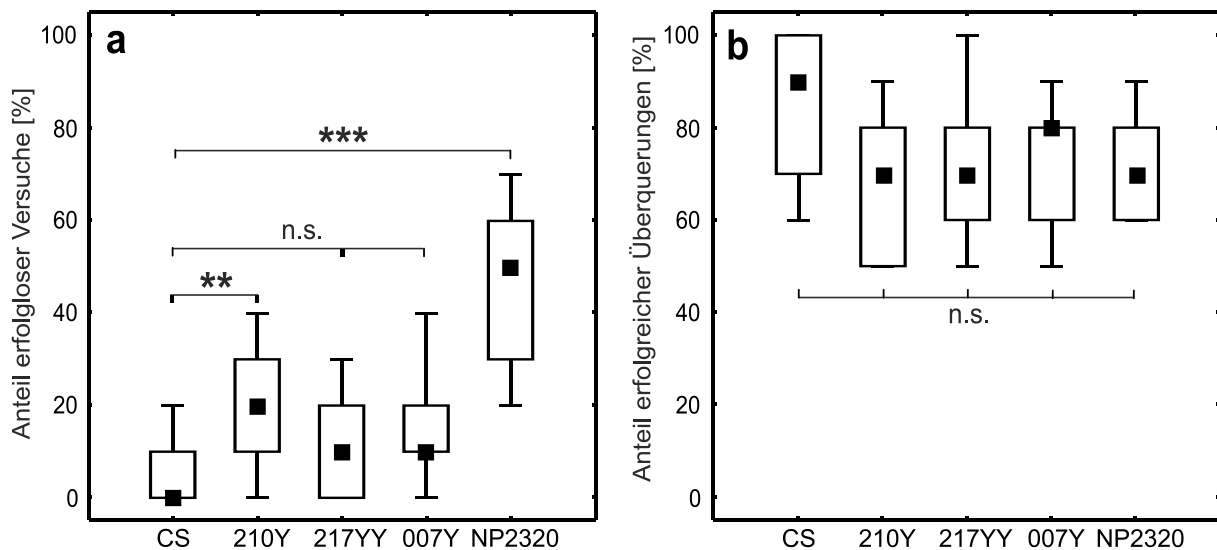
*rut*<sup>1</sup>; UAS-*rut*<sup>+</sup>-Weibchen wurden mit verschiedenen GAL4-Treiber Männchen, welche in neuronalen Systemen der Protocerebralbrücke exprimieren, gekreuzt. **a:** Die erfolglosen Versuche der Männchen unterschiedlicher Rettungsstrukturen wurden an einer unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert. **b:** Die männlichen Fliegen desselben genetischen Hintergrunds wie in a) wurden an einer 3,0 mm breiten Lücke hinsichtlich ihrer erfolgreichen Überquerungen verglichen. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

### 3.8.2 Die Kartierung des Körpergrößenslernens mittels *dnc*-Rettung

Es wurde versucht das Körpergrößengedächtnis im *dnc*<sup>1</sup>-mutanten Hintergrund zu retten. Dazu wurden *dnc*<sup>1</sup>;UAS-*dnc*<sup>+</sup>-Weibchen mit Männchen der gewebespezifischen GAL4-Linien gekreuzt, welche auch schon bei der *rutabaga*-Rettung im vorherigen Abschnitt zum Einsatz kamen. Allerdings versuchten die *dnc*<sup>1</sup>/Y;UAS-*dnc*<sup>+</sup>/+;210Y-GAL4/+ -Fliegen hoch signifikant häufiger die 5,0 mm breite Lücke zu überschreiten (20% erfolglose Versuche) als die wildtypischen Artgenossen (Abbildung 22a). Das Expressionsmuster von 210Y, welches in der Lage war den *rut*<sup>1</sup>-Phänotyp zu retten (Abbildung 21a), löste also keinen Rettungsphänotyp im *dnc*<sup>1</sup>-Hintergrund aus. Als Rettungen konnten hingegen die Konstrukte mit 007Y- und 217YY-Gal4 bezeichnet werden, da die Männchen dieser Genotypen sich nicht signifikant erfolgloser als die CS-Fliegen verhielten. Es wurde nur mit einem Anteil von 10 % versucht die unüberwindbare Lücke zu klettern. Die Genprodukte von *dunce* und *rutabaga* werden somit in unterschiedlichen Neuronengruppen benötigt. Die *dnc*<sup>1</sup>/Y;UAS-*dnc*<sup>+</sup>/NP2320-GAL4; +/- -Fliegen erwiesen sich mit 50 % erfolglosen Versuchen als Negativkontrolle. Keine der getesteten Kreuzungen zeigte irgendwelche Auffälligkeiten an der überquerbaren 3,0 mm breiten Lücke. Eine verminderte Anzahl der Kletterversuche wegen inaktiver



Fliegen konnte ausgeschlossen werden. Die unterschiedlichen Gruppen kletterten mit einer Erfolgsquote zwischen 70 % und 90 %.



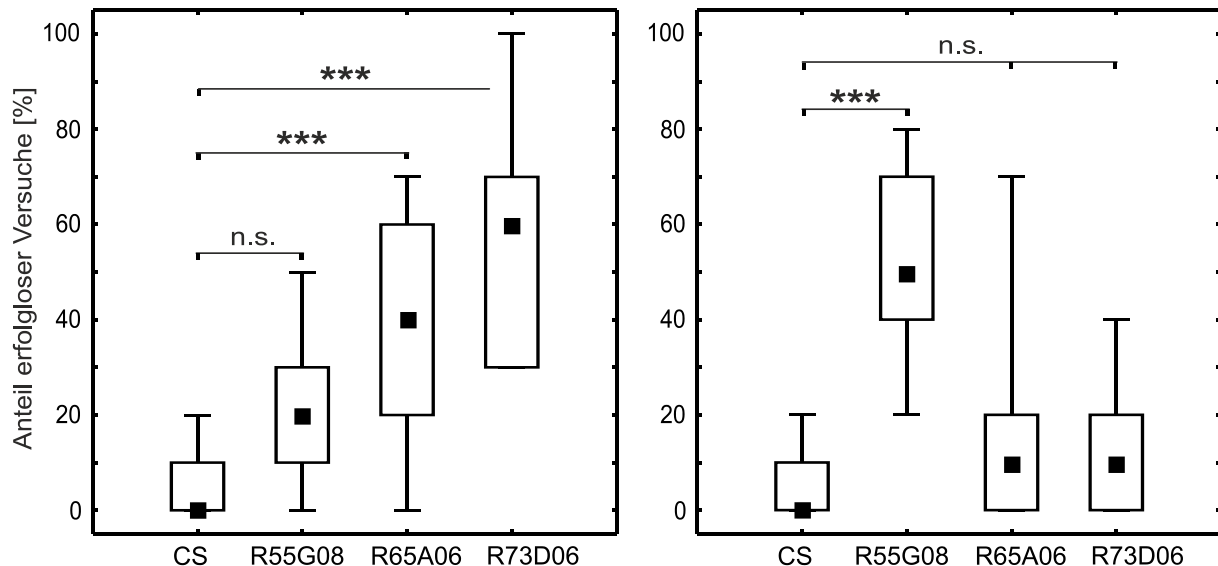
### Abbildung 22: Die Rettung des *dunce*<sup>1</sup>-Hintergrunds.

*dnc*<sup>1</sup>;UAS-*dnc*<sup>+</sup>-Weibchen wurden mit verschiedenen GAL4-Treibermännchen, welche in neuronalen Systemen der Protocerebralbrücke exprimieren, gekreuzt. **a**: Die erfolglosen Versuche der Männchen unterschiedlicher Rettungskonstrukte wurden an einer unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert. **b**: Die männlichen Fliegen desselben genetischen Hintergrundes wie in a) wurden an einer 3,0 mm breiten Lücke hinsichtlich ihrer erfolgreichen Überquerungen verglichen. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

### 3.8.3 Die Kartierung mittels distinkter Linien

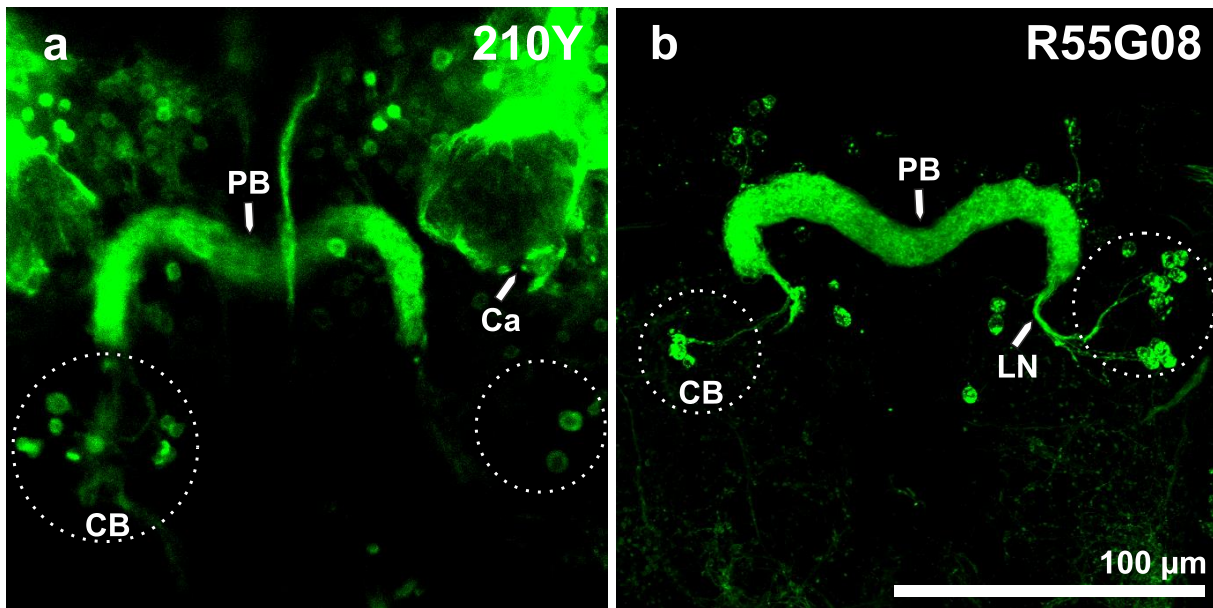
Während des Verlaufs dieser Dissertation entstanden die GAL4-Linien der Rubin-Kollektion, welche erheblich spezifischere Expressionsmuster als die zuvor verwendeten lieferten (Jenett et al., 2012). In Folge dessen wurden die Rettungsexperimente mit vielversprechenden PB-Linien dieser Kollektion wiederholt. Der R55G08-Treiber exprimiert in den lateralen Neuronen der PB, weswegen er als Ersatz für 210Y verwendet wurde. R65A06- und R73D06-GAL4 führen zu einer Expression in kolumnären Neuronen der PB, welches sie zu einem Ersatz für 007Y klassifizierte. Jedoch zeigte sich bei der immunhistologischen Färbung, dass R65A06 auch in lateralen Neuronen der PB treibt. Erfolgte die *rut*<sup>1</sup>-Rettung mit R55G08, kletterten die Fliegen mit 20 prozentiger Häufigkeit nicht signifikant erfolgloser als die wildtypischen Exemplare, die nahezu keine Kletterversuche an der unüberwindlichen Lücke unternahmen. Es bestätigte sich also auch in diesem Verhaltensversuch eine Rettung der Körpergrößeneinschätzung in den lateralen Neuronen (LN) der Protocerebralbrücke. Allerdings war R65A06, welche sowohl in LN als auch in PFN treibt, nicht in der Lage, den *rutabaga*- Phänotyp zu

retten. Es erfolgte keine *rut<sup>1</sup>*-Rettung in den kolumnären PB-Neuronen, da R65A06 und R73D06 nicht zu einem wildtypischen Phänotyp führten. Die Fliegen mit diesen Konstrukten versuchten in 40 % bzw. 60 % die unüberquerbare Lücke erfolglos zu klettern. Allerdings fungierten diese Treiber als Rettungslinien des *dnc<sup>1</sup>*-Hintergrunds. Die Nachkommen dieser beiden Kreuzungen versuchten mit 10 % nicht signifikant häufiger die 5,0 mm breite Lücke zu klettern als die wildtypischen Fliegen mit 0 %. Eine defizitäre Einschätzung der Körperreichweite hatten Fliegen, bei denen *dunce* mit R55G08 getrieben wurde. Diese versuchten nach 50 % der Anläufe die zu breite Lücke erfolglos zu klettern. Also bestätigte sich, dass der *dnc<sup>1</sup>*-Phänotyp nicht in den lateralen PB- Neuronen gerettet werden kann.



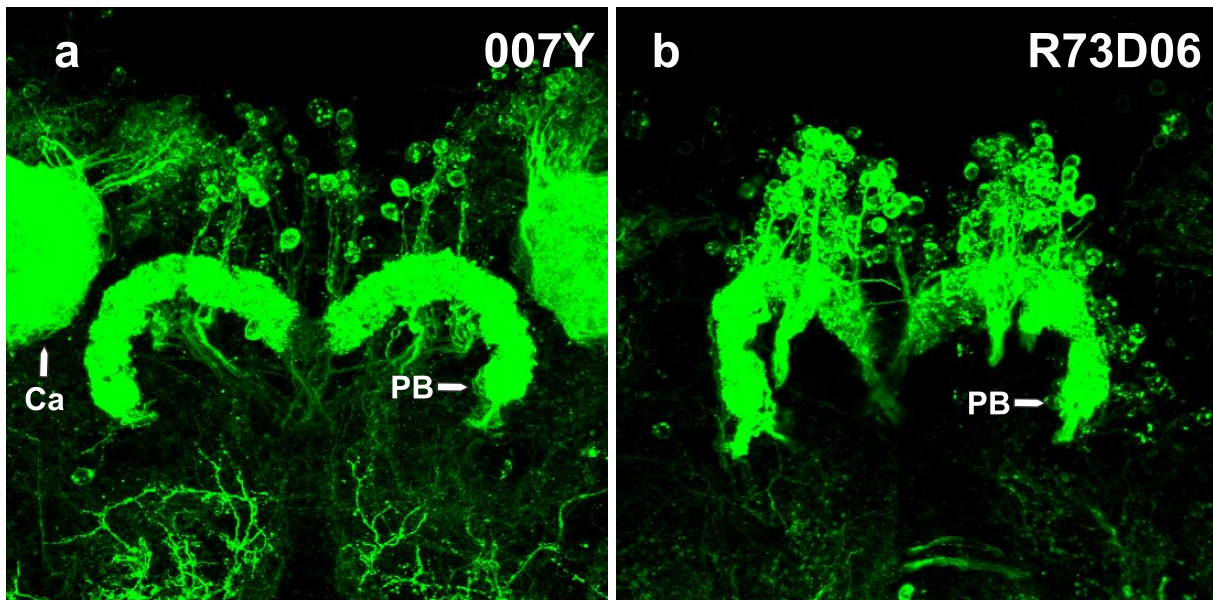
**Abbildung 23: Die Rettung von *rutabaga<sup>1</sup>* und *dunce<sup>1</sup>***

*rut<sup>1</sup>*;UAS-*rut<sup>+</sup>*-Weibchen wurden mit verschiedenen GAL4-Treibermännchen, welche in neuronalen Systemen der Protocerebralbrücke exprimieren, gekreuzt. **a:** Die erfolglosen Versuche der Männchen unterschiedlicher Rettungskonstrukte wurden an einer unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert. **b:** *dnc<sup>1</sup>*;UAS-*dnc<sup>+</sup>*-Weibchen wurden mit den GAL4-Treibermännchen (wie in a) gekreuzt. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

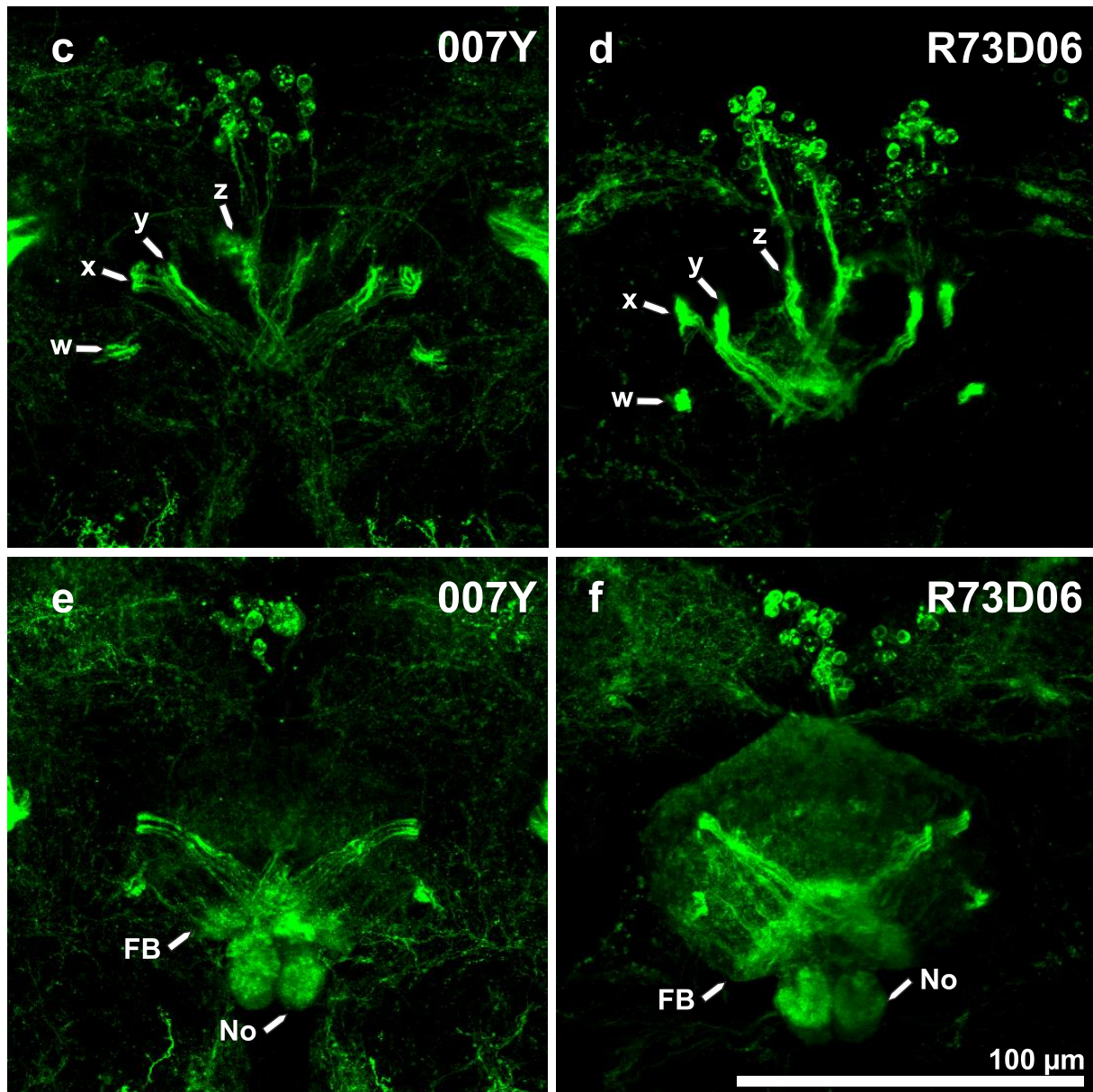


#### Abbildung 24: Gemeinsame Expression von 210Y und R55G08

Immunhistochemische Färbung gegen GFP. **a)** Übereinander gelegte 0,75 µm breite konfokale Schnitte der Protocerebralbrückenregion eines  $+/+;UAS-mCD8::GFP/+;210Y-GAL4/+$ -Weibchens in der Z-Projektion (13 optische Schnitte). Die Zellkörper (**CB**) der intrinsischen lateralen Neurone (**LN**), welche die Protocerebralbrücke (**PB**) durchziehen sind mit einem gestrichelten Kreis umrandet. In dieser sich posterior befindenden Ebene existiert zusätzlich eine GFP-Expression in den Calices (**Ca**) der Pilzkörper. **b)** 95 übereinander gelegte konfokale Schnitte der PB-Region eines  $+/+;UAS-CD4-tdGFP/+;R55G08-GAL4/+$ -Weibchens. Das Expressionsmuster dieser Linie stellt sich erheblich spezifischer dar. Die GFP-Färbung beschränkt sich nahezu auf die Lateralneurone der PB.

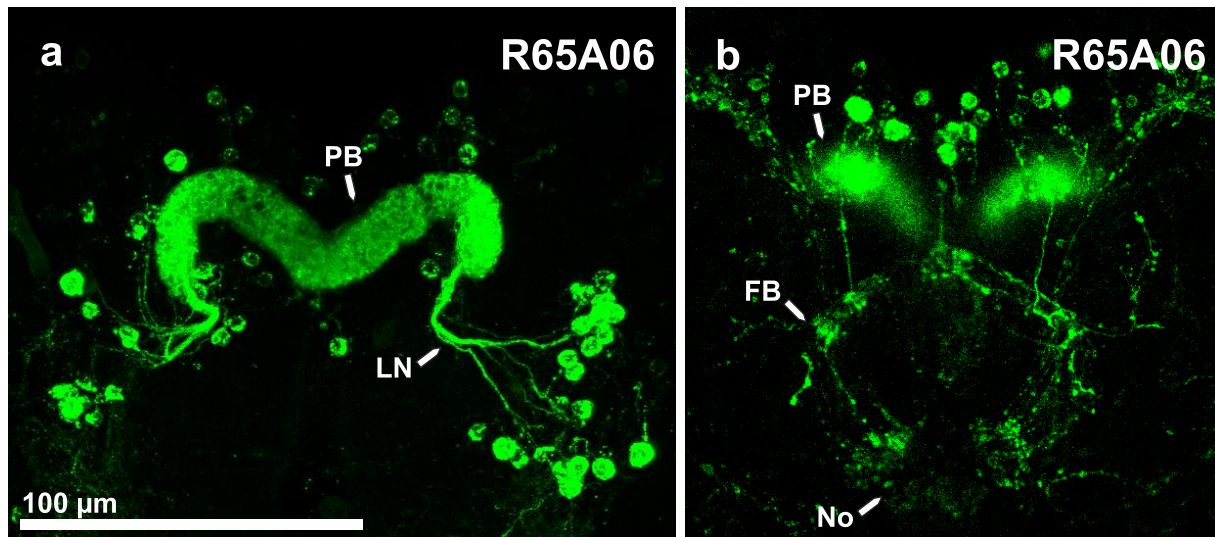






### Abbildung 25: Gemeinsame Expression von 007Y und R73D06

Immunhistochemische Färbung gegen GFP. **a)** Übereinander gelegte 0,75 µm breite konfokale Schnitte der Protocerebralbrückenregion eines  $+/+;UAS-CD4-tdGFP/+;007Y-GAL4/+$ -Weibchens in der Z-Projektion (70 optische Schnitte). Kolumnäre Neurone durchziehen die Protocerebralbrücke (**PB**). In dieser sich posterior befindenden Ebene existiert zusätzlich eine GFP-Expression in den Calices (**Ca**) der Pilzkörper. **b)** 55 übereinander gelegte konfokale Schnitte der PB-Region eines  $+/+;UAS-CD4-tdGFP/+;R73D06-GAL4/+$ -Weibchens. Das Expressionsmuster dieser Linie stellt sich erheblich spezifischer dar. Die GFP-Färbung beschränkt sich nahezu auf das kolumnäre PFN-System, welches die PB mit dem fächerförmigen Körper (**FB**) und den Noduli (**No**) verbindet. **c)** 35 optische konfokale Schnitte der mit 007Y exprimierten FB-Region **d)** 23 optische konfokale Schnitte der mit R73D06 exprimierten FB-Region. In neuronalen **w**-, **x**-, **y**-, und **z**-Bündeln wird die PB mit dem FB verbunden. Die PFN-Verbindungen kreuzen sich zwischen PB und FB. **e)** 60 optische konfokale Schnitte der mit 007Y exprimierten No-Region **f)** 60 optische konfokale Schnitte der mit R73D06 exprimierten No-Region. Die PFN-Neurone enden in dem jeweils contralateralen Nodus. Jedes PFN-Neuron hat einen spiegelsymmetrischen Partner auf der gegenseitigen Hemisphäre.



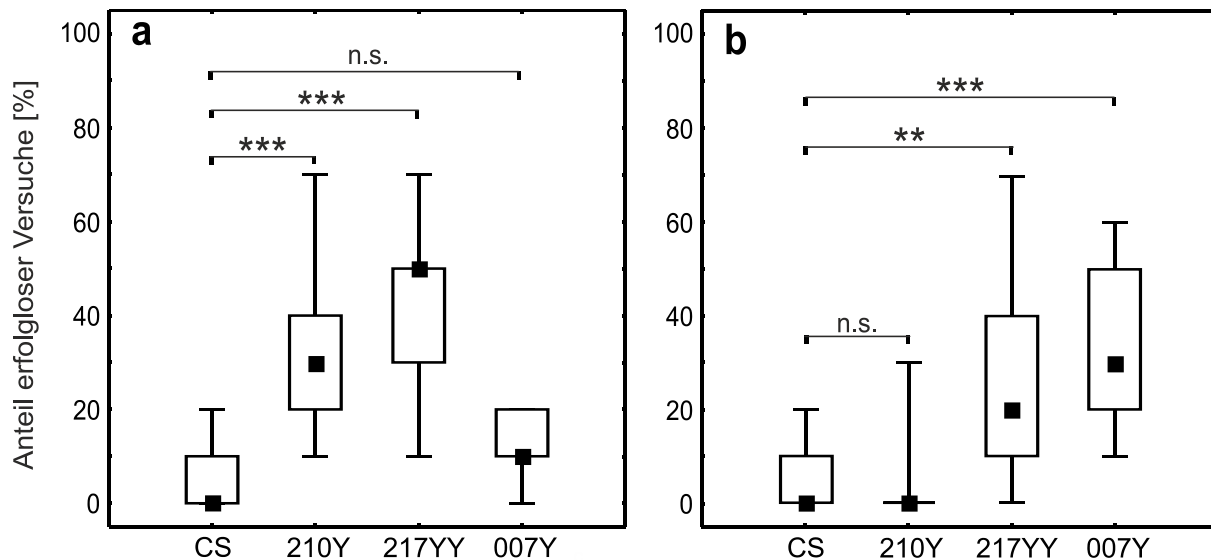
**Abbildung 26: Expressionsmuster von R65A06.**

Immunhistochemische Färbung gegen GFP. **a)** Übereinander gelegte 0,75  $\mu\text{m}$  breite konfokale Schnitte der Protocerebralbrückenregion eines  $+/+; \text{UAS-CD4-tdGFP}/+; \text{R65A06-GAL4}/+$  Weibchens in der Z-Projektion (100 optische Schnitte). Laterale Neurone (LN) durchziehen die Protocerebralbrücke (PB) in dieser sich posterior befindenden Ebene. **b)** 30 übereinander gelegte konfokale Schnitte der sich weiter anterior befindlichen Ebene desselben Tiers sind kollektive PFN-Neurone dargestellt, welche die PB mit dem fächerförmigen Körper (FB) und den Noduli (No) verbinden.

### 3.9 Die Regulierung des Körpergrößelernens mittels RNAi

Es wurde versucht die Kartierung des Körpergrößengedächtnisses mittels entsprechender RNA-Interferenz-Linien zu komplettieren. Dazu wurden  $\text{UAS-}rut^{\text{RNAi}}$ - bzw.  $\text{UAS-}dnc^{\text{RNAi}}$ -Weibchen mit Männchen der GAL4-Treiber gekreuzt, welche schon im Rettungsexperiment zum Einsatz kamen. Die Relevanz der unterschiedlichen PB-Neurone für das Körpergrößengedächtnis bestätigte sich ebenfalls in diesem Experiment (Abbildung 27). Als die  $rut^{\text{RNAi}}$  mit 210Y getrieben wurde, entstand in den Nachkommen ein defizitäres Körpergrößengedächtnis. Sie versuchten mit einer medianen Häufigkeit von 30 % die unüberquerbare Lücke zu klettern. Männchen bei denen die  $rut^{\text{RNAi}}$  sowohl mit 210Y als auch mit 007Y exprimiert wurde (217YY-GAL4), absolvierten ebenfalls höchst signifikant häufiger erfolglose Versuche als die wildtypischen Artgenossen. Die  $+/Y; \text{UAS-}rut^{\text{RNAi}}/007Y\text{-GAL4}$ -Männchen zeigten keine Defizite in der Körpergrößeneinschätzung. Sie versuchten mit einem Anteil von 10 % (nicht signifikant unterschiedlich zu dem wildtypischen Verhalten mit einem 0 prozentigen Anteil) kaum aussichtslose Versuche an der unüberwindbaren Lücke. Die Fliegen verhielten sich an der 5,0 mm breiten Lücke nahezu komplementär, wenn in den relevanten Neuronen mittels  $dnc^{\text{RNAi}}$  reguliert wurde. Die Expression von 007Y rief somit das defizitäre Körpergrößengedächtnis hervor. Diese Männchen versuchten mit einem Anteil von 30 % die

Lücke erfolglos zu überwinden. Auch die  $+Y;UAS-dnc^{RNAi}/+;217YY-GAL4/+$ -Männchen versuchten zu 20 % hoch signifikant erfolgloser zu klettern als die wildtypischen Exemplare mit einem Anteil von 0 %. Die Regulierung mittels  $dnc^{RNAi}$  in 210Y-Neuronen resultierte in keiner eingeschränkten Körpergrößeneinschätzung. Kaum ein Individuum mit diesem Konstrukt versuchte die unüberwindbare Lücke zu meistern.



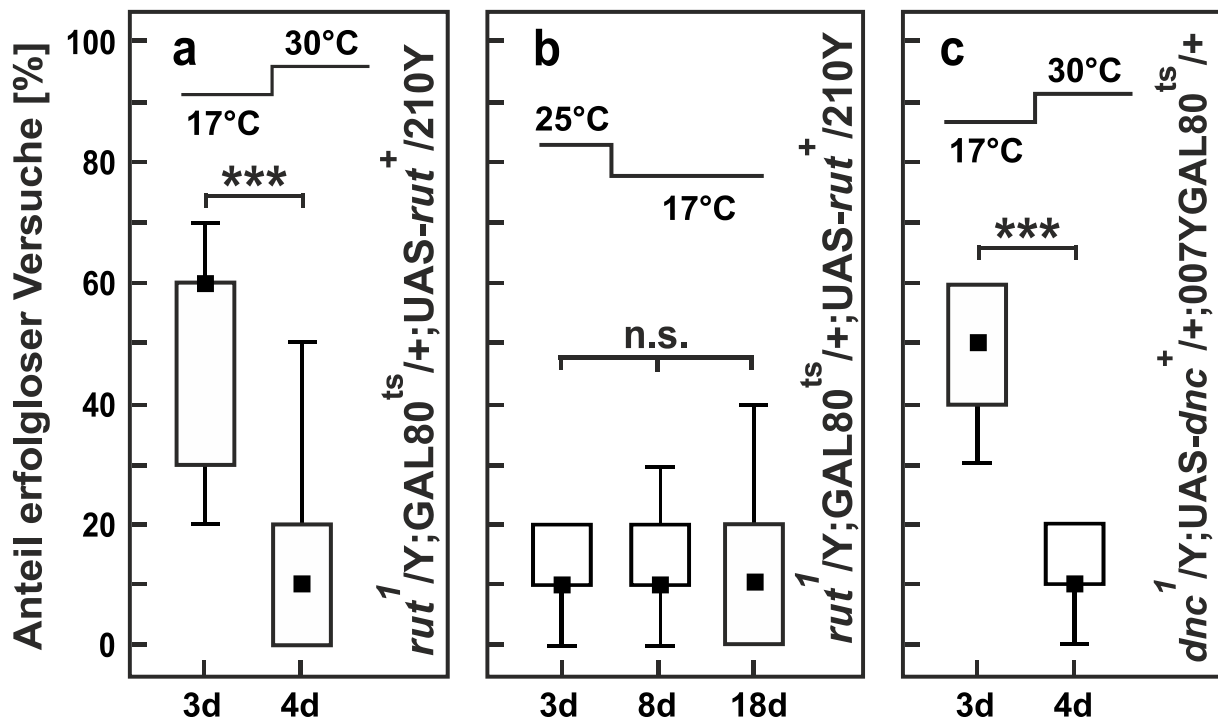
**Abbildung 27: Die Regulierung von *rutabaga* und *dunce* mittels RNAi.**

Die Weibchen der RNAi-Linien wurden mit verschiedenen GAL4-Treiber Männchen, welche in neuronalen Systemen der Protocerebralbrücke exprimieren, gekreuzt. **a:** Die erfolglosen Versuche der UAS-*rut*<sup>RNAi</sup>-Männchen wurden an einer 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert. **b:** Die erfolglosen Versuche der UAS-*dnc*<sup>RNAi</sup>-Männchen wurden ebenfalls an der unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke beobachtet. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

### 3.10 Die spatio-temporale Induzierung des Körpergrößenslernens

Das *rutabaga*<sup>1</sup>-Rettungsexperiment wurde mittels des temperatursensitiven Transkriptionsfaktors GAL80<sup>ts</sup> erweitert. Dieser bindet GAL4 bei niedrigen Temperaturen und hindert somit die Expression des entsprechenden Effektors unter UAS- Kontrolle. Bei hohen Temperaturen kann diese Hemmung nicht mehr stattfinden, was die Expression des kontrollierten Effektors (UAS-*rutabaga*) zur Folge hat (McGuire et al., 2003). Diese Methode wurde verwendet, um *rutabaga* während der gesamten Entwicklung bis zum adulten Insekt nicht zu exprimieren, sodass es darauf erst akut vor dem Verhaltensexperiment in den relevanten Neuronen durch einen Wechsel der Temperatur zur Verfügung gestellt wurde (Abbildung 28). Es befähigt nicht nur zu einer örtlichen, sondern auch zu einer zeitlichen Trennung. Die *rut*<sup>1/Y;GAL80<sup>ts</sup>/+;UAS-*rut*<sup>+</sup>/210Y-Männchen zeigten bei 17°C ein Defizit in der Körpergrößeneinschätzung. Ihre Anläufe endeten</sup>

zu 60 % mit einem erfolglosen Versuch an der unüberwindbaren Lücke. Nach dem Temperaturwechsel auf 31°C verhielten sich dieselben Individuen hoch signifikant erfolgreicher als am vorherigen Tag. Sie versuchten nur noch in 10 % der Fälle die zu große Lücke zu überschreiten. Somit fand eine notwendige und hinreichende spatio-temporale Rettung mit dem Expressionsmuster von 210Y statt. Deswegen wurden die *rut<sup>1</sup>/Y;GAL80<sup>ts</sup>/+;UAS-*rut*<sup>+</sup>/210Y*-Männchen darauf getestet, ob sie, wenn *rutabaga* nicht mehr translatiert wird, ihr Körpergrößengedächtnis wieder vergessen. Dazu wurden diese bei 25°C aufgezogen und zunächst auch bei dieser Temperatur mit der 5,0 mm breiten Lücke konfrontiert. Bei diesen Bedingungen zeigten sie mit 10 % erfolglosen Versuchen keine defizitäre Körpergrößeneinschätzung. Unmittelbar nach dem Verhaltenstest erfolgte der Temperaturabfall auf 17°C. Nach der 5-tägigen Inkubation bei dieser Temperatur wurden dieselben Fliegen erneut mit der 5,0 mm breiten Spalte konfrontiert. Selbst nach 15 Tagen bei 17°C verhielten sich diese männlichen Fliegen nicht signifikant erfolgloser als bei 25°C. Bei allen Temperaturbedingungen und zu den unterschiedlichen Zeitpunkten waren nur 10 % der Versuche erfolglos. Es kam also zu keinem Vergessen der Körperreichweite, wenn *rutabaga* nicht mehr exprimiert wurde. Wenn das Körpergrößengedächtnis erst einmal konsolidiert worden ist, wird *rut* für den Abruf anscheinend nicht mehr benötigt. Eine nicht wildtypische Körpergrößeneinschätzung wiesen die *dnc<sup>1</sup>/Y;GAL80<sup>ts</sup>/+;UAS-*dnc*<sup>+</sup>/007Y*-Männchen bei 17°C auf. Sie versuchten mit einer medianen Häufigkeit von 50 % die 5,0 mm breite Spalte erfolglos zu überklettern. Nach dem Anstieg auf 31°C zeigten dieselben Fliegen nur noch bei 10 % der Anläufe einen vergeblichen Versuch. Diese enorme Verbesserung erwies sich als höchst signifikant unterschiedlich. Es konnte also von einer hinreichenden Rettung in dem Expressionsmuster von 007Y ausgegangen werden.



**Abbildung 28: Die spatio-temporale Rettung von *rutabaga*<sup>1</sup> und *dunce*<sup>1</sup>**

*rut*<sup>1</sup>;UAS-*rut*<sup>+</sup>-Weibchen wurden mit 210y-Gal80<sup>ts</sup>-Treibermännchen, welche in lateralen Neuronen der Protocerebralbrücke exprimieren, gekreuzt. **a:** Die erfolglosen Versuche der Männchen des Rettungskonstrukts wurden an einer unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert. Der Temperaturwechsel erfolgte mit denselben Individuen über Nacht **b:** Die männlichen Fliegen desselben genetischen Hintergrundes wie in a) wurden an einer 5,0 mm breiten Lücke hinsichtlich ihrer erfolglosen Versuche verglichen. Der Temperaturwechsel erfolgte unmittelbar nach dem ersten Test. Die letzte Verhaltensabfrage fand 15 Tage später statt. **c:** *dnc*<sup>1</sup>;UAS-*dnc*<sup>+</sup>-Weibchen wurden mit 007y-Gal80<sup>ts</sup>-Treibermännchen, welche in kolumnären PFN-Neuronen exprimieren, gekreuzt. **a:** Die erfolglosen Versuche der Männchen des Rettungskonstrukts wurden an einer unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert. Der Temperaturwechsel erfolgte mit denselben Individuen über Nacht. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

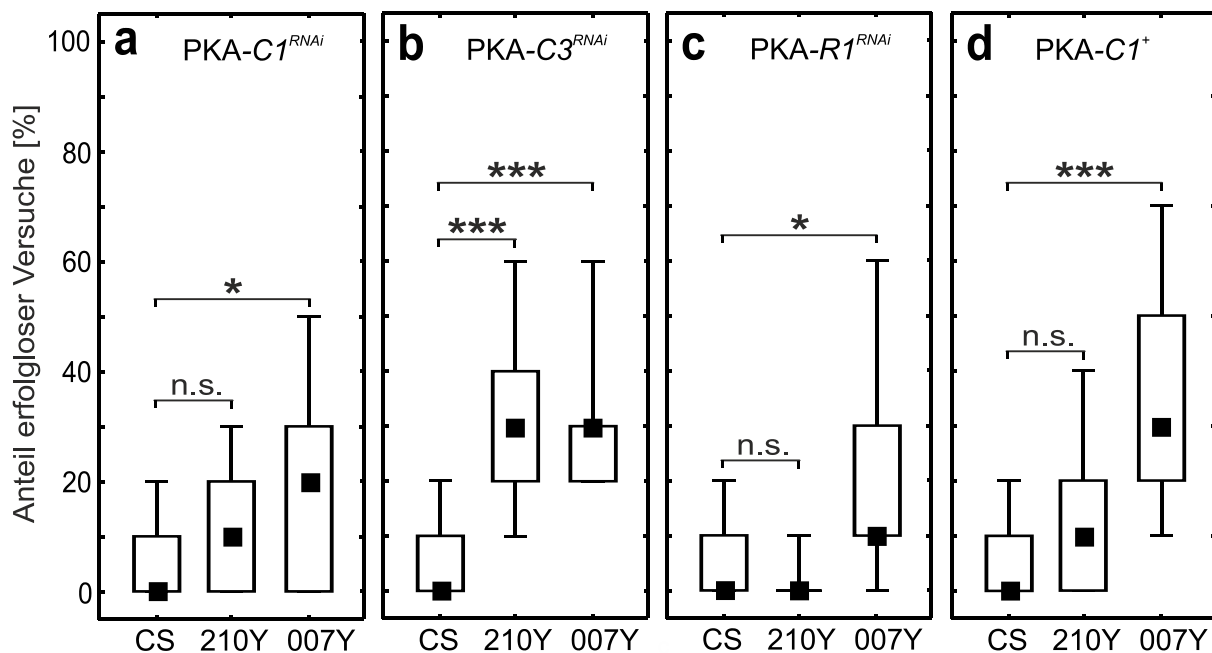
### 3.11 Die Regulierung der Proteinkinase A

Die folgenden Experimente dienen dazu die Fragestellung zu beantworten, ob das Körpergrößenlernen ähnlich assoziativer Lernformen über die cAMP/PKA-abhängige Lernkaskade realisiert wird. Mutationen im *DCO*-Gen, welches für die katalytische Untereinheit der PKA kodiert, resultieren in starken Einschränkungen des Duftgedächtnisses (Skoulakis et al., 1993). Deswegen wurden Fliegen mit der unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke konfrontiert, deren PKA-Expression auf unterschiedliche Weise manipuliert wurde (Abbildung 29). Wenn die katalytische Untereinheit der PKA-C1 in den lateralen Neuronen der PB mittels RNAi herunter reguliert wurde (+/Y;UAS-PKA-C1<sup>RNAi</sup>/+;210Y-GAL4/+), unterschieden sich die erfolglosen Versuche nicht signifikant



zu denen wildtypischer Fliegen. Geschah dieses hingegen in den kolumnären Neuronen, versuchten die  $+Y;UAS-PKA-C1^{RNAi/+};210Y-GAL4/+$ -Männchen mit einer medianen Häufigkeit von 20 % signifikant erfolgloser die 5,0 mm breite Lücke zu überqueren. Gene für verschiedene katalytische Untereinheiten und ein Gen für die regulatorische Untereinheit wurden aufgrund ihrer Homologien zu den Säugetier-PKA-Komponenten geklont und charakterisiert. Das Gen welches für die katalytische Komponente der Serin-Threonin-PKA-C3 kodiert, wird als *DC2* bezeichnet (Kalderon & Rubin, 1988). Die Verminderung der PKA-C3-Expression sorgte sowohl mit der Treiberlinie 210Y-, als auch mit 007Y-GAL4 für höchst signifikant mehr erfolgreiche Versuche als bei den Anläufen wildtypischer Fliegen. Die  $+Y;;UAS-PKA-C3^{RNAi}/210Y-GAL4-$  und die  $+Y;;UAS-PKA-C3^{RNAi}/007Y-GAL4-$  Exemplare kletterten mit 40 % erfolglosen Versuchen. Auch bei Verhaltensanalysen mit *PKA-R1<sup>715-</sup>*- und *PKA-R1<sup>11D4-</sup>*-Fliegen konnte eine reduzierte assoziative Lernleistung gezeigt werden (Goodwin et al., 1997). Die Expression der PKA-R1-regulatorischen Untereinheit wurde ebenfalls mittels RNAi blockiert. Geschah dieses in den lateralen Protocerebralbrücken-Neuronen ( $+Y;UAS-PKA-R1^{RNAi/+};210Y-GAL4/+$ ), führte das zu keiner Verhaltensauffälligkeit bei der Körpergrößeneinschätzung. Die  $+Y;UAS-PKA-R1^{RNAi/+};007Y-GAL4/+$ -Fliegen, absolvierten hingegen mit 10 % signifikant mehr erfolgreiche Versuche als ihre wildtypischen Artgenossen. Die Überexpression der PKA-C1 in den 007Y-Neuronen resultierte ebenfalls in einer defizitären Körpergrößeneinschätzung. Diese  $+Y;;UAS-PKA-C1^{F.9}/007Y-GAL4-$  Fliegen versuchten mit einer medianen Häufigkeit von 40 % die zu breite Lücke zu klettern. Im Gegensatz dazu versuchten die  $+Y;;UAS-PKA-C1^{F.9}/210Y-GAL4-$

Männchen mit einer PKA-C1-Überexpression in den lateralen PB-Neuronen, nicht signifikant häufiger erfolglos zu klettern als die wildtypischen Exemplare.



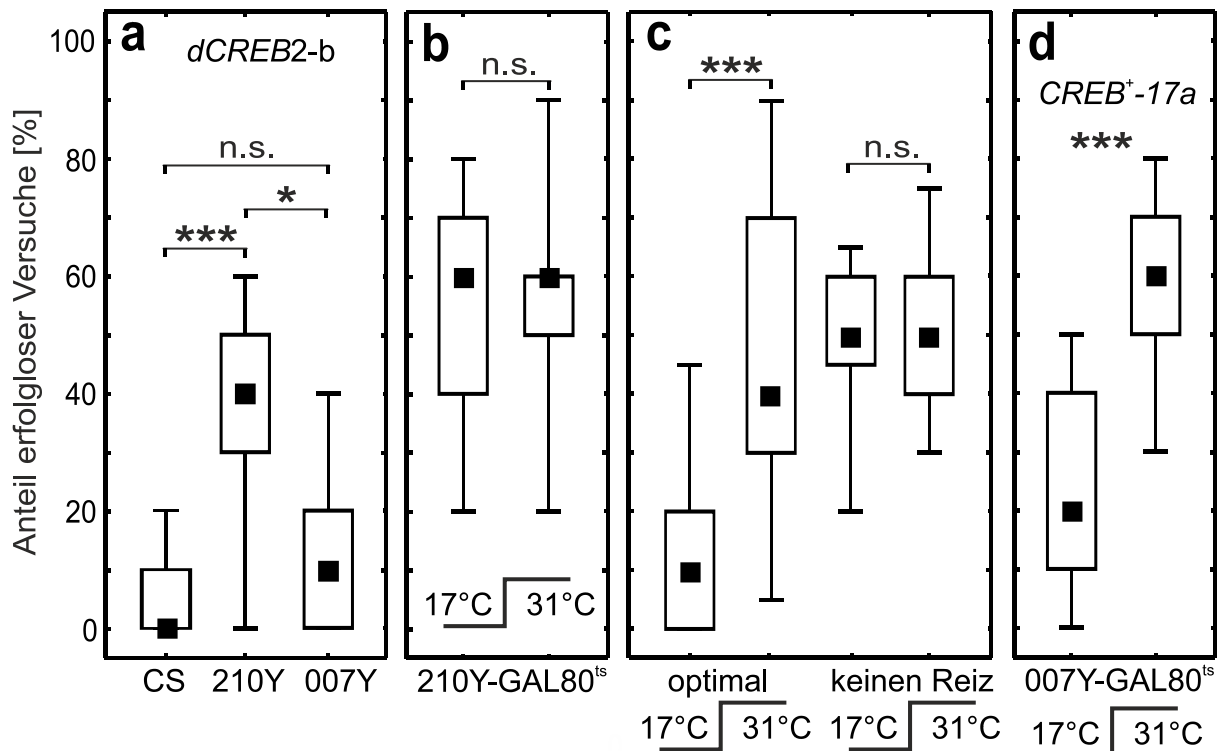
**Abbildung 29: Die Regulierung verschiedener PKA-Untereinheiten**

Die Weibchen der UAS-Linien wurden mit verschiedenen GAL4-Treibermännchen, welche in neuronalen Systemen der Protocerebralbrücke exprimieren, gekreuzt. Die erfolglosen Versuche der a) UAS-*PKA-C1*<sup>RNAi</sup>-, der b) UAS-*PKA-C3*<sup>RNAi</sup>-, der c) UAS-*PKA-R1*<sup>RNAi</sup>- und der d) UAS-*PKA-C1*<sup>+</sup>-Männchen wurden an einer 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median- Darstellung wie in Abbildung 16.

### 3.12 Die Regulierung des Transkriptionsfaktors CREB

Das konsolidierte assoziative Duftgedächtnis benötigt Genexpression, welche über den Transkriptionsfaktor CREB vermittelt wird. Die induzierte Expression einer dominant-negativen Form dieses Transkriptionsfaktors (*dCREB2-b*) störte die Bildung eines Langzeitgedächtnisses (Yin et al., 1994). Die folgenden Experimente dienten dazu die Fragestellung zu beantworten, ob die Gedächtnisbildung der Körperreichweite über den Transkriptionsfaktor CREB realisiert wird (Abbildung 30). Im ersten Schritt wurde die dominant-negative Form in den relevanten PB-Neuronen exprimiert. In den lateralen Neuronen resultierte die Expression in Fliegen, die ihre Körpergröße nicht einschätzen konnten. Die UAS-*dCREB2-b*/Y;;210Y-GAL4/+Männchen versuchten in 40 % der Anläufe die zu breite Lücke zu überwinden. Das dominant-negative CREB bewirkte in kolumnären PB-Neuronen keinen Verhaltensphänotyp. Diese UAS-*dCREB2-b*/Y;;007Y-GAL4/+Männchen waren nicht signifikant erfolgloser als die wildtypischen Artgenossen. Es wurde zusätzlich versucht diese dominant-negative Form von CREB erst im adulten Tier zu induzieren. Allerdings schien bei 17 °C schon so viel exprimiert

zu werden, dass die *UAS-dCREB2-b/Y;;210Y-GAL80<sup>ts</sup>/+*-Fliegen ebenfalls eine mutante Körpergrößeneinschätzung zeigten. Sie versuchten mit 60 % genauso häufig die unüberwindbare Lücke zu klettern, wie die bei 31 °C induzierten Fliegen. Daraufhin wurde versucht mit *Hsp70-GAL4* temperatursensitiv zu induzieren. Die *UAS-dCREB2-b/Y;;Hsp70-GAL4/+*-Fliegen wurden in der Dunkelheit bei 17 °C gehalten bis sie den „optimalen“ visuellen Stimulus erhielten. Die Kontrollen wurden nicht visuell gereizt. Nach diesem optischen Training wurden die Fliegen zurück in die Dunkelheit überführt. Eine Gruppe kam zurück auf 17 °C, während die andere bei 31 °C induziert wurde. Nur die Fliegen, welche „optimal“ trainiert wurden und zusätzlich bei 17 °C geblieben waren, konnten eine wildtypähnliche Körpergrößeneinschätzung mit 10 % erfolglosen Versuchen entwickeln. Die Fliegen, die das „optimale“ Training erhielten, danach jedoch bei 31 °C induziert wurden, verhielten sich mit 40 % Versuchen nicht erfolgreicher als die Exemplare, welche kein Training erhalten hatten. Die temperaturabhängige Expression von *dCREB2-b* störte die Bildung eines Körpergrößengedächtnisses. Daraus folgt, dass für die Konsolidierung des Körpergrößengedächtnisses CREB nach dem Training benötigt wird. In den kolumnären 007Y-Neuronen sollte zusätzlich noch CREB überexprimiert werden. Dieses funktionierte nur mit der örtlichen und zeitlichen Trennung mittels des temperatursensitiven *GAL80<sup>ts</sup>*. Geschah die Expression von Beginn der Entwicklung unter *GAL4*-Kontrolle war dieses für adulte *+Y;;UAS-CREB<sup>+</sup>-17a/007Y-GAL4/+*-Tiere lethal. Die induzierte Überexpression bei 31 °C resultierte in einer eingeschränkten Reichweitereinschätzung. Die *+Y;;UAS-CREB-17a/007Y-GAL80<sup>ts</sup>/+*-Männchen versuchten zu 60 % die unüberwindbare Lücke zu klettern. Vor der Temperaturerhöhung verhielten sich dieselben Individuen mit 20 % Versuchen noch höchst signifikant erfolgreicher in ihrer Einschätzung. Das dominant-negative CREB bewirkte in 007Y-Neuronen jedoch einen wildtypähnlichen Verhaltensphänotyp (Abbildung 30a). Es wäre möglich, dass die 007Y-Neurone nur geringe Mengen an CREB für das Körpergrößengedächtnis benötigen und deswegen die Überexpression für die Bildung des Gedächtnisses schädlich ist.



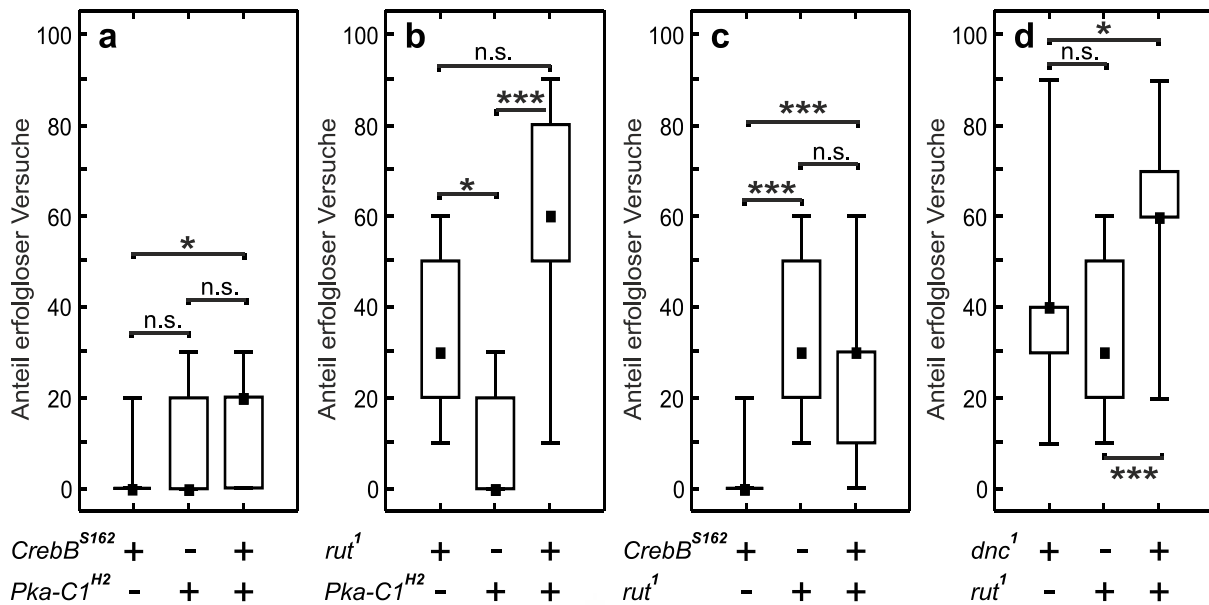
### Abbildung 30: Die unterschiedliche Regulierung von CREB

**a)** Die *UAS-dCREB2-b/+*-Weibchen der Linie wurden mit verschiedenen *GAL4*-Treibern Männchen, welche in neuronalen Systemen der Protocerebralbrücke exprimieren, gekreuzt. Die erfolglosen Versuche der Nachkommen wurden an einer 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert **b)** temperatursensitive Induzierung der dominant negativen Form des Transkriptionsfaktors mittels *GAL80<sup>ts</sup>* **c)** *UAS-dCREB2-b/Y;Hsp70/+* Männchen wurden in der Dunkelheit aufgezogen. Es folgten visuelle Trainingsmöglichkeiten mittels optimaler Stimulation. Unmittelbar nach dem Training erfolgte die Induzierung des Temperaturwechsels **d)** Akute Überexpression von CREB in kolumnären 007Y-Neuronen. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

### 3.13 Die genetischen Interaktionen möglicher cAMP-Ziele

Eine Verhaltensstudie mit doppelt heterozygoten Mutanten sollte die Abhängigkeit zwischen möglichen cAMP-Zielgenen aufdecken. Wegen der Korrelation zwischen der Ausprägung eines Phänotyps und der Stärke eines Signals bewirkt die Mutation einer der beiden diploiden Kopien eines „downstream“-Gens eine zweifache Reduktion der Signalstärke und somit ebenfalls eine Modifizierung des Phänotyps (Karim et al., 1996). Die Mutation einer *CrebB<sup>S162</sup>*-Kopie, welche in der Signalkaskade unterhalb von PKA-C1 liegt, sollte die Signalstärke unterdrücken und somit auch das Körpergrößengedächtnis reduzieren. Es wurden heterozygote bzw. doppelt heterozygote Weibchen mit einer unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke konfrontiert und hinsichtlich ihrer Kletterversuche verglichen (Abbildung 31). Die heterozygoten *CrebB<sup>S162</sup>/+*- und *Pka-C1<sup>H2</sup>/+*-Tiere unternahmen mit einer medianen Häufigkeit von 0% nahezu keine Klet-

terversuche. Beide einfach heterozygoten Genotypen verhielten sich mit einer wildtypischen Körpergrößeneinschätzung. Die *CrebB<sup>S162</sup>/Pka-C1<sup>H2</sup>*-Exemplare mit dem doppelt heterozygoten Genotyp versuchten nach 20 % der Anläufe vergeblich die Lücke zu klettern. Mit diesem Verhalten waren sie signifikant erfolgloser als die *CrebB<sup>S162</sup>/+*-Weibchen, was die Hypothese einer genetischen Interaktion stützen würde. Jedoch verhielten sich die doppelt heterozygoten nicht signifikant schlechter als die einfach heterozygoten *Pka-C1<sup>H2</sup>/+*-Fliegen, was die Vermutung einer genetischen Interaktion widerlegt. Bei dem Interaktionsvergleich zwischen *rut* und *Pka-C1* absolvierten die doppelt heterozygoten *rut<sup>1</sup>/Pka-C1<sup>H2</sup>*-Weibchen den Test mit einem äußerst defizitären Körpergrößengedächtnis. Sie versuchten die zu breite Lücke in 60 % der Anläufe vergeblich zu überqueren. Somit kletterten sie höchst signifikant erfolgloser als die *Pka-C1<sup>H2</sup>/+*-Fliegen, die mit medianen 0 % kaum Versuche unternahmen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die durch *rut*-kodierte AC die PKA aktiviert, um ein Körperreichweitengedächtnis zu formieren. Allerdings versuchten auch die heterozygoten *rut<sup>1</sup>/+*-Weibchen in 30 % der Fälle einen vergeblichen Anlauf. Sie waren nicht signifikant erfolgreicher als die *rut<sup>1</sup>/Pka-C1<sup>H2</sup>*-Gruppe. Dieses Verhalten widerlegte die vermutete genetische Interaktion zwischen *rut<sup>1</sup>* und *Pka-C1<sup>H2</sup>*. In der Vergleichsstudie zwischen *rut* und *CREB* kamen ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse, die für eine Interaktion sprächen, zu Stande. Die *rut<sup>1</sup>/CrebB<sup>S162</sup>*-Weibchen verhielten sich mit medianen 30 % zwar höchst signifikant erfolgloser als der heterozygote *CrebB<sup>S162</sup>*-Genotyp, lagen jedoch auf dem gleichen Niveau wie die *rut<sup>1</sup>/+*-Weibchen. Die einzige eindeutige Interaktion stellte sich zwischen *rut<sup>1</sup>* und *dnc<sup>1</sup>* dar. Die *rut<sup>1</sup>/+*- und *dnc<sup>1</sup>/+*-Fliegen versuchten zwar mit medianen 30 % bzw. 40 % die nicht passierbare Lücke zu überqueren, zeigten sich mit diesem Verhalten trotzdem erfolgreicher als ihre doppelt heterozygoten *rut<sup>1</sup>/dnc<sup>1</sup>*-Artgenossen, welche in 60 % der Anläufe vergeblich versuchten zu überqueren. Es blieb nach diesen Experimenten mit den doppelt heterozygoten Mutanten weiterhin die Frage offen, inwiefern *rut*, *Pka-C1* und *CrebB* genetisch interagieren, um ein Körpergrößengedächtnis zu formieren.



### Abbildung 31: Heterozygote und doppelt heterozygote cAMP-Zielgene

Weibliche doppelt heterozygote Fliegen wurden mit einer unüberwindlichen 5,0 mm breiten Lücke konfrontiert. Für die einfach heterozygoten Kontrollen wurden Männchen der Mutationslinien mit jungfräulichen CS-Weibchen gekreuzt. Die erfolglosen Versuche der Nachkommen wurden quantifiziert. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

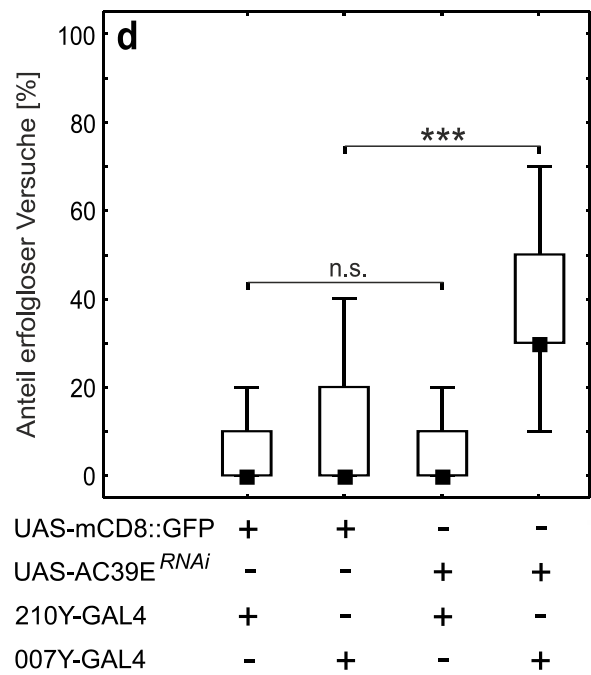
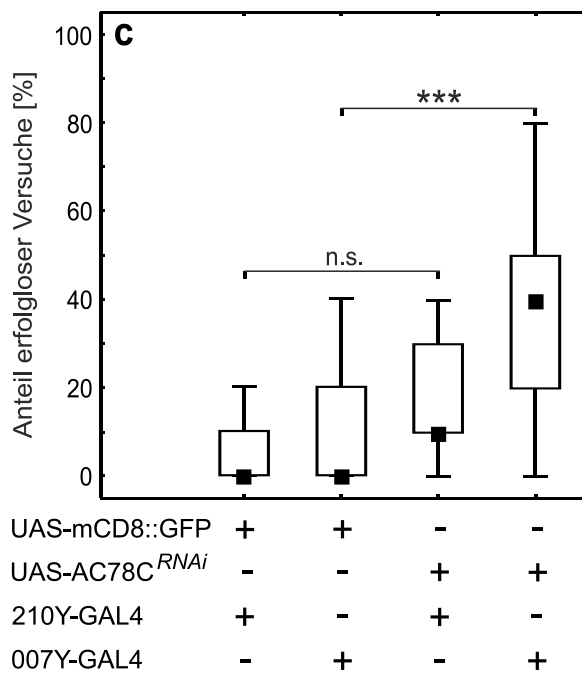
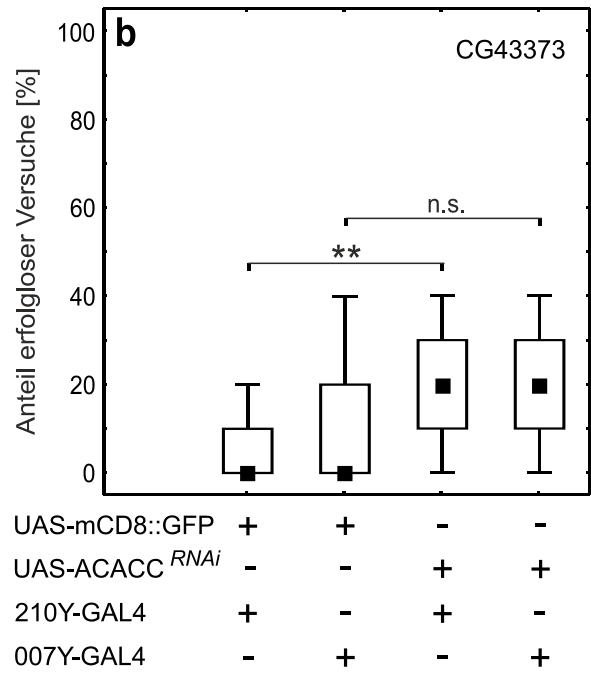
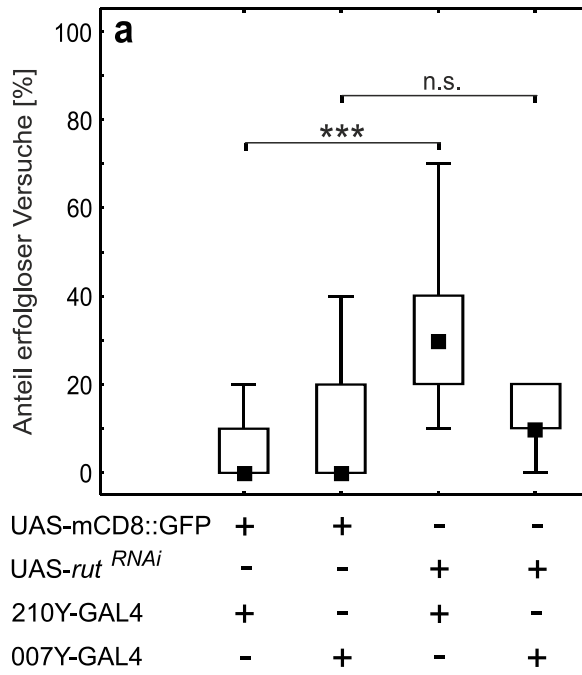
## 3.14 Die Auswirkung verschiedener Adenylylzyklen

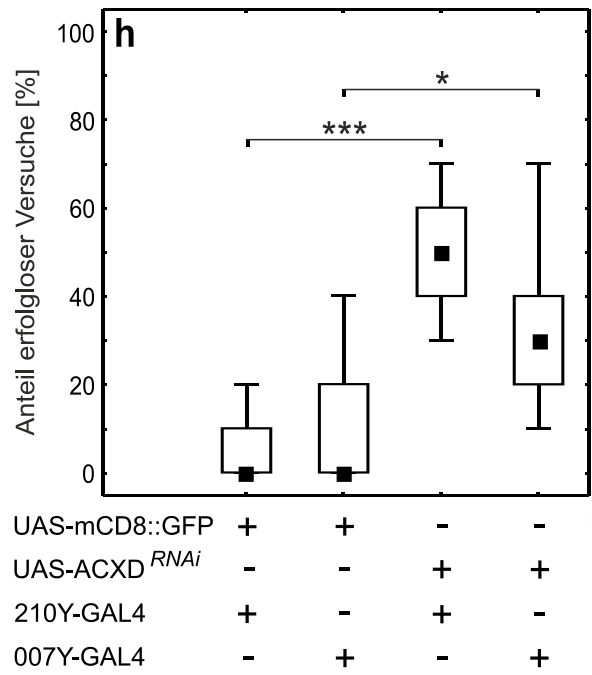
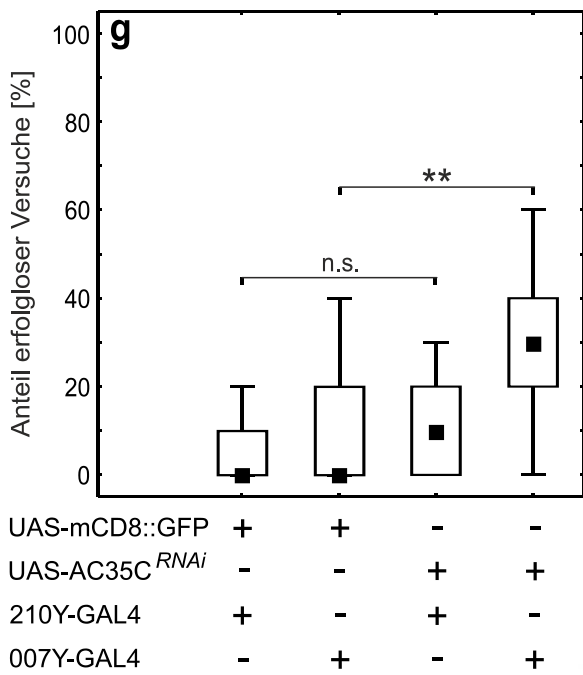
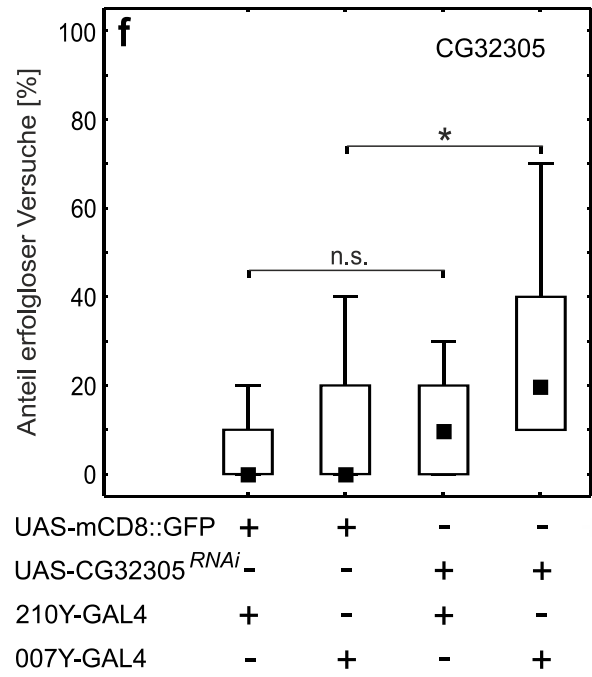
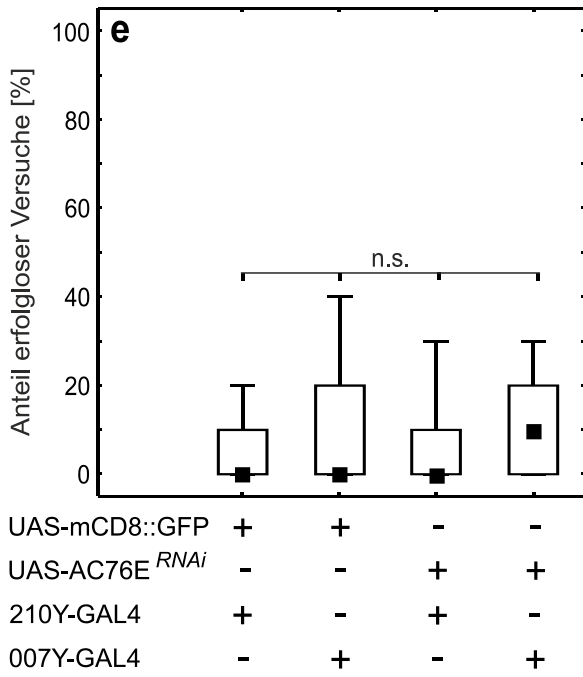
Die Vielzahl an vorherigen erstaunlichen Ergebnissen, die darauf hinwiesen, dass *rut* und *dnc* für das Körpergrößenerlernen in unterschiedlichen Neuronengruppen der PB benötigt werden, zog die Frage nach sich, ob andere ACs und PDEs in denselben Neuronen beteiligt wären. In den M-Schrittmachern, die für die circadiane Rhythmik verantwortlich sind, wurde mittels RNAi-Experimenten ein Beispiel für einen *rut*-unabhängigen Anstieg der cAMP-Konzentration gefunden (Duvall & Taghert, 2012). Es wurden mittels RNAi die weiteren Enzyme mit AC-Aktivität in den 210Y- und den 007Y-Neuronen herunter reguliert. Die Reichweiteinschätzung der entsprechenden Fliegen wurde wie in den vorherigen Abschnitten an der unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke getestet. Als Kontrollen dienten Tiere, bei denen in denselben Neuronen *mcD8::GFP* exprimiert wurde. Die *+Y;UAS-mCD8::GFP/+;210Y-GAL4/+* und die *+Y;UAS-mCD8::GFP/+;210Y-GAL4/+*-Männchen sollten sich dementsprechend wildtypisch verhalten. Mittels RNAi wurde *rut* in den PB-Neuronen herunter reguliert (Abbildung 32a). Das Körpergrößengedächtnis war nur bei den *+Y;;UAS-rut<sup>RNAi</sup>/210Y-GAL4*-Fliegen eingeschränkt. Sie versuchten zu 30 % die 5,0 mm breite Lücke zu

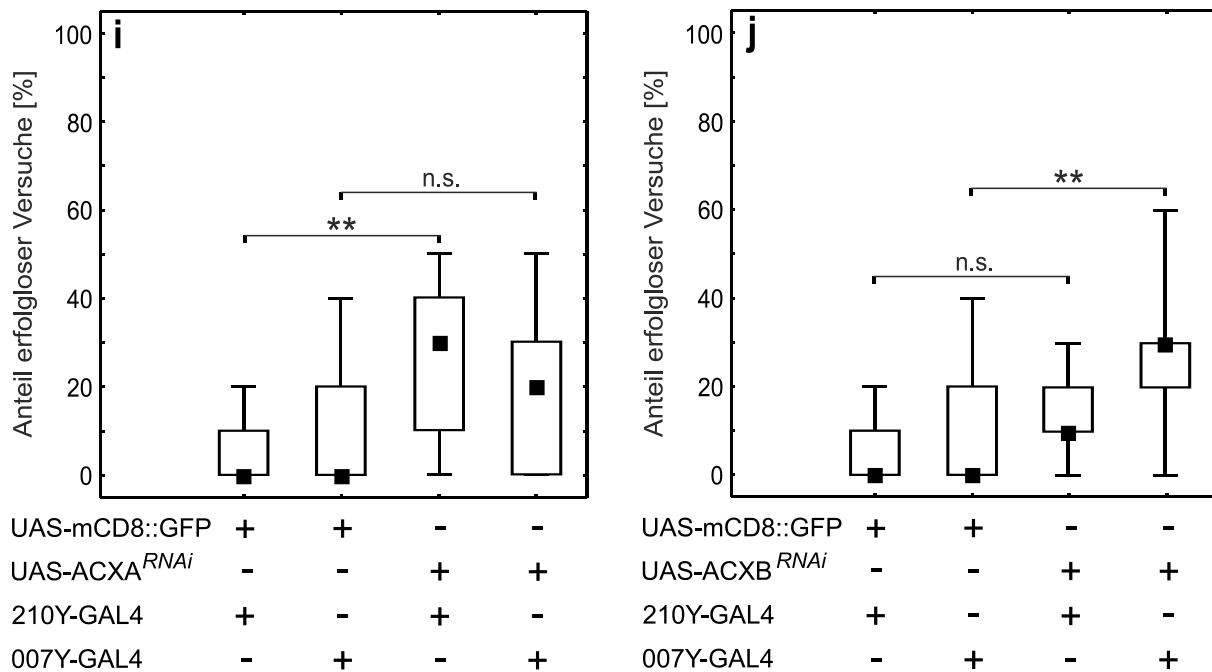
überqueren. Die Artgenossen, bei denen in denselben Neuronen mCD8::GFP exprimiert wurde, zeigten sich in ihrer Einschätzung höchst signifikant erfolgreicher. Sie versuchten mit einer medianen Häufigkeit von 0 % die unüberwindbare Lücke zu klettern. Die +/Y;;UAS-*rut*<sup>RNAi</sup>/007Y-GAL4-Expression führte zu keinem auffälligen Verhaltensphänotyp. Sie kletterten mit 10 % der Anläufe nicht signifikant erfolgloser als die GFP-Kontrolle mit 0 %. Eine geringe Einschränkung des Körpergrößengedächtnisses trat auf, wenn die Expression der ACCG43373 mittels *RNAi* vermindert wurde (Abbildung 32b). Diese Adenylylzyklase wird auch als ACACC bezeichnet und weist Homologien mit den Vertebraten ACs 5 & 6 auf (Heindorff et al., 2012). Sowohl die +/Y;UAS-ACCG4337<sup>RNAi</sup>/+;210Y-GAL4/+ -Fliegen, als auch die +/Y;UAS-ACCG4337<sup>RNAi</sup>/+;007Y-GAL4/+ -Männchen kletterten mit 20 % erfolglosen Versuchen die unüberwindbare Lücke vergeblich. Allerdings wies nur der statistische Vergleich des 210Y-Datensatzes mit der entsprechenden GFP-Kontrolle einen hoch signifikanten Unterschied auf. Eine eindeutige Einschränkung der Reichweiteinschätzung lieferte die Expression von AC78C<sup>RNAi</sup> mit dem 007Y-Treiber (Abbildung 32c). Diese männlichen +/Y;UAS-AC78C<sup>RNAi</sup>/+;007Y-GAL4/+ -Fliegen versuchten bei 40 % der Anläufe die unüberwindliche Lücke zu überqueren, was sich mit einem höchst signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle darstellte. Der +/Y;UAS-AC78C<sup>RNAi</sup>/+;210Y-GAL4/+ -Genotyp führte zu keinem auffälligen Kletterphänotyp. Die AC78C gilt als Homologie zur Vertebraten-AC8 (Heindorff et al., 2012). Ein ähnliches Verhalten resultierte in der Expression von AC39E<sup>RNAi</sup> (Abbildung 32d). Die +/Y;;UAS-AC39E<sup>RNAi</sup>/007Y-GAL4-Fliegen absolvierten 30 % der Versuche erfolglos. Sie trafen somit höchst signifikant mehr „Fehlentscheidungen“ als die GFP-Kontrolltiere. Wenn diese *RNAi* jedoch mit 210Y getrieben wurde, unternahmen die +/Y;;UAS-AC39E<sup>RNAi</sup>/210Y-GAL4-Insekten nahezu keine Kletterversuche an der unüberwindbaren Lücke. Es traten keine signifikanten Effekte auf, wenn *RNAi* der AC76E in der Protocerebralbrücke exprimiert wurde (Abbildung 32e). Die AC76E weist Homologien zu der Vertebraten-AC2, 4, und 7 auf (Heindorff et al., 2012). Die +/Y;UAS-AC76E<sup>RNAi</sup>/+;210Y-GAL4/+ - und die +/Y;UAS-AC76E<sup>RNAi</sup>/+;007Y-GAL4/+ -Fliegen verhielten sich wildtypähnlich an der 5,0 mm breiten Lücke. Der Genotyp von +/Y;UAS-ACCG32305<sup>RNAi</sup>/+;007Y-GAL4/+ hatte hingegen einen geringen Effekt auf die erfolglosen Kletterversuche, welche bei 20 % lagen und signifikant häufiger auftraten als bei der GFP-Kontrolle in denselben Neuronen (Abbildung 32f). Die +/Y;UAS-ACCG32305<sup>RNAi</sup>/+;210Y-GAL4/+ -Männchen wiesen keinen signifikant unterschiedlichen Verhaltensphänotyp auf. Erfolgreiche Versuche kamen nur bei 10 % der Anläufe vor. Die ACCG32305 wurde allerdings genauso wie die ACXA als gonadenspezifisch eingestuft (Duvall & Taghert, 2012). Es könnte sich somit auch um

„off-target-Effekte“ handeln. Die ACCG32305 ist bislang zu keiner Adenylylzyklase bei Vertebraten als homolog eingestuft worden (Duvall & Taghert, 2013). Bei dem  $+Y;UAS-AC35C^{RNAi/+};007Y-GAL4/+$ -Genotyp resultierten ebenfalls Individuen mit einer eingeschränkten Körpergrößeneinschätzung (Abbildung 32g). Sie versuchten hoch signifikant unterschiedlich zur GFP-Kontrolle bei 30 % der Anläufe die unüberwindbare Lücke zu erklimmen. Die  $+Y;UAS-AC35C^{RNAi/+};210Y-GAL4/+$ -Fliegen verhielten sich mit 10 % erfolglosen Versuchen wildtypähnlich. Die AC35C gilt als homolog zur Vertebraten-AC9 (Heindorff et al., 2012). Das offene Leseraster der ACX-Gene repräsentiert eine Genfamilie im *Drosophila*-Genom, welche keine Homologien zu den Vertebraten-ACs aufweist (Cann et al., 2000). Die meisten erfolglosen Versuche aller verwendeten RNAs der ACs erzielten die  $+Y;;UAS-ACXD^{RNAi}/210Y-GAL4$ -Fliegen, die 50 % erfolglose Versuche absolvierten (Abbildung 32h). Auch bei dem  $+Y;;UAS-ACXD^{RNAi}/007Y-GAL4$ -Genotyp resultierten Fliegen, die an der unüberwindbaren Lücke mit 30 % signifikant erfolgloser kletterten als die GFP-Kontrollen. Die  $+Y;UAS-ACXA^{RNAi/+};210Y-GAL4/+$ -Exemplare hatten ebenfalls eine eingeschränkte Reichweitereinschätzung (Abbildung 32i). Sie unternahmen bei 30 % der Anläufe einen erfolglosen Kletterversuch. Der Genotyp von  $+Y;UAS-ACXA^{RNAi/+};007Y-GAL4/+$  bewirkte Fliegen mit 20 % erfolglosen Versuchen an der zu breiten Lücke. Allerdings war dieses Verhalten nicht signifikant unterschiedlich zu dem der GFP-Kontrolltiere. Eine komplementäre Verhaltensweise stellte sich bei der Expression von  $ACXB^{RNAi}$  dar (Abbildung 32j). Die  $+Y;UAS-ACXB^{RNAi/+};007Y-GAL4/+$ -Fliegen absolvierten 30 % erfolglose Versuche, während die  $+Y;UAS-ACXB^{RNAi/+};210Y-GAL4/+$ -Individuen nur 10 % der Anläufe erfolglos hinter sich brachten. Die Hypothese, dass in den 007Y-Neuronen, in denen die defizitäre Körpergrößeneinschätzung der *dnc*<sup>1</sup>-Fliegen gerettet werden konnte, nur eine andere Adenylylzyklase als die durch *rut*-kodierte AC eine Rolle spielen würde, bestätigte sich nicht. Die Regulierungen mittels RNAi verschiedener ACs in diesen Neuronentypen bewirkten sowohl Verhaltensphänotypen wie *rut*<sup>RNAi</sup>, als auch welche, die sich wie *dnc*<sup>RNAi</sup> verhielten (zusammengefasst in Tabelle 3).









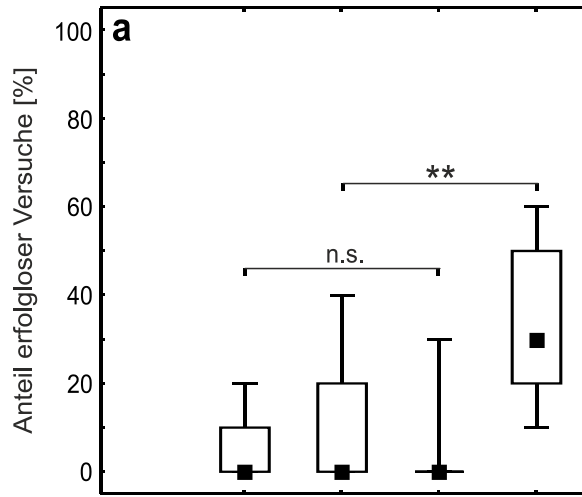
### Abbildung 32: Die Verminderung der Expression verschiedener ACs

**a-j)** Die Weibchen der UAS-AC<sup>RNAi</sup>-Linien wurden mit verschiedenen GAL4-Treiber Männchen, welche in neuronalen Systemen der Protocerebralbrücke exprimieren, gekreuzt. Als Kontrolle wurde die Expression von UAS-mCD8::GFP in denselben Neuronen gewählt. Die erfolglosen Versuche der Nachkommen wurden an einer 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert. Pro Datensatz: N = 15, n = 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

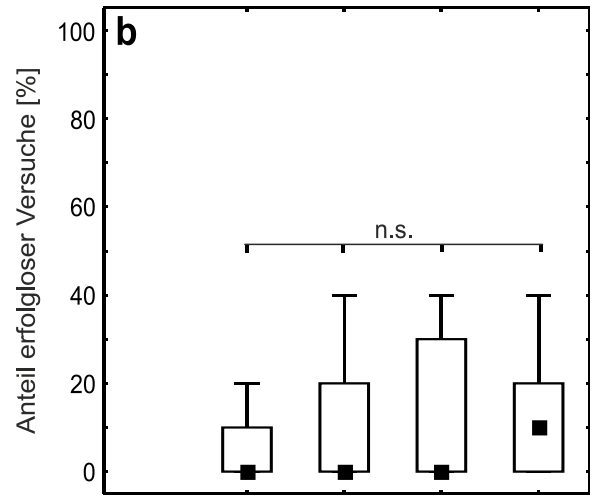
## 3.15 Die Auswirkung verschiedener Phosphodiesterasen

Die Vielzahl an vorherigen Ergebnissen, die darauf hinwiesen, dass *rut* und *dnc* für das Körpergrößelernen in unterschiedlichen Neuronengruppen der PB benötigt werden, führte zu der Hypothese, dass in den *rut*-abhängigen 210Y-Neuronen eine andere PDE als die *dnc*-kodierte PDE4 für die cAMP-Hydrolyse verantwortlich sein könnte. Von den bekannten PDEs bei *Drosophila* gelten die PDE1c und die PDE11 als dual spezifisch für cAMP und cGMP. Die PDE6 zeigt hingegen spezifische Hydrolyseaktivität von cGMP. Die PDE4 (*dnc*), PDE8 und PDE9 arbeiten jedoch spezifisch für cAMP (Day et al., 2005). In den folgenden Experimenten wurden die verschiedenen PDE-Aktivitäten mittels RNAi in den für das Körpergrößelgedächtnis relevanten Neuronengruppen reguliert. Bei dem Genotyp von  $+Y;UAS-dnc^{RNAi}/+;007Y-GAL4/+$  resultierten Fliegen, welche mit 30 % die unüberwindbare Lücke erfolglos anliefen (Abbildung 33a). Sie verhielten sich hoch signifikant unterschiedlich zu den Kontrolltieren, bei denen GFP in denselben Neuronen getrieben wurde. Die  $+Y;UAS-mCD8::GFP/+;007Y-GAL4/+$ -Männchen vollführten mit 0 % nahezu keine Kletterversuche an der zu breiten 5,0 mm Lücke. Die  $+Y;UAS-dnc^{RNAi}/+;210Y-GAL4/+$ -Fliegen hatten einen wildtypähn-

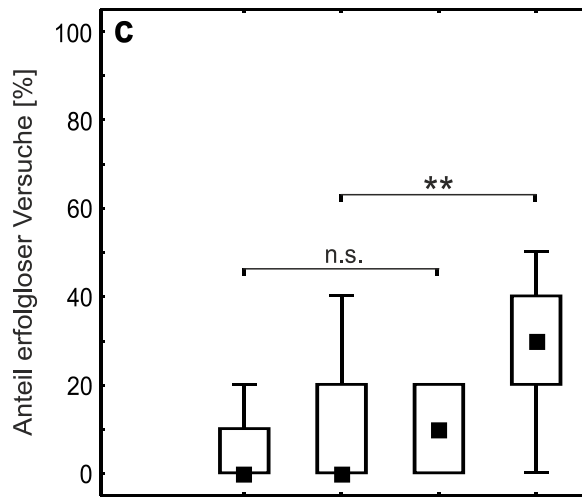
lichen Kletterphänotyp mit 0 % erfolglosen Versuchen. Es traten ebenfalls keine signifikanten Effekte auf, wenn RNAi der PDE1c in der Protocerebralbrücke exprimiert wurde (Abbildung 33b). Sowohl die  $+Y;;UAS-PDE1C^{RNAi}/210Y-GAL4-$ , als auch die  $+Y;;UAS-PDE1C^{RNAi}/007Y-GAL4-$  Fliegen unternahmen kaum Versuche an der unüberwindbaren Lücke. Als Resultat der RNAi-Expression von PDE6 stellte sich hingegen ein ähnliches Bild wie bei  $dnc^{RNAi}$  dar (Abbildung 33c). Der  $+Y;;UAS-PDE6^{RNAi}/007Y-GAL4-$  Genotyp bewirkte 30 % erfolglose Kletterversuche, während die  $+Y;;UAS-PDE6^{RNAi}/210Y-GAL4-$  Männchen sich nicht signifikant unterschiedlich zur GFP-Kontrolle verhielten. Im Gegensatz dazu bewirkte die Expression der  $PDE8^{RNAi}$  mittels 210Y eine eingeschränkte Körpergrößeneinschätzung (Abbildung 33d). Die  $+Y;UAS-PDE8^{RNAi}/+;210Y-GAL4/+$ -Insekten versuchten mit 40 % höchst signifikant erfolgloser die 5,0 mm breite Lücke zu überqueren als die Individuen, bei denen GFP in denselben Neuronen exprimiert wurde. Der Genotyp von  $+Y;UAS-PDE8^{RNAi}/+;007Y-GAL4/+$  führte hingegen zu einem wildtypähnlichen Kletterphänotyp. Die meisten erfolglosen Kletterversuche bei der Regulierung der Phosphodiesterasen entstanden jedoch bei der Expression von  $PDE9^{RNAi}$  (Abbildung 33e). Die  $+Y;;UAS-PDE9^{RNAi}/210Y-GAL4-$  Männchen versuchten nach 60 % der Anläufe höchst signifikant häufiger die unüberwindliche Lücke zu klettern als die GFP-Kontrollfliegen. Der  $+Y;;UAS-PDE9^{RNAi}/007Y-GAL4-$  Genotyp resultierte zwar mit 20 % erfolglosen Versuchen in einer leicht eingeschränkten Körpergrößeneinschätzung, jedoch stellte sich diese als nicht signifikant unterschiedlich zu den entsprechenden Kontrolltieren heraus. Die Expression der  $PDE11^{RNAi}$  in der PB führte mit beiden Treiberlinien zu Fliegen mit eingeschränkter Körpergrößeneinschätzung (Abbildung 33f). Die  $+Y;;UAS-PDE11^{RNAi}/210Y-GAL4-$  und die  $+Y;;UAS-PDE9^{RNAi}/007Y-GAL4-$  Männchen versuchten in 50 % der Fälle die unüberwindbare Lücke zu überqueren, was sich in einem höchst signifikanten Unterschied zu den Exemplaren mit GFP-Expression manifestierte. Somit spielen in den 210Y-Neuronen, in denen die defizitäre Körpergrößeneinschätzung der  $rut^1$ -Fliegen gerettet werden konnte, sowohl die PDE8 als auch die PDE9 eine relevante Rolle. Diese zeigten bei der RNAi-Regulierung einen komplementären Verhaltensphänotyp zu  $dnc$ . Die Hypothese, dass in den 210Y-Neuronen, nur eine andere PDE als die durch  $dnc$ -kodierte PDE4 eine Rolle spielen würde, bestätigte sich nicht. Die Regulierungen mittels RNAi verschiedener PDEs in diesen Neuronentypen bewirkten sowohl Verhaltensphänotypen wie  $rut^{RNAi}$ , als auch welche, die sich wie  $dnc^{RNAi}$  verhielten (zusammengefasst in Tabelle 3).



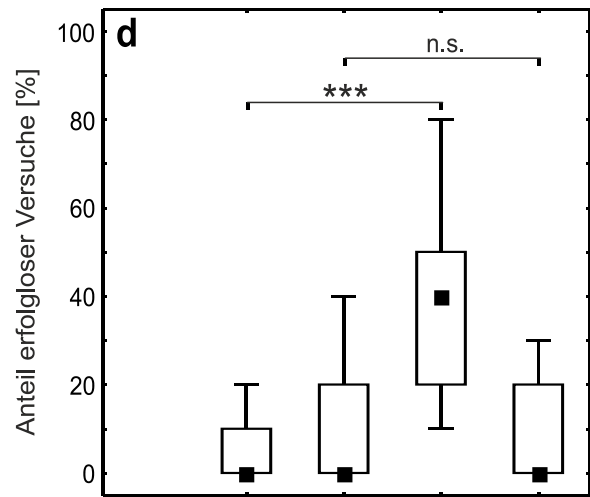
UAS-mCD8::GFP	+	+	-	-
UAS- <i>dnc</i> <sup>RNAi</sup>	-	-	+	+
210Y-GAL4	+	-	+	-
007Y-GAL4	-	+	-	+



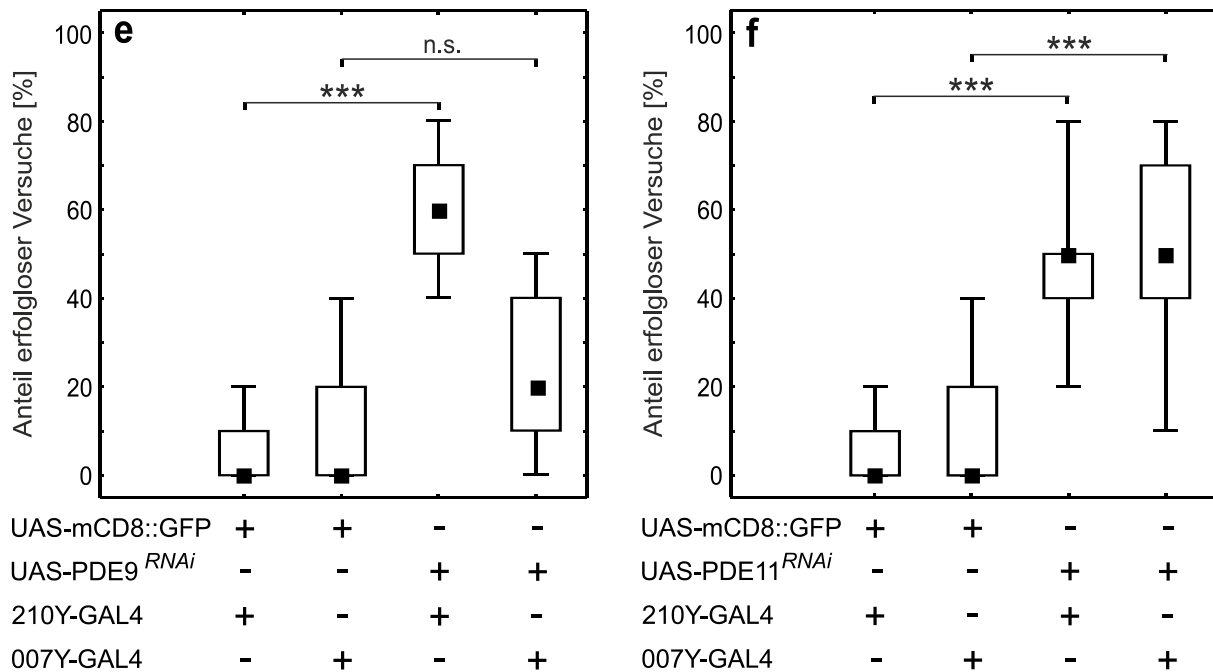
UAS-mCD8::GFP	+	+	-	-
UAS-PDE1c <sup>RNAi</sup>	-	-	+	+
210Y-GAL4	+	-	+	-
007Y-GAL4	-	+	-	+



UAS-mCD8::GFP	+	+	-	-
UAS-PDE6 <sup>RNAi</sup>	-	-	+	+
210Y-GAL4	+	-	+	-
007Y-GAL4	-	+	-	+



UAS-mCD8::GFP	+	+	-	-
UAS-PDE8 <sup>RNAi</sup>	-	-	+	+
210Y-GAL4	+	-	+	-
007Y-GAL4	-	+	-	+



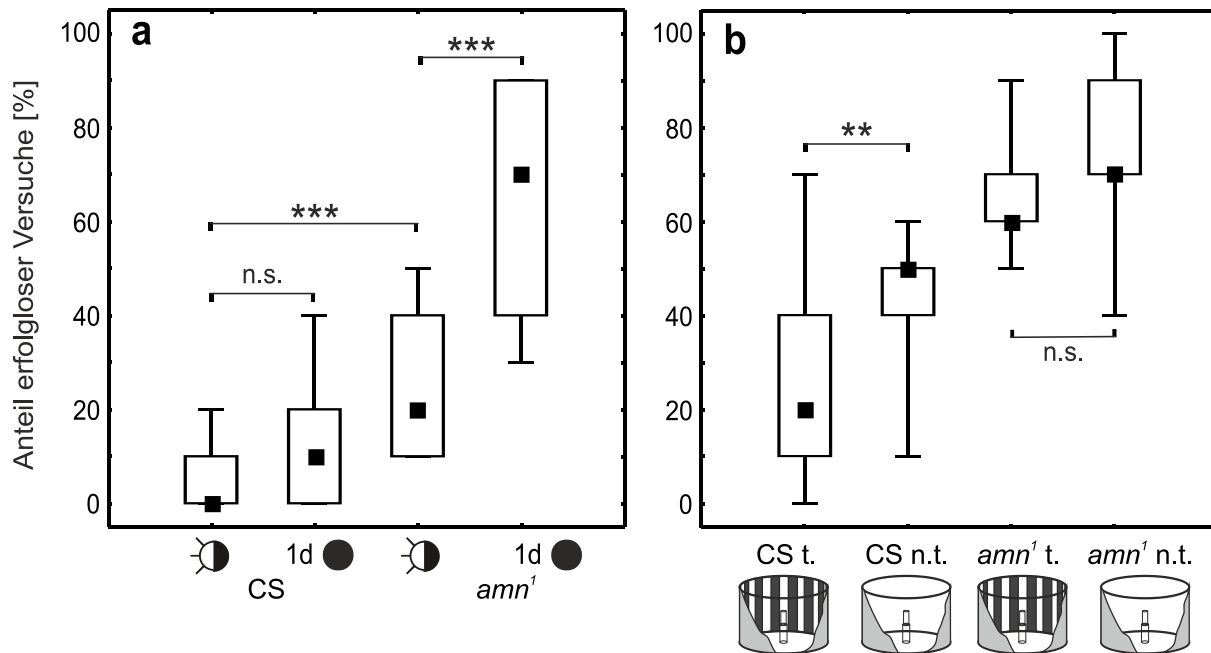
### Abbildung 33: Die Verminderung der Expression verschiedener PDEs

**a-f)** Die Weibchen der UAS-PDE<sup>RNAi</sup>-Linien wurden mit verschiedenen GAL4-Treiber-männchen, welche in neuronalen Systemen der Protocerebralbrücke exprimieren, gekreuzt. Als Kontrolle wurde die Expression von UAS-mCD8::GFP in denselben Neuronen gewählt. Die erfolglosen Versuche der Nachkommen wurden an einer 5,0 mm breiten Lücke quantifiziert. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median- Darstellung wie in Abbildung 16.

## 3.16 Die Rolle von *amnesiac* beim Körpergrößenlernen

Der *amnesiac*<sup>1</sup>-Stamm ging aus einer Ethylmethansulfonatbehandlung hervor und war einer der ersten, welcher als lernmutant beschrieben wurde. Diese Fliegen sind zwar in der Lage ein kurzzeitiges assoziatives Duftgedächtnis auszubilden, vergessen es jedoch innerhalb einer Stunde nach dem Training wieder (Quinn et al., 1979). Es stellte sich somit die Frage, welche Auswirkungen dieses durch *amn*-kodierte PACAP (Pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide) ähnliche Neuropeptid auf das Lernen der Körperreichweite hat (Hashimoto et al., 2002). Es lag die Vermutung nahe, dass *amn*<sup>1</sup>-Fliegen zwar in der Lage sind ihre Körpergröße zu lernen, diese jedoch nicht in ein Langzeitgedächtnis formieren können. Es wurden unter Standard-Belichtungsbedingungen aufgezogene adulte Fliegen in die komplette Dunkelheit überführt, um ihnen die visuelle Rückmeldung zu verwehren (Abbildung 34a). Die CS-Fliegen, die sich für einen Tag im Dunkeln befunden hatten, versuchten die zu breite Lücke nicht signifikant häufiger zu überqueren als diejenigen, welche direkt aus dem Hellen kamen. Mit 10 % der Anläufe traten nur wenige erfolglose Versuche auf. Die direkt aus dem Licht genommenen *amn*<sup>1</sup>-Fliegen absolvierten zwar bei 20 % der Anläufe einen

Kletterversuch, damit verhielten sie sich jedoch lange nicht so erfolglos wie ihre Artgenossen desselben genetischen Hintergrundes nach einem Tag Dunkelheit. Diese *amn<sup>1</sup>*-Männchen versuchten mit 70 % höchst signifikant häufiger die unüberwindbare Lücke zu klettern. Es schien so, als wären *amn<sup>1</sup>*-Fliegen durchaus zu der Bildung eines Körpergrößengedächtnisses in der Lage, vergäßen dieses allerdings ohne visuelle Rückmeldung wieder. Deswegen wurde ein definiertes Trainingsexperiment abgeschlossen. Dunkel aufgezogene Fliegen wurden mit einem „optimalen“ 24°-Streifenzyylinder 15 min lang visuell stimuliert. Die dazugehörige Kontrolle hatte einen kontrastlosen weißen Zylinder zur Verfügung. Die „optimal“ stimulierten CS-Fliegen zeigten 10 min später an der 5,0 mm breiten Lücke hoch signifikant weniger erfolgreiche Versuche als die Individuen der wildtypischen Gruppe, die sich vorher in dem weißen Zylinder befanden. Die letzteren versuchten bei 50 % der Anläufe die unüberwindbare Lücke zu überqueren, während die „optimal“ stimulierten Insekten nur in 20 % der Fälle einen aussichtslosen Versuch absolvierten. Die *amn<sup>1</sup>*-Fliegen konnten mittels visueller Stimulation ihre Körperreichweite nicht innerhalb von 15 min lernen. Sie verhielten sich mit 60 % versuchten Überquerungen 10 min nach der Reizung nicht signifikant erfolgreicher als die Artgenossen, die vorher in dem weißen Zylinder trainiert wurden. Im Gegensatz zu der uneingeschränkten Lernleistung beim Dufttraining, scheint das Lernen der Körperreichweite von *amn<sup>1</sup>* eingeschränkt zu sein. Die *amn<sup>1</sup>*-Fliegen, welche unter normalen Beleuchtungsbedingungen aufgezogen wurden, können ihre Körperreichweite jedoch bei einem Kletterversuch berücksichtigen. Sie benötigen vermutlich ein länger andauerndes Training und eine Wiederholungsrate, um ein kurzzeitiges Körperreichweitengedächtnis zu bilden, welches nicht in ein Langzeitgedächtnis formiert wird.



**Abbildung 34: Die Auswirkungen von *amn*<sup>1</sup> auf das Kletterverhalten**

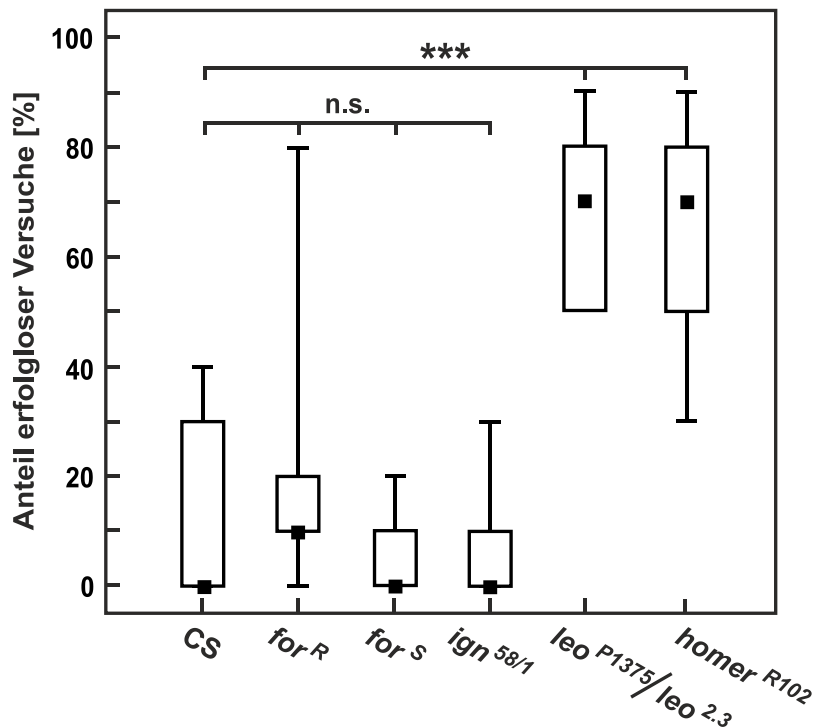
Adulte, unter normalen Beleuchtungsbedingungen gehaltene, drei Tage alte CS- bzw. *amn*<sup>1</sup>-Männchen wurden mit einer 5,0 mm breiten Lücke konfrontiert. Verglichen wurden sie mit Fliegen, die genauso gehalten wurden, sich jedoch einen Tag vor dem Experiment in der kompletten Dunkelheit befunden hatten. **b**) CS- und *amn*<sup>1</sup>-Fliegen wurden in der Dunkelheit aufgezogen und anschließend entweder mit einem „optimalen“ 24°-Streifenmuster (t.), oder mit einem weißen Zylinder (n.t.) trainiert. Die Quantifizierung der erfolglosen Versuche erfolgte 10 Minuten nach dem Training ebenfalls an der 5,0 mm breiten Lücke. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

### 3.17 Die Kandidaten weiterer Signalwege beim Körpergrößenlernen

Es wurden weitere Mutationslinien an unüberwindbaren Lücken getestet, die bei verschiedenen Lernparadigmen verhaltensauffällige Phänotypen gezeigt hatten. Diese Experimente sollten die Frage klären, ob weitere Signalwege bei der Formierung eines Körperreichweitengedächtnisses beteiligt sind. Das *foraging*-Gen kommt in zwei natürlichen Varianten bei *Drosophila* vor und kodiert für die cGMP-abhängige Proteinkinase. Die *foraging*<sup>Rover-</sup> (*for*<sup>R</sup>) Larven wurden so benannt, weil sie auf einer Hefepatte erheblich längere Wege beim Futtersuchverhalten absolvieren als die *foraging*<sup>Sitter-</sup> (*for*<sup>S</sup>) Larven. In Extrakten ganzer adulter Köpfe wurde eine 12 % geringere PKG-Aktivität in *for*<sup>S</sup>-Tieren nachgewiesen (Sokolowski, 1980; Osborne et al., 1997). Diese Fliegen haben dadurch Defizite im assoziativen olfaktorischen Lernen (Mery et al., 2007) und bei ihrem Orientierungsgedächtnis (Kuntz et al., 2012). Ein ebenso eingeschränktes Orientierungsgedächtnis zeigen lernmutante *ignorant*<sup>58/1-</sup> (*ign*<sup>58/1</sup>) Fliegen. Das *ignorant*-Gen kodiert für eine S6KII-Kinase, die unter anderem mit dem operanten Lernen in der Hitzebox assoziiert wird (Neuser et al., 2008; Putz et al., 2004). Sowohl



*for<sup>R</sup>*-, *for<sup>S</sup>*-, als auch *ign<sup>58/1</sup>*-Fliegen wiesen jedoch keine defizitäre Körpergrößeneinschätzung auf. Sie investierten nicht signifikant häufiger in erfolglose Kletterversuche als die wildtypische CS-Kontrolle. Die *for<sup>R</sup>*-Männchen versuchten nur nach 10 % der Anläufe einen vergeblichen Kletterversuch, während die Individuen der *for<sup>S</sup>*- und *ign<sup>58/1</sup>*-Stämme ähnlich den wildtypischen Insekten nach medianen 0 % der Anläufe versuchten die Lücke zu klettern. Einen ganz anderen Verhaltensphänotyp stellten die Fliegen von *leonardo<sup>P1375/leonardo<sup>2.3</sup></sup>* und von *homer<sup>R102</sup>* dar. Die Männchen dieser Genotypen hatten ein äußerst eingeschränktes Körpergrößengedächtnis. Sie versuchten mit einer medianen Häufigkeit von 70 % die unüberwindbare Lücke zu überschreiten. Damit verhielten sie sich höchst signifikant erfolgloser als die wildtypische Kontrolle. Das *leonardo*- Genprodukt kodiert für ein sogenanntes 14-3-3 $\xi$ -Protein und wurde auffällig, weil Mutanten Defizite beim assoziativen olfaktorischen Lernen aufweisen. Diese 14-3-3 $\xi$ -Proteine phosphorylieren RAF-1 im MAPK- (mitogen activated protein kinase) Signalweg (Skoulakis & Davis, 1996). Auch Homer wird vermutlich von der MAPK hoch reguliert und benötigt die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (Miyashita et al., 2012).



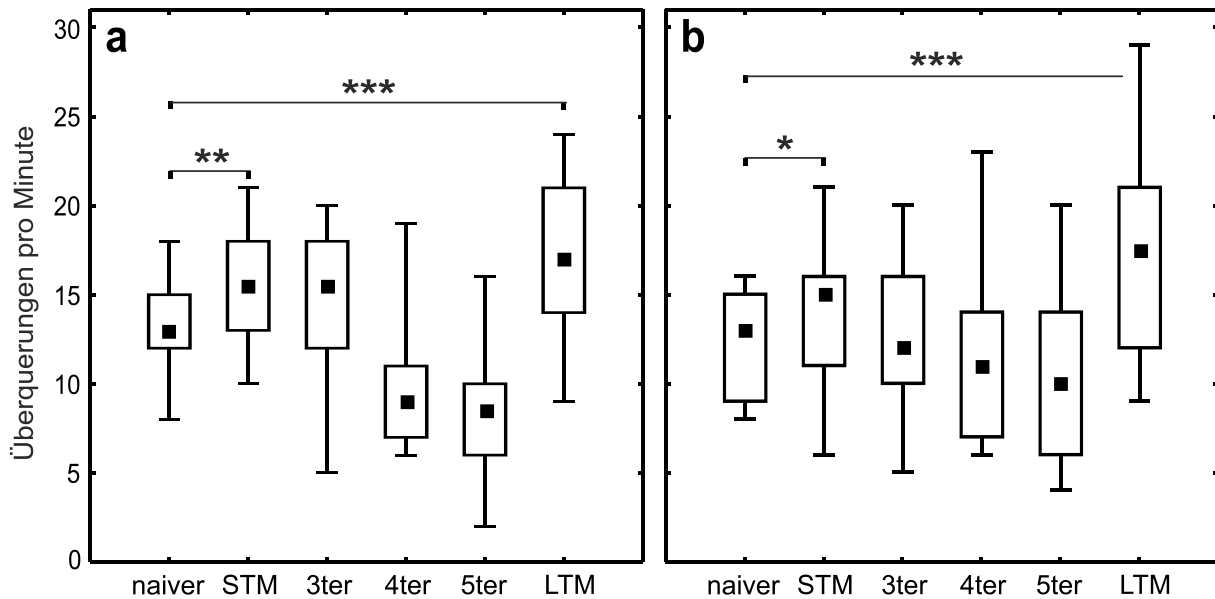
**Abbildung 35: Kletterversuche von Lernmutationslinien**

Männliche Fliegen verschiedener Stämme, die in anderen Paradigmen als lernmutant aufgefallen waren, wurden mit einer unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke konfrontiert. Als Kontrolle dienten wildtypische CS- Männchen. Pro Datensatz: N= 15, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

### 3.18 Das motorische Lernen beim Überqueren von Lücken

Ein rotierender Ring mit 8 symmetrisch verteilten Lücken wurde verwendet, um *Drosophila* zu trainieren. Als Generierung eines optischen Flusses diente ein Streifenzyylinder, der sich um den Aufbau befand. Der Drang, dieser optomotorischen Reizung entgegenzuwirken, welche die vorbeiziehende Umgebung hervorrief, bewegte die Fliegen dazu die Hindernisse zu überwinden. In einem auf Intervallen basierten Training stellt sich nach 50 erfolgreichen Überquerungen ein Langzeitgedächtnis ein. Nach dem ersten ein-minütigen naiven Lauf und einer zwanzig-minütigen Trainingspause kann sogar schon ein Kurzzeitlernen gefunden werden (Kienitz, 2010). Diese Gedächtnisbildung durch Wiederholungen eines motorischen Ablaufs sollte in den folgenden Experimenten analysiert werden. Dabei stellte sich die Frage wie schon im vorherigen Abschnitt über das Körpergrößengedächtnis, auf welche Weise diese adaptive Anpassung gelernt wird und wo im Zentralnervensystem sich das Verarbeitungszentrum kartieren ließe.

Die beiden verwendeten Wildtyp- Stämme, CS und WTB, waren in der Lage motorisch zu Lernen. Die männlichen CS-Tiere verbesserten sich von einer anfänglichen medianen Überquerungsrate von 13 auf 15,5 Überquerungen pro Minute (Ü/min) im zweiten Lauf (Abbildung 36a). Bei dem Langzeittest nach 24 Stunden wurden sogar mediane 17 Überquerungen pro Minute geschafft. Die WTB-Fliegen legten die gleiche Verhaltensweise dar (Abbildung 36b). Sie steigerten sich signifikant vom naiven Lauf mit 13 auf 15 Überquerungen beim zweiten Training. Nach 24 Stunden hatte sich ein Langzeitgedächtnis mit einer medianen Rate von 17,5 Ü/min gebildet. Bei beiden Stämmen schienen die Fliegen im vierten und fünften Trainingslauf zu „ermüden“, da die erfolgreichen Überquerungen abnahmen.



### Abbildung 36: Das motorische Lernen wildtypischer Fliegen

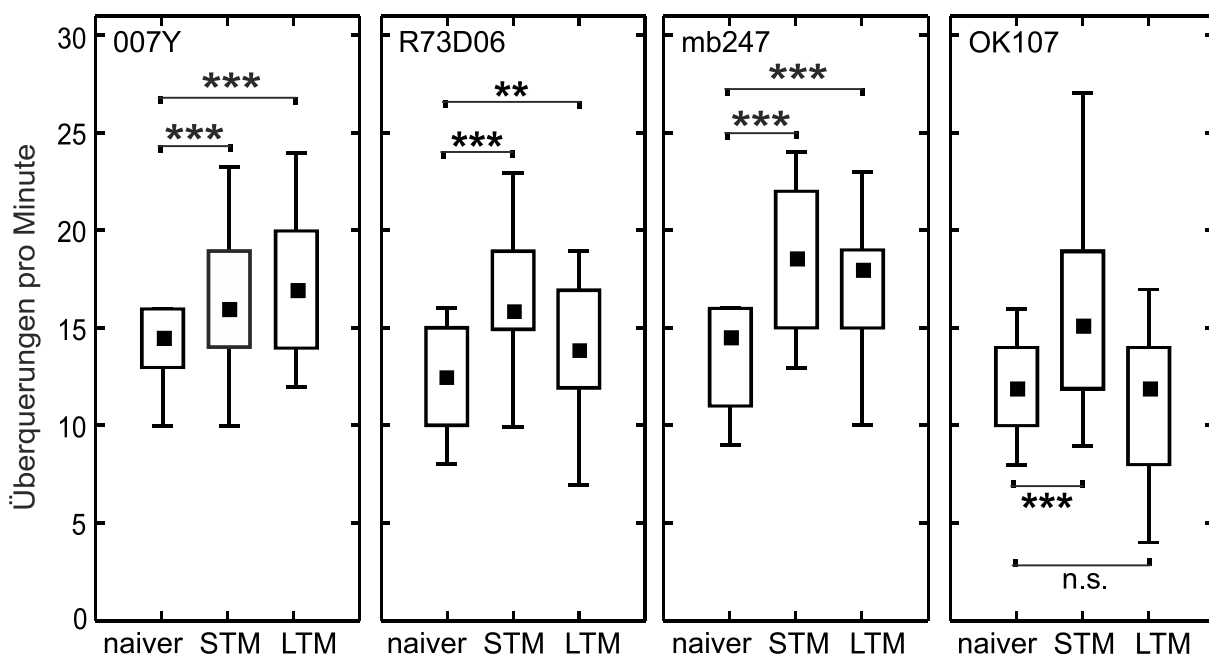
**a)** Männliche wildtypische CS-Fliegen durchliefen fünfmal eine Minute andauernde Trainingsläufe mit 20 Minuten Pausen zwischen den Reizen. Die Lückenbreite wurde so gewählt, dass im naiven Lauf zwischen 8 und 16 Überquerungen geschafft wurden. Das Kurzzeitgedächtnis trat nach 20 Minuten auf. Ein Langzeitgedächtnis wurde nach 24 Stunden getestet. **b)** Mit wildtypischen WTB-Männchen wurde genauso verfahren wie in a. Pro Datensatz: N= 30; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

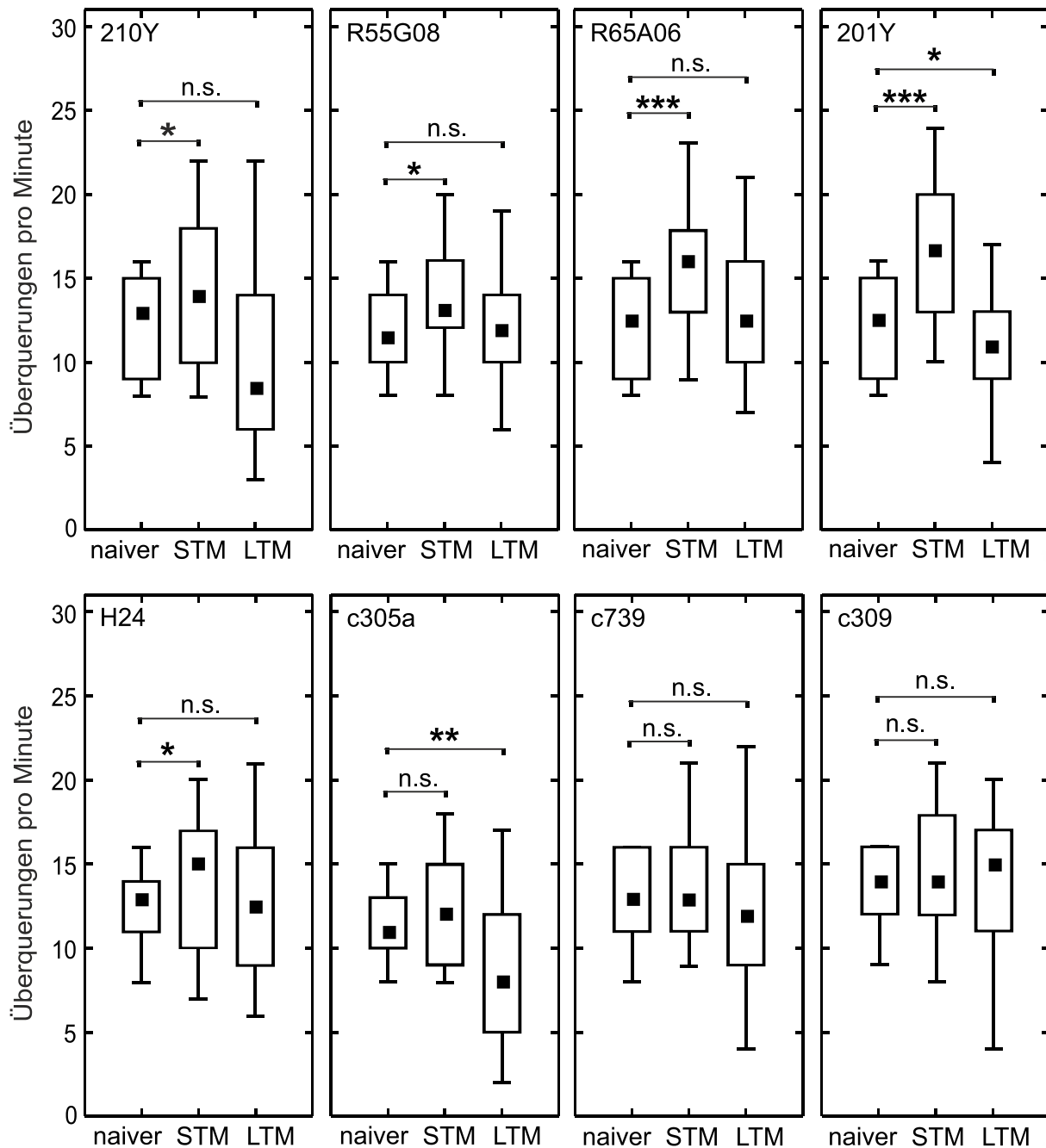
## 3.19 Die Rettung motorisch lernmutanter Fliegen

Schon Bastian Kienitz konnte während seiner Promotion zeigen, dass *rut<sup>1</sup>* und *rut<sup>2080</sup>*-Fliegen nicht in der Lage zu den adaptiven Verbesserungen beim Lückenüberqueren sind (Kienitz, 2010). Anschließend wurde vorwiegend mit dem Allel 2080 gearbeitet, da die entsprechenden Individuen in der Lage sind, ihre Körpergröße einzuschätzen (Abbildung 20). Es sollte somit nur das Defizit des motorischen Lernens analysiert werden. Es wurden Weibchen eines *rut<sup>2080</sup>;UAS-*rut*<sup>+</sup>*-Rettungsstamms mit verschiedenen GAL4-Treiber Männchen gekreuzt, um die verantwortliche Struktur für die Anpassung im Gehirn zu kartieren. Dabei kamen sowohl die aus den vorherigen Abschnitten bekannten Linien, welche Expressionsmuster in der PB zeigten, als auch diverse im Pilzkörper exprimierende Treiber zum Einsatz. Von den verwendeten Rettungskonstrukten waren drei in der Lage beide Gedächtniskomponenten zu retten (Abbildung 37). Im Muster von 007Y, welches die Linie war, die das defizitäre Körpergrößengedächtnis von *dnc<sup>1</sup>* wiederherstellen konnte (Abbildung 22), führte die Expression zu einer Rettung motorischen Lernens. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+/+</sup>;007Y-GAL4/+*-Männchen starteten mit medianen 14,5 Überquerungen pro Minute. Sie steigerten diese Rate höchst signifikant zu einem Kurzzeitgedächtnis mit medianen 16 Ü/min. Dieses Niveau

konnten sie in ein Langzeitgedächtnis überführen. Sie absolvierten den 24 h-Test mit einer medianen Rate von 17 Überquerungen pro Minute. Die R73D06-Linie, welche ebenfalls in PFN-Neuronen exprimiert (Abbildung 25), war genauso in der Lage beide Gedächtniskomponenten zu retten. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+/+</sup>;R73D06-GAL4/+*-Fliegen formierten ein Kurzzeitgedächtnis mit 16 Überquerungen pro Minute. Somit steigerten sie sich höchst signifikant vom ersten Lauf, der eine Rate von 12,5 Ü/min aufwies. Die Steigerung blieb auch beim 24h-Test bestehen, der mit 14 Überquerungen absolviert wurde. Eine vollständige Rettung der motorischen Gedächtniskomponenten erzielte auch der  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Pilzkörperlobentreiber *mb247-GAL4*. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+/+</sup>;mb247-GAL4/+*-Männchen überquerten mit einer medianen Rate von 18,5 Ü/min im STM-Lauf höchst signifikant mehr Lücken als zuvor während des naiven Auftritts. Der Überquerungserfolg blieb bei medianen 18 Ü/min auch nach 24 h erhalten. Überraschenderweise konnte *OK107-GAL4*, welche in allen Pilzkörperkomponenten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ) exprimiert, nur eine beider Gedächtnisformen retten. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+/+</sup>;OK107-GAL4/+*-Tiere steigerten sich zwar von anfänglichen 12 höchst signifikant auf 15 Überquerungen, konnten dieses Niveau jedoch am nächsten Tag nicht halten. Die mediane Überquerungsrate war beim 24 h-Test wieder auf 12 Ü/min zurück gefallen. In dem Expressionsmuster von *210Y*, das den *rutabaga<sup>1</sup>*-Phänotyp des eingeschränkten Körpergrößengedächtnisses retten konnte (Abbildung 21), entstand nur eine signifikante Rettung des motorischen Kurzzeitlebens. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+/+</sup>;210Y-GAL4/+*-Männchen waren in der Lage über die Trainingsläufe ihre anfängliche Überquerungsrate zu steigern. Im ersten naiven Lauf wurden mediane 13 Überquerungen geschafft. Während des STM-Laufs erreichten sie eine mediane Überquerungsrate von 14 Ü/min. Ein Langzeitgedächtnis konnte mittels *210Y* nicht gebildet werden. Die Überquerungsrate lag nach 24 h nur noch bei 8,5 Ü/min. Der laterale PB-Neuronen-*R55G08-GAL4*-Treiber zeigte ein ähnliches Bild wie *210Y* im motorischen Lernen. Er war in der Lage die Kurzzeitkomponente zu retten. Die mediane Überquerungsrate der *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+/+</sup>;R55G08-GAL4/+*-Fliegen startete im naiven Lauf mit 11,5 Ü/min und konnte kurzzeitig signifikant auf 13 Ü/min gesteigert werden. Am Folgetag fiel die Rate allerdings wieder auf 12 Ü/min zurück. Der PB-Treiber, der den *dnc<sup>1</sup>*-Phänotyp retten konnte (Abbildung 23b), sorgte für ein höchst signifikantes motorisches Kurzzeitgedächtnis. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+/+</sup>;R65A06-GAL4/+*-Männchen steigerten sich signifikant von anfänglichen 12,5 auf 16 Überquerungen. Am Folgetag befand sich die Rate allerdings auf dem gleichen Level wie im naiven Lauf. Zu einer Kurzzeitsteigerung waren ebenfalls *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+/+</sup>;201Y-GAL4/+*-Männchen in der Lage. Diese überquerten mit 16,5 Ü/min höchst signifikant häufiger die Lücken als im ersten Lauf mit

12,5 Überwindungen. Den Langzeittest am Folgetag absolvierte diese Gruppe der *rut<sup>2080</sup>*-Rettung sogar signifikant schlechter mit medianen 11 Überquerungen. Das Expressionsmuster von 201Y liegt vor allem in den  $\alpha$  &  $\beta$ - Loben der Pilzkörper. In den  $\gamma$ -Loben von H24 war ebenfalls nur eine kurzzeitige *rut<sup>2080</sup>*-Rettung möglich. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+</sup>/+;H24-GAL4/+*-Tiere steigerten anfängliche 13 Überquerungen auf eine mediane Überquerungsrate von 15 Ü/min. Ein motorisches Langzeitgedächtnis wurde jedoch nicht ausgebildet, da in diesem Lauf nur mediane 12,5 Überwindungen stattfanden. Die Linie c309-GAL4 treibt zwar in den Pilzkörperloben in denen auch mb247-GAL4 exprimiert, war aber zu keiner motorischen Rettung in der Lage. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+</sup>/c309-GAL4;+/+*-Männchen blieben bei ihrer anfänglichen medianen Überquerungsrate von 14 Ü/min. Im Folgetaglauf erreichten sie 15 Überquerungen pro Minute. Ähnlich verhielt es sich mit dem partiellen Rettungsversuch im Muster von c739-GAL4, welches sich auf die  $\alpha$  &  $\beta$ - Loben konzentriert. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+</sup>/c739-GAL4;+/+*-Fliegen verharrten bei einer Rate von 13 Ü/min, um sich weder kurzzeitig, noch langfristig zu steigern. Die *rut<sup>2080</sup>/Y;UAS-*rut*<sup>+</sup>/c305a-GAL4;+/+*-Männchen waren auch zu keiner motorischen Lernleistung fähig. Die Expression dieser Linie beschränkt sich auf die  $\alpha'$  &  $\beta'$ -Loben. Sie absolvierten mediane 11 Überquerungen im naiven Lauf. Beim Kurzzeittest blieb die Rate mit 12 Ü/min noch auf einem nicht signifikant unterschiedlichen Level. Am nächsten Tag entstand sogar eine hoch signifikant geringere Rate von 8 Ü/min.





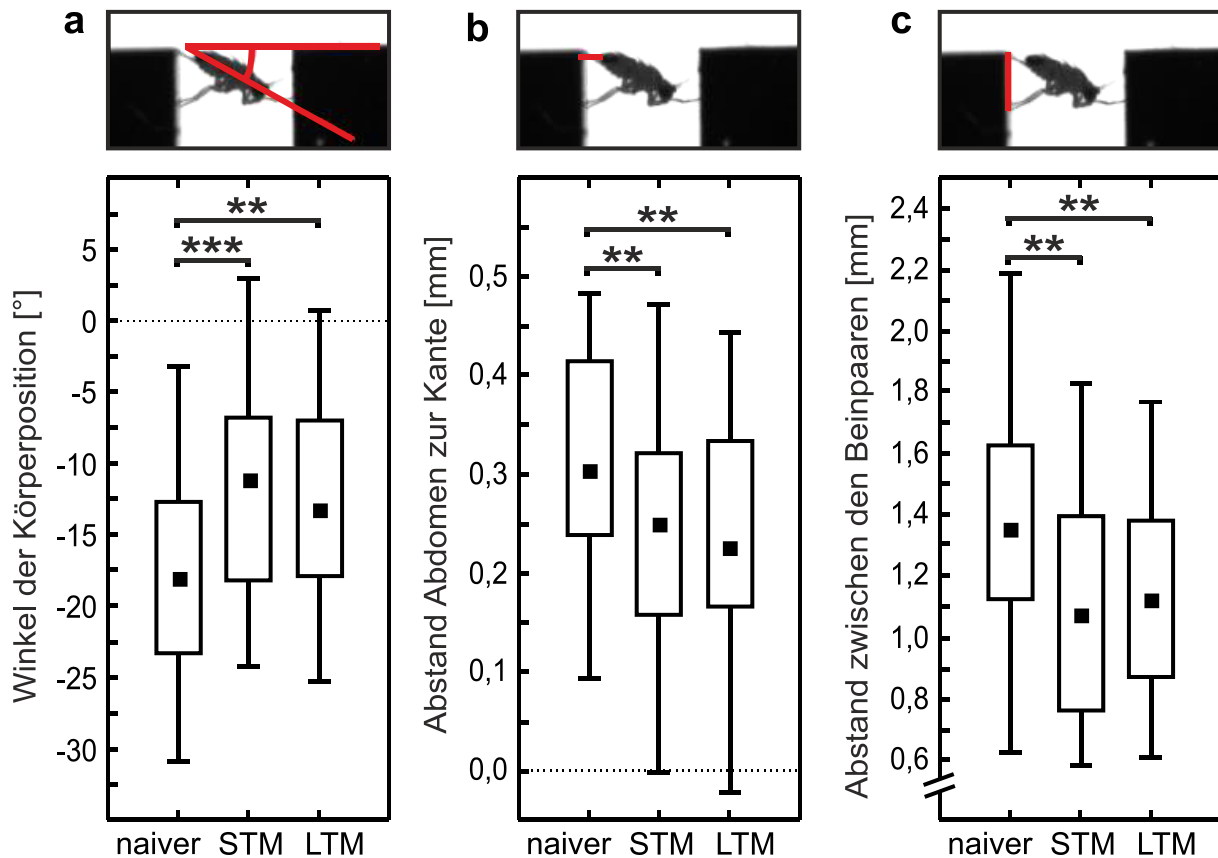
**Abbildung 37: Die Rettung des *rut<sup>2080</sup>* defizitären motorischen Lernens**

a) Weibliche *rut<sup>2080</sup>;UAS-*rut*<sup>+</sup>*-Fliegen wurden mit verschiedenen GAL4-Männchen gekreuzt. Die F1 männlichen Nachkommen durchliefen fünfmal eine Minute andauernde Trainingsläufe mit 20 Minuten Pausen zwischen den Reizen. Die Lückenbreite wurde so gewählt, dass im naiven Lauf zwischen 8 und 16 Überquerungen geschafft wurden. Das Kurzzeitgedächtnis trat nach 20 Minuten auf. Nur bei 201Y trat ein STM erst nach 40 min im dritten Lauf auf. Ein Langzeitgedächtnis (LTM) wurde nach 24 Stunden getestet. Pro Datensatz: N= 30; nicht-parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16.

### 3.20 Die Module der motorischen Anpassung

Im vorherigen Abschnitt blieb die Frage offen, welche Details im Bewegungsablauf die Fliegen veränderten, um die Überquerungsrate zu steigern. Im Zuge einer Bachelor-

arbeit (Eckert, 2013) wurde ein Aufbau für motorisches Lernen auf einer Lücken-schiene entwickelt (Abbildung 10). Diese hielt ähnlich einem Laufband die Fliege im Fokus der stationären Hochgeschwindigkeitskamera. Der Versuchsaufbau ermöglichte im Gegensatz zum Lückenring die einzelnen Module des Bewegungsablaufs auszuwerten. Während des Trainings wurde die Körperposition erfolgreich verbessert (Abbildung 38). Im ersten naiven Trainingslauf überquerten die wildtypischen Fliegen die 3,2 mm breiten Lücken in einem medianen Winkel von  $-18,0^\circ$ . Dieser Winkel der Körperposition war im STM-Lauf mit  $-11,2^\circ$  höchst signifikant spitzer. Der Lauf nach 24 h wurde ebenfalls mit einem hoch signifikant spitzeren Winkel von  $-13,2^\circ$  absolviert. Ein weiteres Detail, welches die Fliegen bei der motorischen Gedächtnisformierung anpassten, war der Abstand zwischen Abdomen und Lückenkante. Dieser stellte sich mit medianen 0,25 mm hoch signifikant geringer dar als während des naiven Laufs mit 0,30 mm. Der Abdomenabstand blieb auch während des LTM-Laufs hoch signifikant geringer mit 0,23 mm. Ein weiteres Modul des Bewegungsablaufs, was die Insekten verringerten, war die Distanz zwischen den Mittelbeinen und den Hinterbeinen. Dieser Abstand lag beim naiven Lauf noch bei medianen 1,35 mm. Während des STM-Laufs überquerten die Fliegen mit einem hoch signifikant geringeren Beinabstand von 1,08 mm. Die Distanz zwischen den Beinpaaren blieb auch nach 24 h in einem ähnlichen Bereich mit medianen 1,12 mm. Diese drei beschriebenen Module scheinen die Hypothese zu bestätigen, dass die Fliegen hoch spezifische Details des Bewegungsablaufs anpassen müssen, um ein motorisches Langzeitgedächtnis zu formieren.



**Abbildung 38: Anpassungen zu einem motorischen Gedächtnis**

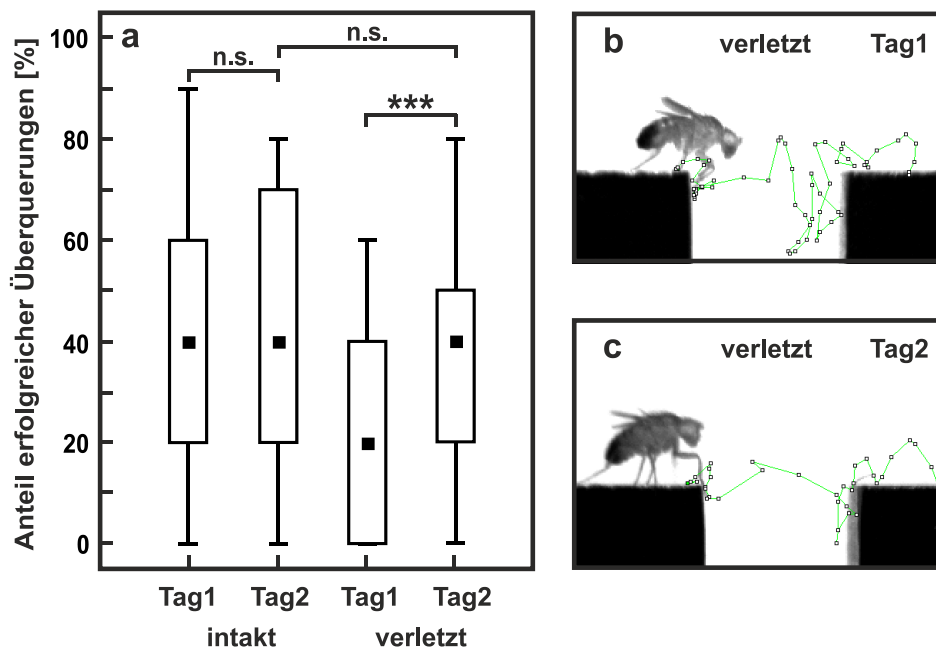
Männliche wildtypische CS-Fliegen wurden auf einer Kletterschiene mit 24 linearangeordneten Lücken einer jeweiligen Breite von 3,2 mm trainiert. Der Test für ein Kurzzeitgedächtnis (STM) erfolgte nach 40 min. Der Langzeittest (LTM) erfolgte nach 24 h. **a)** Es wurde mittels der Hochgeschwindigkeitsaufnahmen die Körperposition beim ersten Anschlagen der Vorderbeine an der gegenüberliegenden Kante vermessen. Der Kurz- und der Langzeittest erfolgten mit denselben Individuen. **b)** Vermessung des Abdomenabstands zur Lückenkante. **c)** Vergleich der Abstände zwischen den Mittelbeinpaaren und den Hinterbeinpaaren. Pro Datensatz: N= 60; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16 (Eckert, 2013).

### 3.21 Die motorische Anpassung nach Verletzungen

Die Ergebnisse aus dem vorherigen Abschnitt führten zu den Erkenntnissen, dass Taufliegen zu motorischen Anpassungen in der Lage sind. Im Folgenden wurden Verhaltensexperimente durchgeführt, welche ein Körperzustandsgedächtnis bei *Drosophila* untersuchen sollten. Wildtypische CS-Fliegen bekamen von einem Mittelbein das erste Tarsussegment abgeschnitten und wurden 10 Minuten später mit einer kletterbaren 3,5 mm breiten Lücke konfrontiert. Dieselben Fliegen wurden am Folgetag nochmals getestet und mit ihrer Leistung vom Vortag verglichen. Die Tiere schienen sich innerhalb der 24 h tatsächlich an ihre Verletzung anzupassen, denn sie steigerten sich höchst signifikant von nur anfänglichen medianen 20 % erfolgreichen Überquerungen auf 40 %. Damit waren sie am Folgetag nicht signifikant schlechter als die nicht verletzten Fliegen, welche ebenfalls bei 40 % der Anläufe die Lücke überquerten. Beim



Betrachten einer Hochgeschwindigkeitsanalyse wurden die Bewegungen des verletzten Beins nachgezeichnet. Es fiel auf, dass dieses am ersten Tag ständig an der gegenüberliegenden Seite abrutschte, was vermutlich auf die fehlende Klaue und die nicht mehr vorhandenen Adhäsionsorgane zurückzuführen ist. Am Folgetag stellte sich das Erscheinungsbild der Beinspur jedoch erheblich zielgerichteter dar. Das Männchen legte das verletzte Mittelbein auf die gegenüberliegende Kante, um das Wegrutschen zu verhindern. Es könnte somit ein regelrechter Strategiewechsel stattgefunden haben, der die erfolgreiche Verbesserung erklären würde.



### Abbildung 39: Der Strategiewechsel nach einer Verletzung

Männlichen CS-Fliegen wurde unter Kälteanästhesie das erste Tarsussegment eines Mittelbeines entfernt. Die Kontrollgruppe desselben Zuchtglases wurde ebenfalls anästhetisiert, dabei jedoch intakt belassen. **a)**: Nach einer 10 minütigen Aufwachphase erfolgte die Quantifizierung der erfolgreichen Überquerungen an einer überkletterbaren 3,5 mm breiten Lücke. 24 h später am Folgetag wurden dieselben Fliegen erneut mit der Lücke konfrontiert. Pro Datensatz: N= 30, n= 10; nicht parametrische Median-Darstellung wie in Abbildung 16. **b)**: Aus einer exemplarischen Hochgeschwindigkeitsanalyse des Tests am Tag1 wurde die Spur des verletzten Mittelbeines nachgezeichnet. **c)**: Darstellung der Spur desselben lädierten Beins am Folgetag.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die wildtypische Körpergrößeneinschätzung

Diese Arbeit basiert auf dem Kletterparadigma und baut auf den dort erlangten Erkenntnissen auf (Pick & Strauss, 2005). Die Autoren zeigten, dass Fliegen eine vor ihnen liegende Lücke beim Anlauf visuell vermessen, um danach zu entscheiden, ob sie einen Kletterversuch starten. Auf diese Weise beschränken diese wildtypischen Insekten ihre Bemühungen weitestgehend auf überwindbare Spaltmaße. Es konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass Taufliegen ihre individuelle Körperreichweite bei der Entscheidung für einen Kletterversuch berücksichtigen. Es befindet sich dementsprechend eine Art von Repräsentation für die persönliche Reichweite im Nervensystem der Fliege. Kleine wildtypische Fliegen kehrten an Lückenbreiten um, die ihre größeren Artgenossen aus derselben Population durchaus noch versuchten (Abbildung 11). Der Unterschied in den erfolglosen Versuchen war besonders eindeutig an der 4,0 mm breiten Lücke. Diese bot für die im Durchschnitt 16 % größeren Tiere gerade noch die Möglichkeit zur Überquerung, während die kleineren Exemplare keine Chance zur Überwindung mehr hatten. Es zeigte sich, dass die kleineren Fliegen an dieser Lückenbreite erheblich weniger Versuche unternahmen, als wäre ihnen der Nachteil in ihrer Körperreichweite „bewusst“. Die Körpergröße variiert stark mit den Futter- und Temperaturbedingungen während der Entwicklung, weswegen sie nicht ausschließlich genetisch determiniert sein kann. Also wurde die Hypothese aufgestellt, dass jedes einzelne Individuum seine spezifischen Körperabmessungen durch Interaktionen mit der Umwelt erlernt. Deswegen wurden Fliegen getestet, die als adulte Tiere keine Möglichkeiten zu visuellen Erfahrungen hatten. In der Tat waren die dunkel aufgezogenen Insekten in ihrer Körpergrößeneinschätzung gestört. Sie versuchten unüberwindbare Lücken zu klettern (Abbildung 16). Erstaunlicherweise reichten die Erfahrungen von 10 Anläufen an einer überquerbaren 3,5 mm breiten Lücke nicht aus, um eine so gute Größeneinschätzung wie die unter Lichtbedingungen gezüchteten Tiere zu haben. Die Möglichkeit, dass es an einer verkümmerten visuellen Verarbeitung läge, konnte ausgeschlossen werden, da aus der Dunkelheit kommende Fliegen erfolgreich die 3,5 mm breite Lücke überqueren konnten. Komplette blinde und bewegungsblinde Fliegen unternahmen überhaupt keine Kletterversuche, da die Lücke rein visuell vermessen wird (Pick & Strauss, 2005). Außerdem war ein ähnlicher Effekt mit ab dem Puppenstadium isolierten Tieren zu erzielen. Auch diese in kleinen

Gläschen gehaltenen Männchen versuchten mit einer höheren Frequenz die 5,0 mm breite Lücke zu überwinden (Abbildung 17a). Es kam die Vermutung auf, dass die Körpergröße bei sozialen Interaktionen, wie z.B. beim männlichen Aggressionsverhalten (Chen et al., 2002), gelernt werden könnte. Daraufhin wurden den isolierten Männchen zwei weitere Männchen, welche als Sozialkontakte dienen sollten, zugesetzt. Überraschenderweise absolvierten die Fliegen mit diesen definierten Sozialkontakten zwar weniger erfolglose Versuche als die sozial deprivierten Artgenossen, aber immer noch höchst signifikant mehr als die wildtypischen Fliegen, die aus der Standardzucht stammten. Die Hypothese des Körpergrößenslernens durch soziale Interaktionen konnte somit nicht bestätigt werden. Um die Rolle der visuellen Komponente für diese spezielle Form des Lernens zu untersuchen, wurde zunächst ein sehr simpler Ansatz verfolgt. Die kleinen Fliegenhaltungsröhrchen wurden mit einem horizontalen Streifenzyylinder beklebt. Tatsächlich konnten die in diesen Gläschen gehaltenen Individuen ihre Körpergröße beim Klettern genauso gut berücksichtigen, wie die Exemplare aus den Zuchtgläsern. Sie absolvierten so gut wie keine Kletterversuche an unüberwindbaren Lücken. Einen stichhaltigen Beweis, dass Fliegen ihre Körpergröße anhand der Strukturen in der visuellen Umgebung lernen, lieferten Experimente mit definierter visueller Reizung in der LED-Arena. In dieser wurden den dunkelaufgezogenen, frei beweglichen Männchen stationäre Reizmuster vorgesetzt. Der Bewegungsbereich war auf einen Durchmesser von 20 mm eingeschränkt worden, damit die Raumfrequenz der Reizung in definierten Grenzen blieb. Beim Laufen fällt die Antwort der elementaren Bewegungsdetektoren zwischen jeweils zwei benachbarten Ommatidien, je nach Beschaffenheit des Musters, sehr unterschiedlich aus. Bei einer Raumfrequenz, die dem doppelten interommatidialen Winkel von  $4,8^\circ$  entspricht, entsteht sogar eine Aufhebung des Bewegungsreizes. Eine Umkehr der wahrgenommenen Bewegungsrichtung bewirkt die Geometrische Interferenz, wenn die Raumfrequenz zwischen dem Interommatidienwinkel und dem Doppelten dieses Winkels liegt. Die optimale Stimulation erfolgt dagegen bei einem Streifenzyylinder von  $24^\circ$  (Heisenberg & Wolf, 1984). Es bestätigte sich, dass unter den drei Versuchsbedingungen nur die Fliegen, welche in dem „optimalen“ Streifenzyylinder für 10 min herum laufen konnten, ihre Körpergröße erlernten. Die Männchen, die mit den Raumfrequenzen von  $8^\circ$  bzw.  $10^\circ$  gereizt worden waren, lernten ihre Körpergröße offensichtlich nicht, da sie wie die nicht stimulierten Exemplare versuchten, unüberwindbare Lücken zu klettern (Abbildung 17b). Dieses Experiment lässt vermuten, dass die gestörte Körpergrößeneinschätzung der sozial

deprivierten Männchen, ebenfalls aus den Zuchtbedingungen resultierte. Wahrscheinlich bieten die kleinen Röhrchen eine Umgebung mit zu wenigen visuellen Strukturen, um die individuelle Reichweite zu lernen, wohingegen ein Zuchtglas mit Filter und Puppen an der Wand genügend Möglichkeiten zur optischen Stimulation mitbringt, um die Körpergröße zu erfahren. Eine wirkliche Bestätigung, dass Fliegen ihre Körperreichweite über den Bezug zwischen Parallaxenbewegung und mittlerer Schrittlänge lernen, lieferten die Kompensationsexperimente (Abbildung 18b). Den Fliegen konnte über die partielle Kompensation der Parallaxenbewegung eine „falsche“ Körpergröße beigebracht werden. Sie vermieden danach Kletterversuche an der 4,5 mm breiten Lücke signifikant häufiger als die Gruppe, die mit dem stationären Muster trainiert worden war. Die partiell kompensierten Parallaxenbewegungen brachten ihnen offensichtlich eine geringere Reichweite und geringere individuelle Körperabmessungen bei. Es funktionierte allerdings nicht, die Fliegen durch überhöhte Parallaxenbewegung zu noch größerer Überschätzung zu trainieren. Das könnte daran liegen, dass visuell naive Exemplare ihre Reichweite an unüberquerbaren Lücken schon maximal überschätzen und dieses Phänomen sich somit nicht weiter steigern lässt. Erstaunlicherweise konnte den Fliegen, denen die kürzere Körperreichweite beigebracht worden war, nicht durch das einfache Umlernexperiment später die „richtige“ Größe antrainiert werden. Sie vermieden nach 15 min Training am stationären Muster weiterhin die Kletterversuche. Natürlich könnte über einen längeren Trainingszeitraum die Körperreichweite irgendwann wieder angeglichen werden. Allerdings zeigte sich bei den Konsolidierungsexperimenten, wie wenig störungsanfällig das Körpergrößengedächtnis nach der Konsolidierungsphase ist. Es erwies sich unmittelbar als anästhesieresistent und schien nach zwei Stunden konsolidiert zu sein (Abbildung 18a). Die Fliegen, die einmal ihre Körperreichweite gelernt hatten, vergaßen diese auch über 21 Tage ohne visuelle Rückmeldung nicht mehr. Bis zu diesem Zeitpunkt war eine so lange andauernde und stabile Gedächtnisform in *Drosophila* nicht bekannt. Das assoziative Duftlernen kann durch eine spezielle Form des Intervalltrainings nur bis zu 7 Tagen andauern (Tully et al., 1994). Auch die Balzvermeidung, welche durch wiederholte Bestrafung des verpaarten Weibchens ausgelöst wird, hält nicht länger als neun Tage an (McBride et al., 1999; Mehren et al., 2004).

## 4.2 Mutationen mit eingeschränkter Körpergrößeneinschätzung

Es zeigte sich, dass die Mutationslinien, welche sich beim assoziativen Duftlernen eingeschränkt verhalten, auch bei der Körpergrößeneinschätzung einen defizitären Phänotyp aufweisen (Dudai et al., 1976; Livingstone et al., 1984). Sowohl *rut<sup>1</sup>*-, als auch *dnc<sup>1</sup>*-Fliegen waren nicht in der Lage die Kletterversuche an ihre individuelle Körperreichweite anzupassen. Sie versuchten unabhängig von ihrer Körpergröße selbst die viel zu breite 6,0 mm Lücke zu überwinden (Abbildung 14 &Abbildung 15). Die *amn<sup>1</sup>*-Mutanten versuchten ebenfalls an der unüberquerbaren 5,0 mm breiten Lücke zu klettern. Sie absolvierten sogar noch mehr Versuche, wenn sie nach dem optimalen Training direkt ins Dunkle überführt worden waren (Abbildung 34). Es schien, als würden sie ihre erlernte Körperreichweite ohne visuelle Rückmeldung nicht konsolidieren können und somit wieder vergessen. Das *amnesiac*-Gen kodiert für ein PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating peptide) ähnliches Neuropeptid. Fliegen mit der *amn<sup>1</sup>*-Mutation sind zwar kurzzeitig in der Lage einen Duft zu assoziieren, vergessen diesen jedoch innerhalb einer Stunde wieder. Der PAC1-Rezeptor steht in Verbindung mit verschiedenen Transduktionswegen und führt zur Aktivierung von Adenylylzyklase, Phospholipase C, MAP-Kinase (mitogen activated protein) und der Mobilisierung von Kalzium. In der Hypophyse von Ratten bindet der dominante Rezeptor hauptsächlich an das G<sub>s</sub>-Protein und führt zu einer schnellen cAMP-Produktion, welche auf direktem Weg PKA aktiviert. Das PACAP38 aus Säugetieren konnte in *Drosophila* über Kaliumströme cAMP und Ras/Raf-Transduktionswege aktivieren. Deswegen wird vermutet, dass *amnesiac*-Produkte über die AC den cAMP- Spiegel erhöhen (Quinn et al., 1979; Hashimoto et al., 2002; Kanasaki et al., 2013). Das Verhalten von *rut<sup>1</sup>*, *dnc<sup>1</sup>* und *amn<sup>1</sup>* sprach somit für ein cAMP-abhängiges Lernen der Körpergrößenreichweite. Des Weiteren fielen Fliegen eines in der Gehirnstruktur mutationsbedingt defekten *ocelliless<sup>1</sup>*-Stammes durch Kletterversuche an unüberwindbaren Lückenbreiten auf. Diese Individuen hatten eine unterbrochene Protocerebralbrücke und konnten ihre Körperreichweite nicht mit der Lückengröße in Bezug setzen. Sie vollführten auch an überkletterbaren Lücken eine Vielzahl erfolgloser Versuche, weil ihre Suchschläge zusätzlich die Zielrichtung verloren (Abbildung 12). Der PB wird eine topografische Repräsentation der zenitalen E-Vektor Orientierung polarisierten Lichtes in Heuschrecken und die Schrittlängenkontrolle bei der Zielausrichtung laufender Taufiegen zugeschrieben. Dabei hält die PB vermutlich eine Repräsentation des Azimuts (Horizontalwinkel) des

Ziels vor. (Heinze & Homberg, 2007; Triphan et al., 2010). Aufgrund dieser Erkenntnisse kamen bei den Kartierungsexperimenten vor allem GAL4-Linien mit vorhandenen Expressionsmustern in der PB zum Einsatz.

### 4.3 Die Kartierung des Körpergrößengedächtnisses

Das erstaunlichste Ergebnis bei der Kartierung der Größenanpassung war, dass *rut* und *dnc* in unterschiedlichen Neuronengruppen der PB benötigt wurden. In dem klassischen Modell kodiert *rut* für die AC, welche cAMP generiert und *dnc* kodiert für die PDE, welche dieses cAMP wieder abbaut (Waddell & Quinn, 2001). Allerdings gab es durchaus Hinweise, dass sich die cAMP-Signale auch beim Mittelzeitgedächtnis des Duftlernens in *rut*- und *dnc*-Mutanten unterschiedlich verhalten. Während *rut*-abhängige cAMP-Signale in den Kenyonzellen der Pilzkörper ein ASM (anästhesiesensitives Gedächtnis) formieren, unterstützen *dnc*-sensitive cAMP-Signale ein ARM in den lokalen Neuronen der Antennalloben (Scheunemann et al., 2012). Das *rut*-abhängige Körperreichweitengedächtnis konnte sowohl mit 210Y als auch mit R55G08 gerettet werden (Abbildung 21 &Abbildung 23) Die einzige Gemeinsamkeit dieser beiden Expressionsmuster liegt in lokalen lateralen Neuronen der PB (Abbildung 24). Es bestätigte sich unter Verwendung von *rut<sup>RNAi</sup>*, dass die Neurone der Treiberlinie 210Y für das Körpergrößengedächtnis relevant sind, da die entsprechenden Fliegen erfolglose Versuche an zu breiten Lücken unternahmen (Abbildung 27). Mittels des temperatursensitiven GAL80<sup>ts</sup>-Schalters musste die durch *rut*-kodierte AC erst am Tag vor dem Experiment in den 210Y-Neuronen getrieben werden. Die entsprechend gekreuzten Fliegen vermieden tatsächlich nach spatio-temporalen Rettung Versuche an zu breiten Lücken (

Abbildung 28). Bei anderen *rut*-abhängigen Gedächtnisformen ist es ebenso hinreichend, die AC erst akut zur Verfügung zu stellen (McGuire et al., 2003). Allerdings konnten die Fliegen ihre Körperreichweite selbst nach 18 Tagen bei 17°C noch korrekt einschätzen. Wenn die Körperreichweite erst einmal gelernt und konsolidiert worden ist, scheint *rut* für den Abruf des Gedächtnisses nicht mehr benötigt zu werden. Das *dnc*-abhängige Körperreichweitengedächtnis konnte mit drei verwendeten Expressionslinien gerettet werden (Abbildung 22 &Abbildung 23). Die Gemeinsamkeit dieser Expressionsmuster von 007Y, R73D06 und R65A06 liegt in kolumnären PFN-Neuronen (Abbildung 25 &Abbildung 26). Das PFN-System (Hanesch et al., 1989) wird mittlerweile in drei verschiedene Systeme unterteilt. Das Erste zieht sich von den Glomeruli

2-9 einer Seite der PB über die ventralste Schicht (1) des FBs kontralateral zu dem ventral gelegenen Nodus. Das zweite System verbindet die Glomeruli 2-9 einer Seite der PB und die zweite ventrale Schicht des FBs mit dem ventral gelegenen kontralateralen Nodus. Das dritte System befindet sich zwischen den Glomeruli 2-9 einer Seite der PB, der dritten ventralen Schicht des FBs und dem medial gelegenen kontralateralen Nodus (Wolff et al., 2014). Die R65A06-Treiberlinie weist außerdem Färbungen in lateralen Neuronen der PB auf. In diesen konnte jedoch nicht das *rut*-abhängige Körpergrößengedächtnis gerettet werden. Vermutlich handelt es sich nicht um die gleichen Gruppen von LN in der PB, da verschiedenste intrinsische Neurone in diesem Neuropil existieren (Lin et al., 2013). Final könnte diese offene Frage über Doppelfärbungen mittels unterschiedlicher binärer Systeme (z.B. GAL4 und LexA) geklärt werden. Auch bei den *dnc<sup>RNAi</sup>*-Experimenten bestätigte sich die Beteiligung von PFN-Neuronen für das Körperreichweitengedächtnis. Fliegen, die eine Herunterregulierung von *dnc* in den 007Y-Neuronen hatten, wiesen einen defizitären Verhaltensphänotyp auf (Abbildung 27b). Das *dnc*-abhängige Körpergrößengedächtnis wurde ebenfalls formiert wenn es mittels GAL80<sup>ts</sup> erst am Vortag induziert wurde (Abbildung 28c).

#### 4.4 Die Rolle weiterer ACs und PDEs beim Körpergrößengedächtnis

Das überraschende Ergebnis, dass *rut* und *dnc* in unterschiedlichen Neuronengruppen der PB benötigt werden, zog die Frage nach sich, ob dann andere ACs in den „*dnc*-Neuronen“ und PDEs in den „*rut*-Neuronen“ beteiligt sind. In den M-Schrittmachern, die für die circadiane Rhythmik verantwortlich sind, wurde mittels RNAi-Experimenten ein Beispiel für einen *rut*-unabhängigen Anstieg der cAMP-Konzentration gefunden. In diesem Fall stimuliert die Aktivität des PDF-Rezeptors (Pigment Dispersing Factor) den cAMP-Anstieg in Abhängigkeit der AC3 und AC76E (Duvall & Taghert, 2012). Deswegen wurden auch in Bezug auf das Körpergrößengedächtnis die ACs und PDEs mittels RNAi in lateralen Neuronen der PB und in einem oder mehreren der drei PFN-Systeme herunterreguliert. Die UAS-*dnc<sup>RNAi</sup>* bewirkte eine defizitäre Reichweiteneinschätzung, wenn sie mit 007Y-GAL4 getrieben wurde. In diesen PFN-Neuronen führte *rut<sup>RNAi</sup>* hingegen zu keinem auffälligen Verhaltensphänotyp. Es entstand daraufhin die Hypothese, dass in den 007Y-Neuronen eine andere AC als die AC1 (*rut*) für die Generierung von cAMP verantwortlich ist. Es fielen überraschenderweise gleich sechs

Adenylylzyklen auf, welche in PFN-Neuronen als *dnc*-Gegenspieler in Frage kamen. Die RNAi-Regulierung der AC78C, AC39E, ACCG32305, AC35C, ACXD und ACXB führte in den 007Y-Neuronen zu Phänotypen mit eingeschränkter Körpergrößeneinschätzung (Abbildung 32). Die UAS-*rut*<sup>RNAi</sup> bewirkte ein defizitäres Körpergrößengedächtnis, wenn sie mit 210Y-GAL4 getrieben wurde. In diesen lateralen PB-Neuronen führte *dnc*<sup>RNAi</sup> hingegen zu keinem auffälligen Verhaltensphänotyp. Es lag somit die Vermutung nahe, dass in den 210Y-Neuronen eine andere PDE als die PDE4 (*dnc*) für die Hydrolyse von cAMP verantwortlich ist. Es tauchten allerdings gleich zwei Phosphodiesterasen auf, welche in lateralen PB-Neuronen als *rut*-Gegenspieler in Frage kamen. Sowohl die +/Y;UAS-PDE8<sup>RNAi</sup>/+;210Y-GAL4/+-, als auch die +/Y;;UAS-PDE9<sup>RNAi</sup>/210Y-GAL4-Fliegen zeigten eine defizitäre Körpergrößeneinschätzung. Erstaunlicherweise resultierte die RNAi-Regulierung in den 210Y-Neuronen bei zwei PDEs auch in *dnc*<sup>RNAi</sup>-ähnlichen Verhaltensphänotypen. Die Regulierung von PDE6 und PDE1c bewirkte in lateralen PB-Neuronen keine Verhaltensdefizite (Abbildung 33). Die Spezifität der verschiedenen ACs und PDEs in den kartierten Neuronen ist bis zu diesem Zeitpunkt noch ziemlich unbekannt, deswegen kann zwar eine Beteiligung weiterer ACs und PDEs am Körpergrößengedächtnis bestätigt werden (Tabelle 3), es bleibt jedoch die Frage nach deren Interaktionen leider weiterhin offen. In Säugetieren werden 10 Isoformen der ACs unterschieden: Die ACs 1 bis 9 gelten als transmembran verankert, wohingegen die AC10 als löslich charakterisiert wird. Zusätzlich werden die AC1 und die AC8 über Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin stimuliert, während AC5 und AC6 direkt über physiologisches Ca<sup>2+</sup> inhibiert werden. Von den 11 PDEs wird nur die PDE1c von Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin reguliert. Die Situation in Fliegen stellt sich mit 7 AC- und 6 PDE-Familien ähnlich komplex dar (Heindorff et al., 2012). Die Nomenklatur weist einige Verwirrungen auf, da durchaus auch von 12 ACs in *Drosophila* gesprochen wird. Die meisten werden weitverbreitet im ZNS exprimiert. Die ACXA gilt allerdings als spezifisch für die männlichen Gonaden. (Duvall & Taghert, 2012). Das konnte mit +/Y;UAS-ACXA<sup>RNAi</sup>/+;210Y-GAL4/+-Fliegen nicht bestätigt werden. Diese konnten ihre Körperreichweite nicht korrekt einschätzen. Wenn die RNAi wirklich nur spezifisch für diese AC herunterreguliert, müsste die ACXA somit auch in LNs der PB vorkommen. Alle 6 PDEs in *Drosophila* sind in adulten Geweben weit verbreitet. Biochemische Charakterisierungen mittels Immunoprecipitation zeigten, dass einige PDEs sich nicht nur für cAMP spezifisch erweisen. Die PDEs 1 und 11 sind dual spezifisch für cAMP und cGMP, während die PDE6 eher spezifisch für cGMP zu sein scheint und nur eine geringe Hydrolyseaktivität für cAMP aufweist (Day et al., 2005). Die +/Y;;UAS-



PDE6<sup>RNAi</sup>/007Y-GAL4-Fliegen versuchten sich allerdings erfolglos an nicht kletterbaren Lücken. Mit Männchen, welche den *foraging*<sup>sitter</sup>-Polymorphismus in sich trugen, konnte eine Beteiligung der PKG (cGMP-abhängige Proteinkinase) an der Formierung eines Körperreichweitengedächtnisses jedoch nicht nachgewiesen werden, da sich diese Tiere an zu breiten Lücken wildtypisch verhielten (Abbildung 35). Dieser Polymorphismus bewirkt eine 12 % geringere PKG-Aktivität in *for*<sup>sit</sup> (Osborne et al., 1997). Es könnte natürlich sein, dass dieser geringe Unterschied in der Enzymaktivität nicht ausreicht, um das Körpergrößengedächtnis einzuschränken, selbst wenn die PKG daran beteiligt wäre.

**Tabelle 3: Übersicht der AC- und PDE- RNAi-Ergebnisse:** Die Weibchen der UAS-RNAi-Linien wurden mit verschiedenen GAL4-Treiber Männchen, welche in neuronalen Systemen der PB exprimieren, gekreuzt. Als Kontrolle wurde die Expression von UAS-mcD8::GFP in denselben Neuronen gewählt. Die Zahlen in den Klammern unter dem Genotyp stehen für die humanen Homologe (Heindorff et al., 2012). In der oberen Zeile ist jeweils der mediane Anteil erfolgloser Versuche an einer 5,0 mm breiten Lücke aufgetragen. Die untere Zeile stellt die vergleichenden p-Werte zwischen dem Verhalten der Fliegen mit RNAi-Regulierung und dem Verhalten der entsprechenden GFP-Kontrolltiere dar. Die signifikanten Unterschiede wurden grau hervorgehoben.

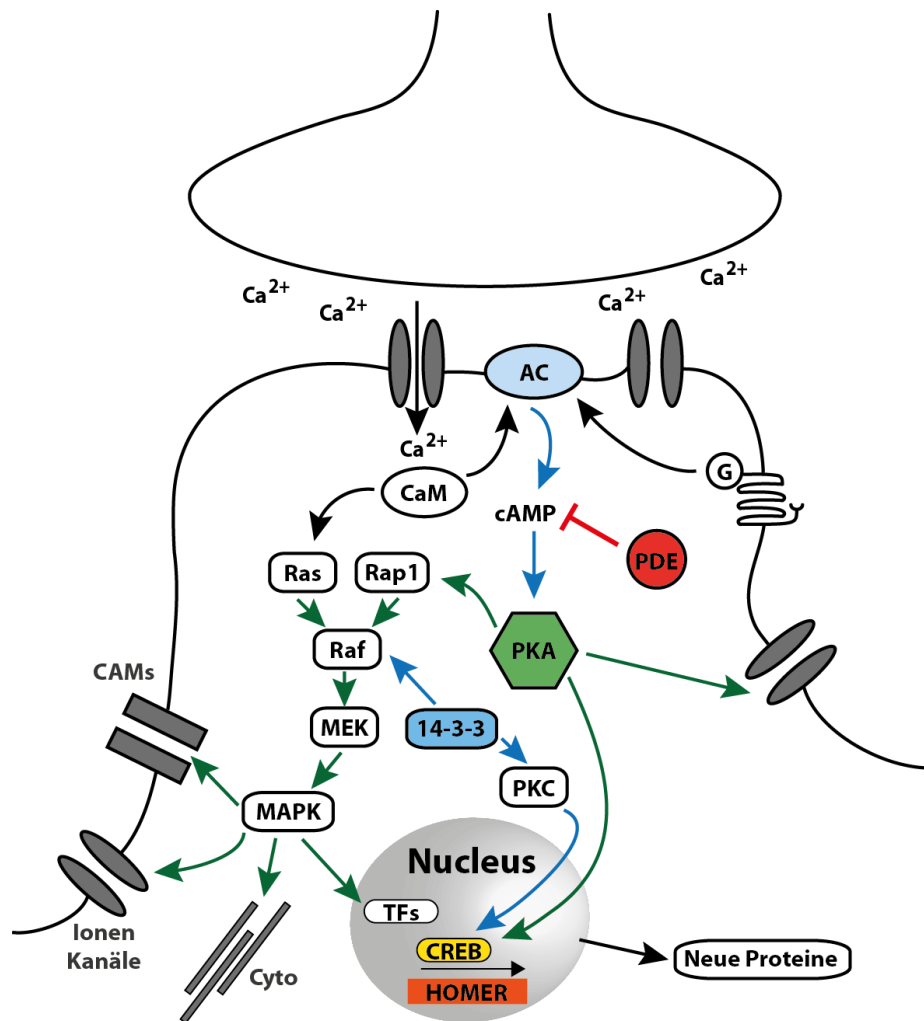
<b>a</b>	<b>210Y</b>	<b>007Y</b>
<i>rut</i> <sup>RNAi</sup> ( 1 )	30% 0,000026	10% 1,000000
<i>ACACC</i> <sup>RNAi</sup> ( 5, 6 )	20% 0,005519	20% 0,077058
<i>AC78C</i> <sup>RNAi</sup> ( 8 )	10% 0,091758	40% 0,000358
<i>AC39E</i> <sup>RNAi</sup> ( 3 )	0% 1,000000	30% 0,000673
<i>CG32305</i> <sup>RNAi</sup>	10% 0,318663	20% 0,015104
<i>AC76E</i> <sup>RNAi</sup> ( 2, 4, 7 )	0% 1,000000	10% 1,000000
<i>AC35C</i> <sup>RNAi</sup> ( 9 )	10% 0,463616	30% 0,004079
<i>ACXD</i> <sup>RNAi</sup> ( 10 )	50% 0,000000	30% 0,012917
<i>ACXA</i> <sup>RNAi</sup> ( 10 )	30% 0,006171	20% 0,777337
<i>ACXB</i> <sup>RNAi</sup> ( 10 )	10% 0,245846	30% 0,001429

<b>b</b>	<b>210Y</b>	<b>007Y</b>
<i>PDE1c</i> <sup>RNAi</sup>	0% 1,000000	10% 1,000000
<i>dnc</i> <sup>RNAi</sup> ( 4 )	0% 1,000000	30% 0,001861
<i>PDE6</i> <sup>RNAi</sup>	10% 0,809571	30% 0,009222
<i>PDE8</i> <sup>RNAi</sup>	40% 0,000056	0% 1,000000
<i>PDE9</i> <sup>RNAi</sup>	60% 0,000000	20% 0,116789
<i>PDE11</i> <sup>RNAi</sup>	50% 0,000019	50% 0,000075

## 4.5 Die Formierung des Körpergrößengedächtnisses

Die Erkenntnisse aus der Kartierung warfen die Frage auf, über welche Regulationsmechanismen diese besonders stabile Form eines *rut*- bzw. *dnc*-abhängigen Langzeitgedächtnisses formiert wird. Es wurden die schon durch andere Lernformen bekannten PKA und der Transkriptionsfaktor CREB auf ihre Rolle beim Körpergrößengedächtnis untersucht (Guven-Ozkan & Davis, 2014). Die katalytische Untereinheit der PKA wurde in den notwendigen PB-Neuronen sowohl überexprimiert, als auch mittels RNAi herunterreguliert (Abbildung 29). Die Manipulation der PKAC1 bewirkte in den 007Y-Neuronen in beiden Fällen ein defizitäres Körpergrößengedächtnis. Auch die Herunterregulierung durch RNAi der regulatorischen Einheit derselben PKA in PFN-Systemen resultierte in Fliegen mit einer eingeschränkten Einschätzung. In 210Y-Neuronen bewirkten die Manipulationen der PKA1 keine verhaltensauffälligen Ausprägungen. Die Regulierung der PKAC3 mittels RNAi bewirkte sowohl mit 210Y als auch mit 007Y vergebliche Kletterversuche an nicht überwindbaren Lücken. Die Formierung des Körpergrößengedächtnisses scheint von CREB in den lateralen Neuronen der PB abhängig zu sein, da die 210Y-Expression einer dominant-negativen Form zu einem Verhaltensdefizit führte (Abbildung 30). Getrieben mit 007Y bewirkte *dCREB2-b* keine Auffälligkeiten. Aufgrund einer eventuellen Leckexpression funktionierte die spatio-temporale Induzierung mittels 210Y-GAL80<sup>ts</sup> leider nicht. Die entsprechenden Individuen versuchten selbst bei 17° C frequentiert die 5,0 mm breite Lücke zu überqueren. Daraufhin wurde nur zeitlich spezifisch, mittels Hsp70 getrieben, jedoch nicht örtlich getrennt. Diese Fliegen konnten vor der Temperaturerhöhung ihre Körpergröße anhand des „optimalen“ Streifenmusters lernen, vergaßen diese jedoch aufgrund der induzierten *dCREB2-b*-Expression wieder. Zumindest versuchten sie nach der Temperaturerhöhung wieder die 5,0 mm breite Lücke zu überklettern. Somit ist wildtypisches CREB für den Abruf des Körperreichweitengedächtnisses in LN der PB absolut notwendig. Eine Überexpression von CREB wirkte sich äußerst schädlich auf die Entwicklung aus. Es kam nicht zum Schlüpfen adulter Insekten. Aufgrund dessen wurde *CREB<sup>+</sup>-17a* mit 007Y-GAL80<sup>ts</sup> getrieben. Nach der Temperaturinduktion waren diese Exemplare nicht mehr in der Lage, ihre Kletterversuche auf überwindbare Lücken zu begrenzen. Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse dafür, dass in den *rut*-abhängigen lateralen Neuronen der Protocerebralbrücke hohe Mengen an cAMP für ein Körperreichweitengedächtnis benötigt werden, während in *dnc*-abhängigen kolumnären PFN-Neuronen geringe Mengen erforderlich sind. Dieser regulierende cAMP-Spiegel wirkt

auf die PKA1, welche über Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB strukturelle Änderungen zu einem Langzeitgedächtnis aktiviert. Die Ergebnisse der Interaktionsstudie mittels doppelt heterozygoter Mutationen lieferten keine eindeutige Bestätigung, dass *rut<sup>1</sup>*, *PKAC1<sup>H</sup>* und *CrebB<sup>S162</sup>* miteinander interagieren (Abbildung 31). Die *rut<sup>1</sup>/PKAC1<sup>H</sup>*-Weibchen hatten zwar ein defizitäres Körpergrößengedächtnis, dieses unterschied sich jedoch nicht statistisch signifikant von dem der heterozygoten *rut<sup>1</sup>/+*-Exemplare. Warum diese nicht nur im homozygoten Zustand ein eingeschränktes Körperreichweitengedächtnis aufweisen, bleibt rätselhaft. Die *CrebB<sup>S162</sup>/PKAC1<sup>H</sup>*-Fliegen zeigten nur wenige erfolglose Kletterversuche und waren nicht signifikant erfolgloser als die heterozygoten *PKAC1<sup>H</sup>/+*-Weibchen. Die einzige eindeutige Interaktion stellte sich zwischen *rut* und *dnc* dar. Die *rut<sup>1</sup>/+*- und *dnc<sup>1</sup>/+*-Fliegen zeigten sich erfolgreicher als ihre doppelt heterozygoten *rut<sup>1</sup>/dnc<sup>1</sup>*-Artgenossen, welche vergeblich versuchten zu überqueren. Auch *homer<sup>R102</sup>*-Fliegen versuchen in 70% der Anläufe die 5,0 mm breite Lücke zu überklettern und unterschieden sich somit höchst signifikant von ihren wildtypischen Verwandten (Abbildung 35). Die Homer-Expression könnte im Prozess des Körpergrößengedächtnisses auch durch CREB reguliert werden, wie es schon beim Langzeitlernen im olfaktorischen klassischen Konditionieren bei *Drosophila* beobachtet wurde (Miyashita et al., 2012). Proteine der Homerfamilie werden mit Synaptogenese, Signaltransduktion und Axonwachstum in Verbindung gebracht. Homer in *Drosophila* ist im ZNS angereichert, lokalisiert sich im Endoplasmatischem Retikulum und wird bei dendritischen Prozessen benötigt. Außerdem spielt Homer eine Rolle in neuronalen Netzwerken der lokomotorischen Kontrolle und der Plastizität des Verhaltens (Diagana et al., 2002). Es existieren eine Menge weiterer Signalwege, welche Beteiligungen an der Formierung eines Körperreichweitengedächtnisses haben könnten. Dafür spricht ebenfalls das eingeschränkte Körpergrößengedächtnis von *leonardo<sup>P1375</sup>/leonardo<sup>2.3</sup>*-Fliegen. Das *leonardo*-Genprodukt kodiert für ein sogenanntes 14-3-3 $\xi$ -Protein und wurde auffällig, weil Mutanten Defizite beim assoziativen olfaktorischen Lernen aufweisen. Diese 14-3-3 $\xi$ -Proteine phosphorylieren RAF-1 im MAPK- (mitogen activated protein kinase) Signalweg (Skoulakis & Davis, 1996). Auch Homer wird vermutlich von der MAPK hoch reguliert und benötigt die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (Miyashita et al., 2012). In kultivierten cerebellaren Zellen wird die mRNA von Homer1a über die MAPK (mitogen activated protein kinase) hoch reguliert (Sato et al., 2001). Diese Kinase und ihre regulatorischen Mechanismen könnten in Zukunft auf eine Rolle beim Körpergrößengedächtnis untersucht werden.



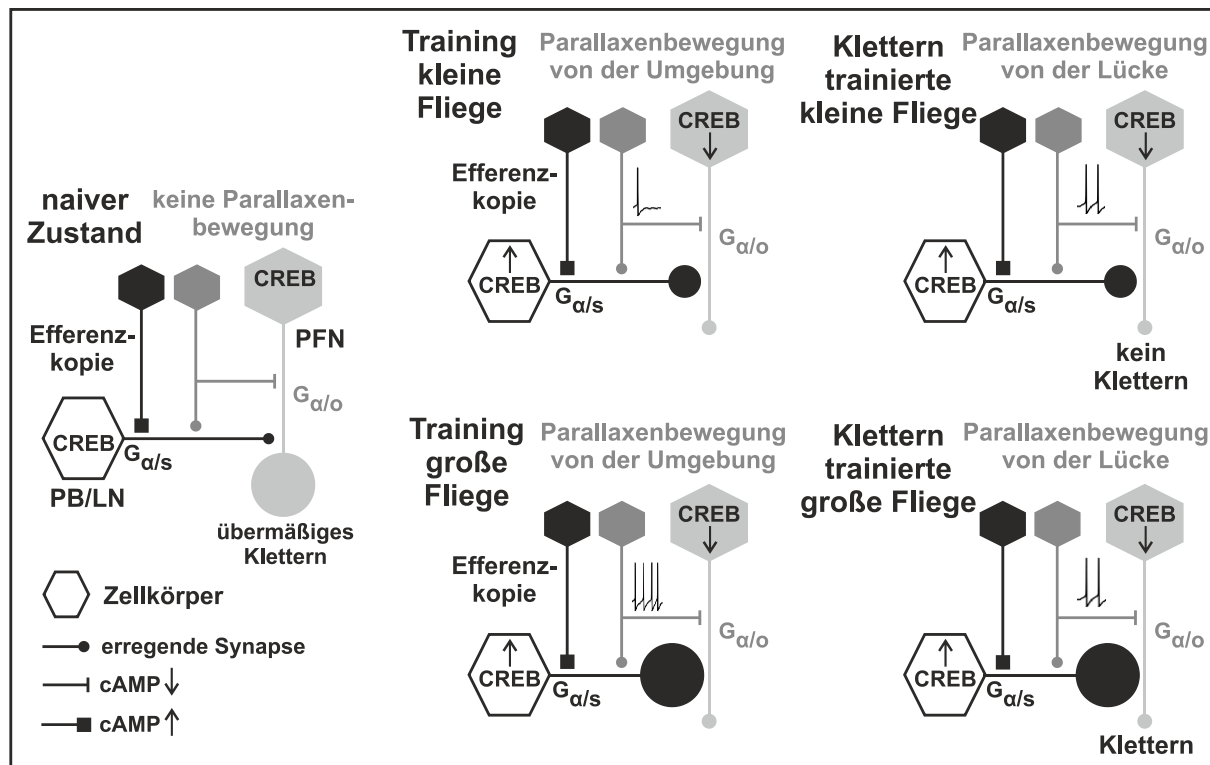
#### Abbildung 40: Modell der am Körpergrößengedächtnis beteiligten Signalwege

Die Abgabe eines erregenden Neurotransmitters an der Synapse depolarisiert ein laterales PB-Neuron und führt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle.  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM stimuliert entweder die Ras-G-Proteinfamilie oder die *rut*-Adenylylzyclase, welche über G-Proteine doppelt reguliert sein können. Die AC bewirkt eine Akkumulation von cAMP. Die PDE8 oder die PDE9 bauen cAMP wieder ab. Dieser sekundäre Botenstoff führt zu einer Aktivierung von PKA, die direkt Ionenkanäle oder den Transkriptionsfaktor CREB phosphorylieren kann. Allerdings sind cAMP und PKA zusätzlich in der Lage via Rap1 die sequentielle Phosphorylierung von Raf, MEK und MAPK einzuleiten. Die aktivierte MAPK hat viele verschiedene Ziele, wie z.B. Transkriptionsfaktoren (TFs), Cytoskelettelemente (Cyto), Ionenkanäle und Zelladhäsionsmoleküle (CAMs). Die 14-3-3- $\xi$ -Proteine aktivieren sowohl Raf, als auch die Proteinkinase C (PKC), welche wiederum CREB phosphoryliert. Proteinexpressionen wie z.B. von HOMER führen letztendlich über strukturelle Veränderungen zu einem LTM. Die farbig dargestellten Proteine spielen eine Rolle bei der Formierung eines Körpergrößengedächtnisses in lateralen PB-Neuronen. Die weiteren Proteine müssten in Zukunft daraufhin untersucht werden (verändert nach Impey et al., 1999).

## 4.6 Ein Modell für Körperreichweitenlernen

Die zusammengeführten Erkenntnisse resultierten in einem Modell, welches die mögliche Verschaltung zwischen lateralen PB-Neuronen und kolumnären PFN-Neuronen darstellt, um ein Körperreichweitenlernen und alle experimentellen Befunde dieser Arbeit zu erklären (Abbildung 41). Kolumnär bedeutet für das Modell, dass ein solches Neuron 16-mal vorkommt und in einer retinotopen Repräsentation jeweils einen Teil des Azimutbereiches des Sehfeldes der Fliege abdecken soll. Auf ein laterales PB-Neuron wirkt die Efferenzkopie des Vorwärtslaufens erregend. Ansonsten könnte nicht zwischen der Umweltbewegung und einer Parallaxe aus Eigenbewegung differenziert werden. An dem G-Protein-Komplex wird GDP durch GTP ersetzt, was die G-Untereinheiten sich abspalten lässt. Die  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit aktiviert wiederum die Adenylylzyklase, welche cAMP generiert (Pierce et al., 2002). Dieser Anstieg an cAMP bewirkt letztendlich die Aktivierung von PKA und somit die Phosphorylierung von CREB. Ein weiteres Neuron repräsentiert die Parallaxenbewegung, die erregend auf das laterale PB-Neuron wirkt, jedoch zu einer Hemmung der AC in einem PFN-Neuron führt, da dieses  $G_{\alpha o}$ -Rezeptoren besitzt. Dieses PFN-Neuron löst im naiven Zustand einer Fliege noch übermäßiges Klettern aus. Bei dem visuellen Training bewirken die Efferenzkopie des Laufbefehls und die aus Strukturen in der Umgebung auf dem Auge generierten Parallaxenbewegungen eine Verstärkung der synaptischen Verbindung zwischen lateralem PB-Neuron und kolumnären PFN-Neuron. Die größeren Fliegen erzeugen wegen ihrer längeren Beine und Schritte mehr Parallaxenbewegung als die kleinen Fliegen bei derselben Schrittzahl. Deswegen wird die synaptische Verbindung zwischen dem lateralen PB-Neuron und dem kolumnären PFN-Neuron bei den großen Fliegen noch massiver verstärkt. Die gleichzeitige Hemmung der AC in dem PFN-Neuron führt sowohl in großen-, als auch in kleinen Individuen zu einer Abschwächung der synaptischen Verbindung, die das Klettern auslöst. Wenn anschließend eine trainierte kleine Fliege an eine sehr breite Lücke kommt, reicht die Parallaxenbewegung, die von der Lücke ausgeht, nicht mehr aus, um das Klettern auszulösen. Wegen der erfolgten Verstärkung der synaptischen Verbindung zwischen lateralem PB-Neuron und kolumnären PFN-Neuron, reicht bei einer trainierten großen Fliege dagegen die Parallaxenbewegung, die von derselben Lücke ausgeht, jedoch aus, um das Klettern auszulösen. Bei einer kleineren Lücke befindet sich die gegenüberliegende Kante weniger weit von der Fliege entfernt. Je näher sich ein Objekt an dem Individuum befindet, desto mehr Parallaxenbewegung löst es bei einer Bewegung des Tieres aus.

Die gegenüberliegende Seitenwand einer kleinen Lücke bewirkt somit mehr Parallaxenbewegung auf der Retina als die einer größeren Spalte. Während des Lernprozesses beim Laufen in strukturierter Umgebung erfolgt eine sehr gute erste Eichung, ab welcher Parallaxenmenge sich ein Kletterversuch lohnt. Diese Eichung wird durch motorisches Lernen später ausgeschärft.



**Abbildung 41: Modell des Körperreichtweitenslernens**

Eine hypothetische Verschaltung zwischen einem lateralen Protocerebralbrückenneuron (PB/LN) und einem kolumnären Neuron (eines von 16 gezeigt), welches die PB, den FB und die No verbindet (PFN). Das schwarze Neuron vermittelt über eine erregende Synapse die Efferenzkopie des Laufens. Die G<sub>α/s</sub>-Untereinheit führt im PB/LN letztendlich zu hohen Mengen an CREB. Das dunkelgraue, kolumnäre und damit 16-mal vorkommende Neuron vermittelt die Parallaxenbewegung in einem bestimmten, retinotop organisierten Azimutbereich. Je mehr Parallaxe generiert wird, desto mehr Aktionspotentiale werden weitergeleitet. Die Dicke der Synapse stellt die Stärke der synaptischen Verbindung dar. Das anfängliche übermäßige Klettern im naiven Zustand wird im PFN-Neuron durch die G<sub>α<sub>o</sub></sub>-Hemmung der AC abgeschwächt. Wegen der massiven Verstärkung der synaptischen Verbindung zwischen PB/LN und PFN, reicht bei einer trainierten großen Fliege die Parallaxe aus, die von einer sehr breiten Lücke ausgeht, um das Klettern auszulösen, nicht jedoch bei einer kleinen Fliege.

## 4.7 Das motorische Lernen

Selbst geköpft Schaben sind in der Lage, die Beinposition assoziativ zu verändern. Die prothorakalen Beine können zur Beugung in einem schmalen Winkelbereich trainiert werden, wenn so ein Elektroschock vermieden werden kann. Elektrophysiologische Ableitungen stellten die relevanten peripheren Motoneurone und die Interneurone zu den posterioren Ganglien dar (Eisenstein & Carlson, 1994). Mittels Drehmomentmessungen im Flugsimulator konnte gezeigt werden, dass *Drosophila* senso-motorisch konditioniert werden kann. Während der Trainingsphase wurde die Fliege mit einem Hitzestrahle bestraft, wann immer sie in eine bestimmte Richtung flog. Daraufhin passte sie ihr Giermoment beim Fliegen an, um die Bestrafung zu verhindern. Die Vermeidungsreaktion hielt noch einige Zeit an, selbst wenn keine Hitze mehr appliziert wurde (Wolf et al., 1998). Die Verbesserungen durch wiederholtes Lückenklettern erfordern jedoch eine komplexere Form des motorischen Lernens, da keine offensichtliche Belohnung oder Bestrafung stattfindet. Der Erwerb von motorischen Fähigkeiten beruht auf der Modifikation und dem Zusammenspiel der Muskelkoordination, um einen effektiven Bewegungsablauf zu generieren. Im motorischen Cortex von Ratten bewirkt wiederholtes motorisches Training eine Langzeitpotenzierung (LTP), eine Verstärkung des synaptischen Ausgangs und ggf. einen Anstieg der Synapsenanzahl pro Neuron und verstärkt den synaptischen Ausgang. Auf diese Weise wird die Topografie der motorischen Repräsentation im Cortex verändert (Monfils et al., 2005). Schon in den 1970er Jahren wurde eine Hypothese aufgestellt, die heute als Marr-Albus-Theorie des motorischen Lernens bezeichnet wird. Diese geht davon aus, dass in der Kleinhirnrinde die Kletterfasern Fehlersignale übertragen, die generiert werden, wenn eine Bewegung nicht den Erwartungen entspricht. Aufgrund von Anpassungen der Effizienz der Eingänge von den Parallelfasern auf die Purkinje-Zellen erfolgen Korrekturen (Marr, 1969; Albus, 1971). Die Plastizität der Synapsen zwischen Parallelfasern und Purkinje-Zellen wurde überprüft, indem kleine elektrische Impulse gleichzeitig in die Kletterfaser und in die Parallelfaser stimuliert wurden. Im Anschluss an diese gekoppelte Reizung löst die Aktivierung der Parallelfaser alleine ein geringeres Exzitatorisches Postsynaptisches Potential (EPSP) in den Purkinje-Zellen aus. Diese Art der Modifikation dauert mindesten eine Stunde an und wird als Langzeitdepression (LTD) bezeichnet (Ito, 2000). Diese Abnahme der postsynaptischen Reaktion resultiert auf Glutamat, das von den Parallelfasern freigesetzt wird. Der Glutamatrezeptor, welcher die exzitatorische Übertragung an dieser Synapse vermittelt, wird als AMPA-Rezeptor

bezeichnet. Sie werden nach der Induktion der LTD von der postsynaptischen Zellmembran zurückgezogen, wodurch die Antwort weniger empfindlich auf Glutamat ausfällt (Bear et al., 2009). Das einzige Beispiel bei Insekten für die Verbesserung motorischer Fähigkeiten, welches publiziert worden ist, beschreibt Hummeln beim Sammeln von Pollen. Deren Kollektionsrate steigert sich kontinuierlich während der wiederholten Blumenanflüge. Außerdem lernen sie die Effizienz einer Pollenbeladung zu verbessern (Raine & Chittka, 2007).

Das motorische Lernen beim Überwinden von Lücken konnte sowohl für die Kurz-, als auch für die Langzeitkomponente in PFN-Neurone kartiert werden. Der lernmutante Phänotyp von *rut<sup>2080</sup>* wurde mit den Treiberlinien 007Y- und R73D06-GAL4 gerettet (Abbildung 37). Die Steigerung der Überquerungsrate zu einem Kurzzeitgedächtnis war mittels verschiedener Treiberlinien bei den partiellen Rettungen möglich. Davon exprimieren einige in lateralen Neuronen der PB und andere in diversen Pilzkörperkomponenten (Tabelle 4). Bei diesen nicht eindeutigen Ergebnissen besteht die Möglichkeit, dass unterschiedliche Strategien gerettet wurden, die letztendlich zu einer Steigerung der Überquerungsrate führten. Es wäre z.B. denkbar, dass die Körperposition und ihre Verbesserung in der PB, die Klettermotivation dagegen im Pilzkörper repräsentiert seien. Bis zu diesem Zeitpunkt ist noch nicht geklärt, warum mb247-GAL4 als einzige der verwendeten Pilzkörperlinien beide Gedächtniskomponenten gerettet hat. Es könnte allerdings sein, dass die publizierte mcD8::GFP-Expression (Aso et al., 2009) nicht hundertprozentig die von *rut* widerspiegelt. Das Expressionsmuster, welches in der Immunhistologie entsteht, hängt sehr stark von den verwendeten Reportern und Antikörpern ab. Bei der Verwendung von tau-GFP als Reporter im Muster von mb247-GAL4 stellten sich zusätzliche Expressionen im EB, FB und in den Noduli dar (Poeck et al., 2008). Es existiert leider kein spezifischer *rut*-Antikörper, der die Expression von *rut* selbst immunhistologisch darstellen könnte, um die Frage zu beantworten, ob UAS-*rut* getrieben mit mb247-GAL4 in PFN-Neuronen exprimiert wird. Auf diese Weise wäre das motorische Langzeitgedächtnis eingegrenzt auf diese Neuronengruppe kartiert. In zukünftigen Projekten könnte auch ein Reporter gen an ein *rut*-Konstrukt geheftet werden, welches mit binären Systemen ektopisch zu exprimieren wäre.

Des Weiteren stellte sich die Frage, welche Details des Bewegungsablaufs beim Klettern sich verbesserten und in einer gesteigerten Überquerungsrate resultierten. Deswegen wurden Fliegen auf einer linearen Kletterschiene trainiert und dabei mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet. Die Schiene brachte im Vergleich zum



Ring den Vorteil, dass die frei beweglichen Tiere wie auf einem Laufband stets im Fokus der stationären Kamera gehalten wurden. Die Videoauswertung brachte drei Komponenten zum Vorschein, welche sich kurzzeitig sowie langfristig veränderten (Abbildung 38). Der Winkel der Körperposition wurde spitzer und die Abstände des Abdomens zur Lückenkante und zwischen den Beinpaaren verringerten sich. Diese Module hängen letztendlich miteinander zusammen, um die optimale Position über der Lücke zu erlangen. Taufliegen sind auch in der Lage, ihren Bewegungsablauf an Verletzungen anzupassen. Sie konnten den anfänglich geringeren Überquerungserfolg, der aus einer Tarsussegment-Amputation resultierte, beim Test am Folgetag kompensieren. Überraschenderweise waren sie sogar wieder so erfolgreich wie ihre intakten Artgenossen (Abbildung 39). In der detaillierten Hochgeschwindigkeitsanalyse fiel ein Strategiewechsel auf. Die Fliege versuchte das beim Klettern abrutschende verletzte Mittelbein am Folgetag nicht mehr zu belasten und legte es auf der gegenüberliegenden Lückenkante ab. Es scheint, dass diese kleinen Insekten zur Adaptation an ihren Körperzustand befähigt sind und somit ihr Nervensystem eine zumindest einfache Repräsentation des Körpers vorhält.

**Tabelle 4: Übersicht der partiellen Rettungen beim motorischen Lernen:**

Die Weibchen der *rut<sup>2080</sup>*; UAS-*rut<sup>+</sup>*-Linie wurden mit verschiedenen GAL4-Treiber männchen gekreuzt, welche im Pilzkörper oder in der PB-Region exprimieren. Die Einteilung der Expressionsregion im Pilzkörper erfolgte nach (Aso et al., 2009). Die Loben werden noch spezifischer unterteilt in die Bereiche c (core), s (surface), p (posterior), a (anterior), m (middle) und d (dorsal). Die Einteilung der PB erfolgte nach den immunhistologischen Färbungen (Abbildung 24-Abbildung 26). Die Sterne beziehen sich auf eine signifikante Steigerung im Vergleich zum naiven Lauf. Ansonsten hat **keine** Steigerung stattgefunden. Die STM-Komponente setzt sich aus der jeweils höheren Überquerungsrate im zweiten oder dritten Lauf des Individuums zusammen (Abbildung 37).

Linien, die im Pilzkörper exprimieren					
	zweiter	dritter	STM	LTM	Region
c739	keine	keine	keine	keine	$\alpha\beta$ (c.s.p.)
c305a	keine	keine	keine	keine	$\alpha'\beta'$ (a.m.p.) EB
H24	keine	keine	*	keine	$\gamma$ (main, d.) FB, EB
201Y	keine	**	***	keine	$\alpha\beta$ (c.) $\gamma$ (main)
mb247	***	*	***	***	$\alpha\beta$ (c.s.p.) $\gamma$ (main, d)
c309	keine	keine	keine	keine	$\alpha\beta$ (c.s.p.) $\gamma$ (main, d)
OK107	**	keine	***	keine	$\alpha\beta$ $\alpha'\beta'$ $\gamma$ (überall)
Linien, die in der Protocerebralbrücke exprimieren					
007Y	keine	keine	***	***	PFN, EB, Ca
210Y	keine	keine	*	keine	PB lateral, FB, Ca; pi
R55G08	keine	keine	**	keine	PB lateral
R65A06	*	no	***	keine	PB lateral, PFN
R73D06	*	*	***	**	PFN

## 4.8 Ausblicke

Im Zeitraum dieser Dissertation entstanden hoch-spezifische GAL4-Linien, mit denen in einzelnen Neuronen exprimiert werden kann (Wolff et al., 2014). Wenn mit diesen nun *rut<sup>1</sup>*- und *dnc<sup>1</sup>*-Rettungen durchgeführt werden, kann eine exakte Kartierung des Körpergrößengedächtnisses durchgeführt werden. Auf diese Weise ist die Frage zu beantworten, in welchen lateralen PB-Neuronen *rut* benötigt wird und in welchen der drei PFN-Systeme *dnc* notwendig ist. Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass ein lebenslanges Körpergrößengedächtnis durch epigenetische Mechanismen konsolidiert wird, die zu permanenten Veränderungen in der Expression von CREB-Zielgenen führen. Im Moment läuft in der Arbeitsgruppe von Roland Strauß ein Projekt, in dem solche möglichen Kandidaten mittels RNAi in lateralen PB-Neuronen reguliert werden.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation wird ein Körpergrößengedächtnis untersucht. Es wird dargestellt, wie diese Information über die Reichweite der Fliege beim Lückenklettern unter kontrollierten Umweltbedingungen erworben und prozessiert wird. Zusätzlich wird geklärt, welche biochemischen Signale benötigt werden, um daraus ein lang anhaltendes Gedächtnis zu formen. Adulte Fliegen sind in der Lage, ihre Körperreichweite zu lernen. Naive Fliegen, die in der Dunkelheit gehalten wurden, versuchen erfolglos, zu breite Lücken zu überqueren, während visuell erfahrene Fliegen die Kletterversuche an ihre Körpergröße anpassen. Erfahrene kleine Fliegen scheinen Kenntnis ihres Nachteils zu haben. Sie kehren an Lückenbreiten um, welche ihre größeren Artgenossen durchaus noch versuchen. Die Taufiegen lernen die größenabhängige Reichweite über die visuelle Rückmeldung während des Laufens (aus Parallaxenbewegung). Dabei reichen 15 min in strukturierter, heller Umgebung aus. Es gibt keinen festgelegten Beginn der sensiblen Phase. Nach 2 h ist das Gedächtnis jedoch konsolidiert und kann durch Stress nicht mehr zerstört oder durch sensorische Eingänge verändert werden. Dunkel aufgezogene Fliegen wurden ausgewählten Streifenmustern mit spezifischen Raumfrequenzen ausgesetzt. Nur die Insekten, welche mit einem als „optimal“ klassifizierten Muster visuell stimuliert wurden, sind in der Lage, die Körperreichweite einzuschätzen, indem die durchschnittliche Schrittlänge in Verbindung mit der visuellen Wahrnehmung gebracht wird. Überraschenderweise ist es sogar mittels partieller Kompensation der Parallaxen möglich, naive Fliegen so zu trainieren, dass sie sich wie kleinere Exemplare verhalten. Da die Experimente ein Erlernen der Körperreichweite vermuten lassen, wurden lernmutante Stämme beim Lückenüberwinden getestet. Sowohl die Ergebnisse von *rut<sup>1</sup>*- und *dnc<sup>1</sup>*-Mutanten, als auch das defizitäre Klettern von *oc<sup>1</sup>*-Fliegen ließ eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Lernkaskade in der Protocerebralbrücke (PB) vermuten. Rettungsexperimente der *rut<sup>1</sup>*- und *dnc<sup>1</sup>*-Hintergründe kartierten das Gedächtnis in unterschiedliche Neuronengruppen der PB, welche auch für die visuelle Ausrichtung des Kletterns benötigt werden. Erstaunlicherweise haben laterale lokale PB-Neurone und PFN-Neurone (Projektion von der PB über den fächerförmigen Körper zu den Noduli) verschiedene Erfordernisse für cAMP-Signale. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass hohe Mengen an

cAMP/PKA-Signalen in den latero-lateralen Elementen der PB benötigt werden, während kolumnäre PFN-Neurone geringe oder keine Mengen an cAMP/PKA erfordern. Das Körperreichweitengedächtnis ist vermutlich das am längsten andauernde Gedächtnis in *Drosophila*. Wenn es erst einmal konsolidiert ist hält es länger als drei Wochen.

Außerdem kann die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* trainiert werden, die komplexe motorische Aufgabe des Lückenkletterns zu optimieren. Die trainierten Fliegen werden erfolgreicher und schneller beim Überqueren von Lücken, welche größer sind als sie selbst. Dabei existiert eine Kurzzeitkomponente (STM), die 40 min nach dem ersten Training anhält. Nach weiteren vier Trainingsdurchläufen im Abstand von 20 min wird ein Langzeitgedächtnis (LTM) zum Folgetag geformt. Analysen mit Mutationslinien wiesen eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Lernkaskade an dieser Gedächtnisform auf. Rettungsexperimente des *rut<sup>2080</sup>*-Hintergrunds kartierten sowohl das STM, als auch das LTM in PFN-Neuronen. Das STM kann aber ebenso in den alpha- und beta- Loben der Pilzkörper gerettet werden.

Letztendlich sind wildtypische Fliegen sogar in der Lage, sich an einen Verlust eines Mittelbeintarsuses und dem einhergehenden Fehlen des Adhäsionsorgans am Tarsusende anzupassen. Das Klettern wird zwar sofort schlechter, erholt sich aber bis zum Folgetag wieder auf ein normales Niveau. Dieser neue Zustand erfordert ein Gedächtnis für die physischen Möglichkeiten, die nur durch plastische Veränderungen im Nervensystem des Insekts erreicht werden können.

## 5.2 Summary of the Results

In this PhD-thesis a body-size memory in *Drosophila* is analyzed. It is described how the information on the reach of the fly in gap crossing is retrieved from the environment and processed under controlled experimental conditions and which biochemical pathways are required to establish a long-lasting memory. Adult flies learn their reach after hatching, because visually naive flies try to unsuccessfully overcome insurmountable gaps, whereas visually experienced flies abandon climbing attempts depending on their body size. Experienced small flies know about their disadvantage, because they turn back at gaps, which their larger siblings still attempt to climb. The fruit flies learn the individual reach by the visual feedback (parallax motion) produced during walking. 15 min of walking in a structured, illuminated environment are sufficient. There is no fix start of a sensible phase, but 2 h after learning the memory is consolidated and

cannot be erased by stress nor altered by sensory input. Dark-reared flies were exposed to defined environments with dark and bright stripes of selected pattern wave lengths. Just the flies, which were stimulated with a pattern defined as “optimal”, were able to estimate distance and body reach by connecting the visual input with their averaged step size. Surprisingly, it is also possible, via partial compensation of the parallax motion, to train naïve flies such that they take decisions like smaller ones. Because the experiments suggested that the knowledge about body reach is gained through learning, mutants impaired in learning and memory formation were tested in gap-crossing. The results on *rut<sup>1</sup>*- and *dnc<sup>1</sup>*-mutants together with the impaired climbing behavior of *oc<sup>1</sup>*-flies, suggested that a regulated cAMP signaling cascade is required in the protocerebral bridge (PB). Rescue experiments of *rut<sup>1</sup>*- and *dnc<sup>1</sup>*-mutant flies mapped on different subsets of PB-neurons, which are required also for visual targeting of the gap. Surprisingly, lateral local neurons of the PB and PFN-neurons (projecting from the PB to the fan-shaped body and the noduli) had opposing requirements for cAMP signaling. Together these experiments suggest that latero-lateral elements of the PB require elevated levels of cAMP/PKA signalling, which then lead to activation of the transcription factor dCREB, to establish a long-lasting memory of body reach in flies. In contrast, columnar PB neurons depend on reduced or inactive cAMP/PKA signalling to have this effect. The body-reach memory is assumed to be the longest in *Drosophila*, because once it is consolidated, it lasts for more than three weeks.

In addition to the size memory the fruit fly *Drosophila melanogaster* can also improve the complex motor task of crossing gaps by training. Trained flies get more successful and faster in climbing over chasms wider than their own body size. A short-term memory (STM) component is identified, which is effective until 40 min after training. After four consecutive training sessions of 1 min interspaced with 20 min pauses on day one a long-term memory can form. Mutational analysis suggests that the cAMP biochemical cascade of learning is required to establish this memory. Rescue experiments of *rut<sup>2080</sup>*-mutant flies map to PFN-neurons for both memory parts. Just the STM can also be rescued in alpha and beta lobes of the mushroom bodies.

Last not least wild type flies can adapt to the loss of one tarsus and the adhesive organ at the tip of the leg on one of their middle legs. Climbing over chasms of the severed flies is impaired initially, but the success rate gets back to normal on the following day. This new state implies existence of a memory for physical abilities which can only be formed by plastic changes in the nervous system of the insect.

## 6. Verzeichnis

### 6.1 Literatur

Albus, J.S. (1971). A Theory of Cerebellar Function. *Mathematical Biosciences* 10, 25-61.

Aso, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., Tanimoto, H. (2009). The Mushroom Body of Adult *Drosophila* Characterized by GAL4 Drivers. *Journal of Neurogenetics* 23, 156-172.

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (2009). *Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 3. Auflage, 877-882.

Benzer, S. (1967). Behavioral Mutants of *Drosophila* Isolated by Countercurrent Distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58, 1112-1119.

Boyan, G.S., Reichert, H. (2011). Mechanisms for Complexity in the Brain: Generating the Insect Central Complex. *Trends in Neurosciences* 34, 247-257.

Brand, A.H., Perrimon, N. (1993). Targeted Gene Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Cann, M.J., Chung, E., Levin, L.R. (2000). A New Family of Adenylyl Cyclase Genes in the Male Germline of *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* 210, 200-206.

Chen, S., Lee, A.Y., Bowens, N.M., Huber, R., Kravitz, E.A. (2002). Fighting Fruit Flies: A Model system for the Study of Aggression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5664-5668.

Clyne, P.J., Brotman, J.S., Sweeney, S.T., Davis, G. (2003). Green Fluorescent Protein Tagging *Drosophila* Proteins at their Native Genomic Loci with Small P Elements. *Genetics* 165, 1433-1441.

Davis, R.L. (1993). Mushroom Bodies and *Drosophila* Learning. *Neuron* 11, 1-14.

Davis, R.L. (1996). Physiology and Biochemistry of *Drosophila* Learning Mutants. *Physiological Reviews* 76, 299-317.

Davis, R.L. (2005). Olfactory Memory Formation in *Drosophila*: From Molecular to Systems Neuroscience. *Annual Review of Neuroscience* 28, 275-302.

Day, J.P., Dow, J.A., Houslay, M.D., Davies, S.A. (2005). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Journal* 388, 333-342.

- Diagana, T.T., Thomas, U., Prokopenko, S.N., Xiao, B., Worley, P.F., Thomas, J.B. (2002). Mutation of *Drosophila homer* Disrupts Control of Locomotor Activity and Behavioral Plasticity. *The Journal of Neuroscience* 22, 428-436.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., Dickson, B.J. (2007). A Genome-Wide Transgenic RNAi Library for Conditional Gene Inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448, 151-156.
- Dubnau, J., Tully, T. (1998). Gene Discovery in *Drosophila*: New Insights for Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience* 21, 407-444.
- Dudai, Y., Jan, Y.N., Byers, D., Quinn, W.G., Benzer, S. (1976). *dunce*, a Mutant of *Drosophila* Deficient in Learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1684-1688.
- Duvall, L.B., Taghert, P.H. (2012). The Circadian Neuropeptide PDF Signals Preferentially Through a Specific Adenylate Cyclase Isoform AC3 in M Pacemakers of *Drosophila*. *PLoS Biology* 10, e1001337.
- Duvall, L.B., Taghert, P.H. (2013). E and M Circadian Pacemaker Neurons Use Different PDF Receptor Signalosome Components in *Drosophila*. *Journal of Biological Rhythms* 28, 239-248.
- Eckert, V. (2013). Entwicklung eines Trainingsparadigmas für *Drosophila melanogaster* zur Messung von Verhaltensoptimierungen durch motorisches Lernen. Bachelorarbeit, Universität Mainz.
- Eisenstein, E.M., Carlson, A.D. (1994). Leg Position Learning in the Cockroach Nerve Cord Using an Analog Technique. *Physiology & Behavior* 56, 687-691.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998). Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- 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.
- Ganguly-Fitzgerald, I., Donlea, J., Shaw, P.J. (2006). Waking Experience Affects Sleep Need in *Drosophila*. *Science* 313, 1775-1781.
- Goodwin, S.F., Del Vecchio, M., Velinzon, K., Hogel, C., Russell, S.R., Tully, T., Kaiser, K. (1997). Defective Learning in Mutants of the *Drosophila* Gene for a Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience* 17, 8817-8827.
- Groth, A.C., Fish, M., Nusse, R., Calos, M.P. (2004). Construction of Transgenic *Drosophila* by Using the Site-Specific Integrase From Phage  $\phi$ C31. *Genetics* 166, 1775-1782.
- Guven-Ozkan, T., Davis, R.L. (2014). Functional Neuroanatomy of *Drosophila* Olfactory Memory Formation. *Learning & Memory* 21, 519-526.

Hanesch, U., Fischbach, K.F., Heisenberg, M. (1989). Neuronal Architecture of the Central Complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research* 257, 343-366.

Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A. (2002). Higher Brain Functions of PACAP and a Homologous *Drosophila* Memory Gene *amnesiac*: Insights from Knockouts and Mutants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297, 427-432.

Heindorff, K., Blenau, W., Walz, B., Baumann, O. (2012). Characterization of a Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent AC1 Adenylyl Cyclase in a Non-Neuronal Tissue, the Blowfly Salivary Gland. *Cell Calcium* 52, 103-112.

Heinze, S., Homberg, U. (2007). Maplike Representation of Celestial E-Vector Orientations in the Brain of an Insect. *Science* 315, 995-997.

Heisenberg, M., Böhl, K. (1979). Isolation of Anatomical Brain Mutants of *Drosophila* by Histological Means. *Zeitschrift für Naturforschung* 34c, 143-174.

Heisenberg, M., Wolf, R. (1984). *Vision in Drosophila*. Genetics of Microbehavior. Studies of Brain Function 12, Springer, New York, Heidelberg.

Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W.J., Reichert, H., Furukubo-Tokunaga, K. (1995). Developmental Defects in Brain Segmentation Caused by Mutations of the Homeobox Genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* 15, 769-778.

Impey, S., Obrietan, K., Storm, D.R. (1999). Making New Connections: Role of ERK/MAP Kinase Signaling in Neuronal Plasticity. *Neuron* 23, 11-14.

Ito, M. (2000). Mechanisms of Motor Learning in the Cerebellum<sup>1</sup>. *Brain Research* 886, 237-245.

Jenett, A., Rubin, G.M., Ngo, T.T., Shepherd, D., Murphy, C., Dionne, H., Pfeiffer, B.D., Cavallaro, A., Hall, D., Jeter, J., Iyer, N., Fetter, D., Hausenfluck, J.H., Peng, H., Trautman, E.T., Svirskas, R.R., Myers, E.W., Iwinski, Z.R., Aso, Y., DePasquale, G.M., Enos, A., Hulamm, P., Lam, S.C., Li, H.H., Lavery, T.R., Long, F., Qu, L., Murphy, S.D., Rokicki, K., Safford, T., Shaw, K., Simpson, J.H., Sowell, A., Tae, S., Yu, Y., Zugates, C.T. (2012). A GAL4-Driver Line Resource for *Drosophila* Neurobiology. *Cell Reports* 2, 991-1001.

Kalderon, D., Rubin, G.M. (1988). Isolation and Characterization of *Drosophila* cAMP-Dependent Protein Kinase Genes. *Genes & Development* 2, 1539-1556.

Kanasaki, H., Purwana, I.N., Miyazaki, K. (2013). Possible Role of PACAP and Its PAC1 Receptor in the Differential Regulation of Pituitary LHbeta- and FSHbeta-Subunit Gene Expression by Pulsatile GnRH Stimulation. *Biology of Reproduction* 88, 1-5.

Karim, F.D., Chang, H.C., Themen, M., Wassarman, D.A., Lavery, T., Rubin, G.M. (1996). A Screen for Genes That Function Downstream of Ras1 During *Drosophila* Eye Development. *Genetics* 143, 315-329.

Kennerdell, J.R., Carthew, R.W. (1998). Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* Act in the Wingless Pathway. *Cell* 95, 1017-1026.



- Kienitz, B. (2010). Motorisches Lernen in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Mainz, Shaker Verlag, Aachen.
- Kitamoto, T. (2001). Conditional Modification of Behavior in *Drosophila* by Targeted Expression of a Temperature-Sensitive *shibire* Allele in Defined Neurons. *Journal of Neurobiology* 47, 81-92.
- Krause, T. (2009). Verhaltensanpassung an die individuelle Körpergröße in *Drosophila melanogaster*. Eine Körperrepräsentation in Insekten? Diplomarbeit, Universität Mainz .
- Kristan, W.B. (2014). Behavioral Sequencing: Competitive Queuing in the Fly CNS. *Current Biology* 24, 743-746.
- Kuntz, S., Poeck, B., Sokolowski, M.B., Strauss, R. (2012). The Visual Orientation Memory of *Drosophila* Requires Foraging (PKG) Upstream of Ignorant (RSK2) in Ring Neurons of the Central Complex. *Learning & Memory* 19, 337-340.
- Leung, B., Waddell, S. (2004). Four-Dimensional Gene Expression Control: Memories on the Fly. *Trends in Neurosciences* 27, 511-513.
- 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  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Responsive Adenylyl Cyclase. *Cell* 68, 479-489.
- Lin, C.Y., Chuang, C.C., Hua, T.E., Chen, C.C., Dickson, B.J., Greenspan, R.J., Chiang, A.S. (2013). A Comprehensive Wiring Diagram of the Protocerebral Bridge for Visual Information Processing in the *Drosophila* Brain. *Cell Reports* 3, 1739-1753.
- Liu, G., Seiler, H., Wen, A., Zars, T., Ito, K., Wolf, R., Heisenberg, M., Liu, L. (2006). Distinct Memory Traces for two Visual Features in the *Drosophila* Brain. *Nature* 439, 551-556.
- Livingstone, M.S., Sziber, P.P., Quinn, W.G. (1984). Loss of Calcium/ Calmodulin Responsiveness in Adenylate Cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* Learning Mutant. *Cell* 37, 205-215.
- Marr, D. (1969). A Theory of Cerebellar Cortex. *The Journal of Physiology* 202, 437-470.
- Mayford, M., Kandel, E.R. (1999). Genetic Approaches to Memory Storage. *Trends in Genetics* 15, 463-470.
- McBride, S.M., Giuliani, G., Choi, C., Krause, P., Correale, D., Watson, K., Baker, G., Siwicki, K.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.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765-1768.
- Mehren, J.E., Ejima, A., Griffith, L.C. (2004). Unconventional Sex: Fresh Approaches to Courtship Learning. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 745-750.

- Mery, F., Belay, A.T., So, A.K., Sokolowski, M.B., Kawecki, T.J. (2007). Natural Polymorphism Affecting Learning and Memory in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13051-13055.
- Miyashita, T., Oda, Y., Horiuchi, J., Yin, J.C., Morimoto, T., Saitoe, M. (2012). Mg<sup>2+</sup> Block of *Drosophila* NMDA Receptors Is Required for Long-Term Memory Formation and CREB-Dependent Gene Expression. *Neuron* 74, 887-898.
- Monfils, M.H., Plautz, E.J., Kleim, J.A. (2005). In Search of the Motor Engram: Motor Map Plasticity as a Mechanism for Encoding Motor Experience. *The Neuroscientist* 11, 471-483.
- Neuser, K., Triphan, T., Mronz, M., Poeck, B., and Strauss, R. (2008). Analysis of a Spatial Orientation Memory in *Drosophila*. *Nature* 453, 1244-1247.
- Nighorn, A., Healy, M.J., and Davis, R.L. (1991). The Cyclic AMP Phosphodiesterase Encoded by the *Drosophila dunce* Gene is Concentrated in the Mushroom Body Neuropil. *Neuron* 6, 455-467.
- Osborne, K.A., Robichon, A., Burgess, E., Butland, S., Shaw, R.A., Coulthard, A., Pereira, H.S., Greenspan, R.J., Sokolowski, M.B. (1997). Natural Behavior Polymorphism Due to a cGMP-Dependent Protein Kinase of *Drosophila*. *Science* 277, 834-836.
- Penfield, W., Rasmussen, T. (1950). *The Cerebral Cortex of Man*. The Macmillan Company, New York.
- Pfeiffer, B.D., Jenett, A., Hammonds, A.S., Ngo, T.T., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J.W., Wan, K.H., Lavery, T.R., Mungall, C., Svirskas, R., Kadonaga, J.T., Doe, C.Q., Eisen, M.B., Celniker, S.E., Rubin, G.M. (2008). Tools for Neuroanatomy and Neurogenetics in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9715-9720.
- Pfeiffer, B.D., Ngo, T.T., Hibbard, K.L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J.W., Rubin, G.M. (2010). Refinement of Tools for Targeted Gene Expression in *Drosophila*. *Genetics* 186, 735-755.
- Phelps, C.B., Brand, A.H. (1998). Ectopic Gene Expression in *Drosophila* Using GAL4 System. *Methods* 14, 367-379.
- Pick, S., and Strauss, R. (2005). Goal-Driven Behavioral Adaptations in Gap-Climbing *Drosophila*. *Current Biology* 15, 1473-1478.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-Transmembrane Receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 639-650.
- Poeck, B., Triphan, T., Neuser, K., and Strauss, R. (2008). Locomotor Control by the Central Complex in *Drosophila*- An Analysis of the *tay bridge* Mutant. *Developmental Neurobiology* 68, 1046-1058.
- Power, M.E. (1943). The Brain of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology* 72, 517-559.

- Putz, G., Bertolucci, F., Raabe, T., Zars, T., Heisenberg, M. (2004). The S6KII (rsk) Gene of *Drosophila melanogaster* Differentially Affects an Operant and a Classical Learning Task. *Journal of Neuroscience* 24, 9745-9751.
- Quinn, W.G., Dudai, Y. (1976). Memory Phases in *Drosophila*. *Nature* 262, 576-577.
- Quinn, W.G., Greenspan, R.J. (1984). Learning and Courtship in *Drosophila*: Two Stories with Mutants. *Annual Review of Neuroscience* 7, 67-93.
- Quinn, W.G., Harris, W.A., Benzer, S. (1974). Conditioned Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 708-712.
- Quinn, W.G., Sziber, P.P., Booker, R. (1979). The *Drosophila* Memory Mutant *amnesiac*. *Nature* 277, 212-214.
- Raine, N., and Chittka, L. (2007). Pollen Foraging: Learning a Complex Motor Skill by Bumblebees (*Bombus terrestris*). *Naturwissenschaften* 94, 459-464.
- Rosenzweig, M., Brennan, K.M., Tayler, T.D., Phelps, P.O., Patapoutian, A., Garrity, P.A. (2005). The *Drosophila* Ortholog of Vertebrate TRPA1 Regulates Thermotaxis. *Genes & Development* 19, 419-424.
- Sato, M., Suzuki, K., Nakanishi, S. (2001). NMDA Receptor Stimulation and Brain-Derived Neurotrophic Factor Upregulate Homer 1a mRNA via the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Cultured Cerebellar Granule Cells. *The Journal of Neuroscience* 21, 3797-3805.
- Scheunemann, L., Jost, E., Richlitzki, A., Day, J.P., Sebastian, S., Thum, A.S., Efetova, M., Davies, S.A., Schwaerzel, M. (2012). Consolidated and Labile Odor Memory are Separately Encoded within the *Drosophila* Brain. *The Journal of Neuroscience* 32, 17163-17171.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., Heisenberg, M. (2003). Dopamine and Octopamine Differentiate between Aversive and Appetitive Olfactory Memories in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 23, 10495-10502.
- Siegel, R.W., Hall, J.C. (1979). Conditioned Responses in Courtship Behavior of Normal and Mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3430-3434.
- Skoulakis, E.M., Davis, R.L. (1996). Olfactory Learning Deficits in Mutants for *leonardo*, a *Drosophila* Gene Encoding a 14-3-3 Protein. *Neuron* 17, 931-944.
- Skoulakis, E.M., Kalderon, D., and Davis, R.L. (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.
- Sokolowski, M.B. (1980). Foraging Strategies of *Drosophila melanogaster*: A Chromosomal Analysis. *Behavior Genetics* 10, 291-302.

Strauss, R. (2002). The Central Complex and the Genetic Dissection of Locomotor Behaviour. *Current Opinion in Neurobiology* 12, 633-638.

Strauss, R., Heisenberg, M. (1990). Coordination of Legs during Straight Walking and Turning in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 167, 403-412.

Strauss, R., Pichler, J. (1998). Persistence of Orientation Toward a Temporarily Invisible Landmark in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 182, 411-423.

Strauss, R., Schuster, S., Götz, K.G. (1997). Processing of Artificial Visual Feedback in the Walking Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* 200, 1281-1296.

Sweeney, S.T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H., O'Kane, C.J. (1995). Targeted Expression of Tetanus Toxin Light Chain in *Drosophila* Specifically Eliminates Synaptic Transmission and Causes Behavioral Defects. *Neuron* 14, 341-351.

Tempel, B.L., Bonini, N., Dawson, D.R., Quinn, W.G. (1983). Reward Learning in Normal and Mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 1482-1486.

Tomchik, S.M., Davis, R.L. (2009). Dynamics of Learning-Related cAMP Signaling and Stimulus Integration in the *Drosophila* Olfactory Pathway. *Neuron* 64, 510-521.

Triphan, T., Poeck, B., Neuser, K., Strauss, R. (2010). Visual Targeting of Motor Actions in Climbing *Drosophila*. *Current Biology* 20, 663-668.

Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C., Del Vecchio, M. (1994). Genetic Dissection of Consolidated Memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 35-47.

Tully, T., and Quinn, W.G. (1985). Classical Conditioning and Retention in Normal and Mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 157, 263-277.

Venken, K.J., Bellen, H.J. (2014). Chemical Mutagens, Transposons, and Transgenes to Interrogate Gene Function in *Drosophila melanogaster*. *Methods* 68, 15-28.

Venken, K.J., Simpson, J.H., Bellen, H.J. (2011). Genetic Manipulation of Genes and Cells in the Nervous System of the Fruit Fly. *Neuron* 72, 202-230.

Waddell, S., Quinn, W.G. (2001). Flies, Genes, and Learning. *Annual Review of Neuroscience* 24, 1283.

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.

- 
- Wolff, T., Iyer, N.A., Rubin, G.M. (2014). Neuroarchitecture and Neuroanatomy of the *Drosophila* Central Complex: A GAL4-Based Dissection of Protocerebral Bridge Neurons and Circuits. *Journal of Comparative Neurology (Early View)*.
- Wustmann, G., Rein, K., Wolf, R., Heisenberg, M. (1996). A New Paradigm for Operant Conditioning of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 179, 429-436.
- Yin, J.C., Wallach, J.S., Del Vecchio, M., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G., and Tully, T. (1994). Induction of a Dominant Negative CREB Transgene Specifically Blocks Long-Term Memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 49-58.
- Young, J.M., Armstrong, J.D. (2010). Structure of the Adult Central Complex in *Drosophila*: Organization of Distinct Neuronal Subsets. *The Journal of Comparative Neurology* 518, 1500-1524.
- Zars, T., Wolf, R., Davis, R., and Heisenberg, M. (2000). Tissue-Specific Expression of a Type I Adenylyl Cyclase Rescues the *rutabaga* Mutant Memory Defect: In Search of the Engram. *Learning & Memory* 7, 18-31.

## 6.2 Abbildungen

Abbildung 1: Das GAL4-UAS-System .....	5
Abbildung 2: Modell für aversives olfaktorisches Lernen.....	7
Abbildung 3: Wege der Gedächtnisbildung nach assoziativem Lernen. ....	9
Abbildung 4: Die Anatomie des Zentralkomplexes .....	10
Abbildung 5: <i>Drosophila</i> an Lücken .....	12
Abbildung 6: Geometrische Interferenz .....	14
Abbildung 7: Versuchsaufbau des visuellen Reizungsparadigmas.....	16
Abbildung 8: Kletter-Versuchsaufbau .....	17
Abbildung 9: Aufbau für motorisches Lernen an Lücken .....	18
Abbildung 10: Versuchsaufbau der Kletterschiene .....	19
Abbildung 11: CS-Männchen an unterschiedlichen Lückenbreiten.....	28
Abbildung 12: <i>ocelliless</i> <sup>1</sup> -Männchen an unterschiedlichen Lückenbreiten.....	29
Abbildung 13: Frontale Paraffinschnitte männlicher <i>oc</i> <sup>1</sup> - und WTB-Fliegen .....	30
Abbildung 14: <i>rutabaga</i> <sup>1</sup> -Männchen an unterschiedlichen Lückenbreiten .....	32
Abbildung 15: <i>dunce</i> <sup>1</sup> -Männchen an unterschiedlichen Lückenbreiten .....	33
Abbildung 16: Das Kletterverhalten dunkel aufgezogener CS-Männchen .....	35
Abbildung 17: Die Größeneinschätzung durch visuelle Trainingsmöglichkeiten.....	37
Abbildung 18: Die Störung und die Kompensation visueller Trainingsmöglichkeiten	39
Abbildung 19: Die Beständigkeit des Körpergrößengedächtnisses .....	41
Abbildung 20: Das Kletterverhalten weiblicher Fliegen zweier <i>rutabaga</i> -Allele .....	42
Abbildung 21: Die Rettung des <i>rutabaga</i> <sup>1</sup> -Hintergrunds.....	44
Abbildung 22: Die Rettung des <i>dunce</i> <sup>1</sup> -Hintergrunds. ....	45
Abbildung 23: Die Rettung von <i>rutabaga</i> <sup>1</sup> und <i>dunce</i> <sup>1</sup> .....	46
Abbildung 24: Gemeinsame Expression von 210Y und R55G08 .....	47
Abbildung 25: Gemeinsame Expression von 007Y und R73D06.....	48
Abbildung 26: Expressionsmuster von R65A06.....	49
Abbildung 27: Die Regulierung von <i>rutabaga</i> und <i>dunce</i> mittels RNAi.....	50
Abbildung 28: Die spatio-temporale Rettung von <i>rutabaga</i> <sup>1</sup> und <i>dunce</i> <sup>1</sup> .....	52
Abbildung 29: Die Regulierung verschiedener PKA-Untereinheiten .....	54
Abbildung 30: Die unterschiedliche Regulierung von CREB .....	56
Abbildung 31: Heterozygote und doppelt heterozygote cAMP-Zielgene.....	58
Abbildung 32: Die Verminderung der Expression verschiedener ACs .....	63
Abbildung 33: Die Verminderung der Expression verschiedener PDEs .....	66
Abbildung 34: Die Auswirkungen von <i>amn</i> <sup>1</sup> auf das Kletterverhalten .....	68
Abbildung 35: Kletterversuche von Lernmutationslinien .....	69
Abbildung 36: Das motorische Lernen wildtypischer Fliegen.....	71
Abbildung 37: Die Rettung des <i>rut</i> <sup>2080</sup> defizitären motorischen Lernens.....	74
Abbildung 38: Anpassungen zu einem motorischen Gedächtnis .....	76
Abbildung 39: Der Strategiewechsel nach einer Verletzung .....	77
Abbildung 40: Modell der am Körpergrößengedächtnis beteiligten Signalwege .....	88
Abbildung 41: Modell des Körperreichweitenlernens .....	90

## 7. Anhang

### 7.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse

#### 7.1.1 CS-Männchen an Lückenbreiten von 2,0- 6,0 mm

**Tabelle 5: Statistische Auswertung der Abbildung 11a.**

Die Fraktionen erfolgloser Versuche der CS-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen. Wenn eine der beiden Stichproben nicht parametrisch verteilt war, wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Vergleich der kleinen und großen Fliegen an unterschiedlichen Lückenbreiten					
Student'scher t-Test für unabhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Lückenbreite	N / n	t	F	p	Signifikanz
4,0 mm	15 / 10	2,070901	1,306122	0,047700	*
Mann-Whitney U-Test für unabhängige Gruppen der erfolglosen Versuche					
Gap size	N / n	U	Z	p	Signifikanz
2,0 mm	15 / 10	112,500000	0,000000	1,000000	n.s.
2,5 mm	15 / 10	105,000000	-0,311086	0,774840	n.s.
3,0 mm	15 / 10	36,500000	-3,152330	0,000997	***
3,5 mm	15 / 10	17,000000	-3,961160	0,000016	***
4,5 mm	15 / 10	54,000000	2,426467	0,014519	*
5,0 mm	15 / 10	95,000000	0,725866	0,486365	n.s.
5,5 mm	15 / 10	61,000000	2,136120	0,032944	*
6,0 mm	15 / 10	105,000000	-0,311086	0,774840	n.s.

#### 7.1.2 *ocelliless*<sup>1</sup>-Männchen an Lückenbreiten von 2,0- 6,0 mm

**Tabelle 6: Statistische Auswertung der Abbildung 12a.**

Die Fraktionen erfolgloser Versuche der *oc*<sup>1</sup>-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen. Wenn eine der beiden Stichproben nicht parametrisch verteilt war, wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Vergleich der kleinen und großen Fliegen an unterschiedlichen Lückenbreiten					
Student'scher t-Test für unabhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Lückenbreite	N / n	t	F	p	Signifikanz
2,5 mm	15 / 10	-1,012020	1,544615	0,320195	n.s.
3,5 mm	15 / 10	-1,601401	1,860963	0,120512	n.s.
4,5 mm	15 / 10	-2,060691	2,322835	0,048732	*
5,0 mm	15 / 10	0,102598	2,292079	0,919013	n.s.
5,5 mm	15 / 10	-0,893639	1,017045	0,379132	n.s.
6,0 mm	15 / 10	-2,436078	2,542857	0,021465	*

Mann-Whitney U-Test für unabhängige Gruppen der erfolglosen Versuche					
Lückenbreite	N / n	U	Z	p	Signifikanz
2,0 mm	15 / 10	102,5000	0,414781	0,682674	n.s.
3,0 mm	15 / 10	102,5000	0,414781	0,682674	n.s.
4,0 mm	15 / 10	111,5000	0,041478	0,967417	n.s.

### 7.1.3 *rutabaga*<sup>1</sup>-Männchen an Lückenbreiten von 2,0- 6,0 mm

**Tabelle 7: Statistische Auswertung der Abbildung 14a.**

Die Fraktionen erfolgloser Versuche der *rut*<sup>1</sup>-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen. Wenn eine der beiden Stichproben nicht parametrisch verteilt war, wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Vergleich der kleinen und großen Fliegen an unterschiedlichen Lückenbreiten					
Student'scher t-Test für unabhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Lückenbreite	N / n	t	F	p	Signifikanz
5,0 mm	15 / 10	0,812826	1,553785	0,423175	n.s.
5,5 mm	15 / 10	-2,038886	1,133508	0,051003	n.s.

Mann-Whitney U-Test für unabhängige Gruppen der erfolglosen Versuche					
Lückenbreite	N / n	U	Z	p	Signifikanz
2,0 mm	15 / 10	112,500000	0,000000	1,000000	n.s.
2,5 mm	15 / 10	99,000000	-0,559954	0,594884	n.s.
3,0 mm	15 / 10	34,500000	-3,235289	0,000696	***
3,5 mm	15 / 10	11,000000	-4,210024	0,000003	***
4,0 mm	15 / 10	90,000000	-0,933257	0,366875	n.s.
4,5 mm	15 / 10	106,500000	-0,248868	0,806334	n.s.
6,0 mm	15 / 10	111,000000	-0,062217	0,967417	n.s.



### 7.1.4 *dunce*<sup>1</sup>-Männchen an Lückenbreiten von 2,0- 6,0 mm

**Tabelle 8: Statistische Auswertung der Abbildung 15a.**

Die Fraktionen erfolgloser Versuche der *dnc*<sup>1</sup>-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen. Wenn eine der beiden Stichproben nicht parametrisch verteilt war, wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Vergleich der kleinen und großen Fliegen an unterschiedlichen Lückenbreiten					
Mann-Whitney U-Test für unabhängige Gruppen der erfolglosen Versuche					
Lückenbreite	N / n	U	Z	p	Signifikanz
2,0 mm	15 / 10	97,500000	-0,622171	0,539299	n.s.
2,5 mm	15 / 10	105,000000	-0,311086	0,774840	n.s.
3,0 mm	15 / 10	23,000000	-3,712287	0,000071	***
3,5 mm	15 / 10	0,000000	-4,666283	0,000000	***
4,0 mm	15 / 10	54,500000	2,405728	0,014519	*
4,5 mm	15 / 10	50,000000	2,592379	0,008642	**
5,0 mm	15 / 10	70,500000	1,742079	0,081429	n.s.
5,5 mm	15 / 10	110,500000	-0,082956	0,934887	n.s.
6,0 mm	15 / 10	65,500000	1,949469	0,050222	n.s.

### 7.1.5 Die erfolglosen Versuche dunkel aufgezogener CS-Fliegen

**Tabelle 9: Statistische Auswertung der Abbildung 16.**

Die Fraktionen der Kletterversuche von CS-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen. Wenn eine der beiden Stichproben nicht parametrisch verteilt war, wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Vergleich der dunkel aufgezogenen CS-Fliegen					
Student'scher t-Test für zwei abhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Variablen	N / n	t	p	Signifikanz	
24h dunkel @ 5,0 mm	30 / 10	3,869328	0,000570	***	
Student'scher t-Test für zwei unabhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Variablen	N / n	t	F	p	Signifikanz
24h dunkel & @ 3,5 mm	30 / 10	4,398401	1,143855	0,000047	***
@ 3,5 mm & @ 5,0 mm	30 / 10	-0,820757	1,221322	0,415146	n.s.

Mann-Whitney U-Test für unabhängige Gruppen der erfolglosen Versuche					
Gruppen	N / n	U	Z	p	Signifikanz
14h/10h & 24h dunkel	30 / 10	33,000000	-6,165105	0,000000	***
14h/10h & @ 5,0 mm	30 / 10	78,000000	-5,499806	0,000000	***
14h/10h & @ 3,5 mm	30 / 10	133,000000	-4,686663	0,000001	***
Student'scher t-Test für zwei unabhängige Stichproben der erfolgreichen Überquerungen					
Variablen	N / n	t	F	p	Signifikanz
14h/10h & 24h dunkel	15 / 10	0,609994	1,016750	0,546785	n.s.

### 7.1.6 Die Größeneinschätzung durch visuelle Erfahrungen

**Tabelle 10: Statistische Auswertung der Abbildung 17a.**

Die Fraktionen der Kletterversuche von isolierten CS-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Kruskal-Wallis post-hoc-Vergleich: $H(3, N=120) = 41,41480$ $p = 0,0000$					
		Zuchtglas	Streifen	Kontakt	Isolation
R		34,233	51,267	69,000	87,500
N / n					
30 / 10	Zuchtglas				
30 / 10	Streifen	0,347365			
		1,896499			
30 / 10	Kontakt	0,000651	0,289992		
		3,870936	1,974437		
30 / 10	Isolation	0,000000	0,000329	0,236507	
		5,930734	4,034235	2,059798	

**Tabelle 11: Statistische Auswertung der Abbildung 17b.**

Die Fraktionen der Kletterversuche von dunkel aufgezogenen CS-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen. N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Mann-Whitney U-Test für unabhängige Gruppen der erfolglosen Versuche					
Gruppen	N / n	U	Z	p	Signifikanz
Optimal & Null	15 / 10	13,000000	-4,127068	0,000005	***
Optimal & Rückwärts	15 / 10	12,000000	-4,168546	0,000004	***
Optimal & Keine	15 / 10	13,500000	-4,106329	0,000005	***
Null & Rückwärts	15 / 10	106,500000	0,248868	0,806334	n.s.
Null & Keine	15 / 10	98,500000	0,580693	0,566774	n.s.
Rückwärts & Keine	15 / 10	104,000000	0,352564	0,743702	n.s.

**Tabelle 12: Statistische Auswertung der****Abbildung 18a.**

Die Fraktionen der Kletterversuche von dunkel aufgezogenen CS-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapiro-Wilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Kruskal-Wallis post-hoc-Vergleich: $H(3, N=60) = 17,36697$ $p = 0,0006$					
		ohne	direkte	nach 2 h	direktes
		Störung	Kälte	Schütteln	
R		24,367	29,700	22,233	45,700
N / n					
15 / 10	ohne				
	Störung				
15 / 10	direkte	1,000000			
	Kälte	0,836333			
15 / 10	nach 2 h	1,000000	1,000000		
	Schütteln	0,334533	1,170867		
15 / 10	direktes	0,004931	0,072644	0,001400	
	Schütteln	3,345334	2,509000	3,679867	

**Tabelle 13: Statistische Auswertung der****Abbildung 18b.**

Die Fraktionen der Kletterversuche von dunkel aufgezogenen CS-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapiro-Wilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen. Die nicht parametrisch verteilte Stichprobe der umgelernten Fliegen wurde mit dem Wilcoxon-Test verglichen. N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Variablen	N / n	T	Z	p	Signifikanz
Kompensation & Umlernen	16 / 10	27,000000	0,941357	0,346522	n.s.
Student'scher t-Test für zwei unabhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Variablen	N / n	t	F	p	Signifikanz
Stationär & Kompensation	16 / 10	4,170039	1,090113	0,000239	***
Stationär & keine Stimulation	16 / 10	-3,411976	1,756048	0,001920	**

**Tabelle 14: Statistische Auswertung der Abbildung 19**

Die Fraktionen der erfolglosen Kletterversuche von CS-Männchen, die einer unterschiedlichen Dauer an Beleuchtungsbedingungen ausgesetzt waren, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapiro-Wilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe. Die altersunterschiedlichen Fliegen wurden alternierend an der 3,5 mm breiten Lücke beobachtet, weswegen der Mann-Whitney U-Test verwendet wurde.

Kruskal-Wallis post-hoc-Vergleich: $H(3, N=60) = 35,82068$ $p = 0,0000$					
		3d	3d	1d Licht	22
		Licht	dunkel	21d dunkel	dunkel
R		17,533	44,900	17,533	42,033
N / n					
15 / 10	3d				
	Licht				
15 / 10	3d	0,000107			
	dunkel	4,291436			
15 / 10	1d Licht	1,000000	0,000107		
	21d dunkel	0,000000	4,291436		
15 / 10	22	0,000732	1,000000	0,000732	
	dunkel	3,841907	0,449529	3,841907	

Mann-Whitney U-Test für unabhängige Gruppen der Überquerungen an 3,5 mm					
Gruppen	N / n	U	Z	p	Signifikanz
3d- & 22d dunkel	15 / 10	86,500000	1,078430	0,285441	n.s.

### 7.1.7 Die Auswirkungen zweier *rutabaga* Allele

**Tabelle 15: Statistische Auswertung der Abbildung 20.**

Die Fraktionen der Kletterversuche von weiblichen Fliegen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen. N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Student'scher t-Test unabhängiger Variablen erfolgloser Versuche an 4,5 mm					
Variablen	N / n	t	F	p	Signifikanz
<i>rut</i> <sup>1</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup>	10 / 10	2,612965	1,562249	0,017612	*
<i>rut</i> <sup>1</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	-0,703856	1,467925	0,490529	n.s.
<i>rut</i> <sup>2080</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	-2,117189	1,064257	0,048429	*
Mann-Whitney U-Test unabhängiger Gruppen erfolgloser Versuche an 5,0 mm					
Gruppen	N / n	U	Z	p	Signifikanz
CS & <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	7,000000	3,250494	0,000487	***
CS & <i>rut</i> <sup>2080</sup>	10 / 10	41,500000	-0,642540	0,528849	n.s.
CS & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	13,000000	2,796937	0,003886	**
Student'scher t-Test unabhängiger Variablen erfolgloser Versuche an 5,0 mm					
Variablen	N / n	t	F	p	Signifikanz
<i>rut</i> <sup>1</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup>	10 / 10	5,884340	2,038674	0,000014	***
<i>rut</i> <sup>1</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	-1,847929	1,647321	0,081113	n.s.
<i>rut</i> <sup>2080</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	-4,621207	1,237569	0,000212	***

Mann-Whitney U-Test unabhängiger Gruppen erfolgloser Versuche an 5,5 mm					
Gruppen	N / n	U	Z	p	Signifikanz
CS & <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	12,000000	2,872530	0,002879	**
CS & <i>rut</i> <sup>2080</sup>	10 / 10	46,000000	-0,302372	0,795936	n.s.
CS & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	25,500000	1,852026	0,063013	n.s.
<i>rut</i> <sup>1</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup>	10 / 10	15,000000	2,645751	0,006841	**
<i>rut</i> <sup>2080</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	26,000000	-1,81423	0,075256	n.s.
Student'scher t-Test unabhängiger Variablen erfolgloser Versuche an 5,5 mm					
Variablen	N / n	t	F	p	Signifikanz
<i>rut</i> <sup>1</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	-1,958260	1,804878	0,065882	n.s.
Mann-Whitney U-Test unabhängiger Gruppen erfolgloser Versuche an 6,0 mm					
Gruppen	N / n	U	Z	p	Signifikanz
CS & <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	5,500000	3,363884	0,000206	***
CS & <i>rut</i> <sup>2080</sup>	10 / 10	49,000000	0,075593	0,970512	n.s.
CS & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	35,000000	1,133893	0,279861	n.s.
<i>rut</i> <sup>1</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup>	10 / 10	8,000000	3,174902	0,000725	***
<i>rut</i> <sup>1</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	13,500000	2,759141	0,003886	**
<i>rut</i> <sup>2080</sup> & <i>rut</i> <sup>2080</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	10 / 10	37,000000	-0,982708	0,352681	n.s.

### 7.1.8 Die partielle Rettung des *rut*<sup>1</sup>-Hintergrunds

**Tabelle 16: Statistische Auswertung der Abbildung 21**

Die Fraktionen der Kletterversuche von Männchen, die *rutabaga*<sup>1</sup>-Rettungskonstrukte in ihrem Genom inseriert hatten, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Erfolglose Versuche an einer 5,0 mm breiten Lücke						
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: H ( 4, N= 75) = 51,39428 p = 0,0000						
		CS	210Y	217YY	007Y	NP2320
R		17,000	23,067	39,567	87,500	87,500
N / n						
15 / 10	CS					
15 / 10	210Y	1,000000				
		0,762314				
15 / 10	217YY	0,045734	0,381419			
		2,835641	2,073327			
15 / 10	007Y	0,012407	0,136232	1,000000		
		3,229364	2,467050	0,393723		
15 / 10	NP2320	0,000000	0,000000	0,004141	0,017056	
		6,366579	5,604265	3,530938	3,137216	

Erfolgreiche Überquerungen an einer 3,0 mm breiten Lücke						
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(4, N=75) = 9,351574$ $p = 0,0529$						
		CS	210Y	217YY	007Y	NP2320
R		45,133	39,500	39,567	46,800	29,567
N / n						
15 / 10	CS					
15 / 10	210Y	1,000000 0,707863				
15 / 10	217YY	0,426366 2,027253	1,000000 1,319390			
15 / 10	007Y	1,000000 0,209427	1,000000 0,917290	0,253073 2,236680		
15 / 10	NP2320	0,504595 1,956048	1,000000 1,248185	1,000000 0,071205	0,303514 2,165475	

### 7.1.9 Die partielle Rettung des *dnc*<sup>1</sup>-Hintergrunds

**Tabelle 17: Statistische Auswertung der Abbildung 22**

Die Fraktionen der Kletterversuche von Männchen, die *dunce*<sup>1</sup>-Rettungskonstrukte in ihrem Genom inseriert hatten, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapiro-Wilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Erfolgreiche Versuche an einer 5,0 mm breiten Lücke						
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(4, N=75) = 43,31445$ $p = 0,0000$						
		CS	210Y	217YY	007Y	NP2320
R		17,033	44,267	27,267	36,700	64,733
N / n						
15 / 10	CS					
15 / 10	210Y	0,006215 3,422036				
15 / 10	217YY	1,000000 1,285881	0,326668 2,136155			
15 / 10	007Y	0,134646 2,471238	1,000000 0,950798	1,000000 1,185357		
15 / 10	NP2320	0,000000 5,993799	0,101182 2,571763	0,000025 4,707918	0,004274 3,522561	

Erfolgreiche Überquerungen an einer 3,0 mm breiten Lücke						
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(4, N=75) = 10,46221$ $p = 0,0333$						
		CS	210Y	217YY	007Y	NP2320
R		53,600	32,367	32,667	37,167	34,200
N / n						
15 / 10	CS					
15 / 10	210Y	0,076282				
		2,668099				
15 / 10	217YY	0,085284	1,000000			
		2,630403	0,037697			
15 / 10	007Y	0,389278	1,000000	1,000000		
		2,064950	0,603150	0,565453		
15 / 10	NP2320	0,147798	1,000000	1,000000	1,000000	
		2,437730	0,230370	0,192673	0,372780	

### 7.1.10 Die Kartierung des Körpergrößenerlernens mittels distinkter Linien

**Tabelle 18: Statistische Auswertung der Abbildung 23a**

Die Fraktionen der Kletterversuche von Männchen, die *rut*<sup>1</sup>-Rettungskonstrukte in ihrem Genom inseriert hatten, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Erfolgreiche Versuche an einer 5,0 mm breiten Lücke					
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(3, N=60) = 38,50019$ $p = 0,0000$					
		CS	R55G08	R65A06	R73D06
R		10,800	39,233	25,000	46,967
N / n					
15 / 10	CS				
15 / 10	R55G08	0,155789			
		2,226738			
15 / 10	R65A06	0,000049	0,153704		
		4,458702	2,231965		
15 / 10	R73D06	0,000000	0,003431	1,000000	
		5,671386	3,444648	1,212683	

**Tabelle 19 Statistische Auswertung der Abbildung 23b**

Die Fraktionen der Kletterversuche von Männchen, die *dnc*<sup>1</sup>-Rettungskonstrukte in ihrem Genom inseriert hatten, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem

Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Erfolgreiche Versuche an einer 5,0 mm breiten Lücke					
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(3, N=60) = 35,04548$ $p = 0,0000$					
		CS	R55G08	R65A06	R73D06
R		15,300	28,167	51,233	27,300
N / n					
15 / 10	CS				
15 / 10	R55G08	0,000000			
		5,634796			
15 / 10	R65A06	0,261764	0,001787		
		2,017654	3,617142		
15 / 10	R73D06	0,359220	0,001048	1,000000	
		1,881750	3,753046	0,135904	

### 7.1.11 Die Regulierung des Körpergrößenslernens mittels RNAi

#### Tabelle 20: Statistische Auswertung der Abbildung 27

Die Fraktionen der Ketterversuche von Männchen, die *rutabaga* und *dunce*- RNAi- Konstrukte in ihrem Genom inseriert hatten, wurden mittels Kolmogorov- Smirnov-, Lillifors- und Shapiro-wilks W- Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

RNA-Interferenz von <i>rutabaga</i> an einer 5,0 mm breiten Lücke					
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(3, N=60) = 38,69570$ $p = 0,0000$					
		CS	210Y	217YY	007Y
R		12,167	47,700	39,033	23,100
N / n					
15 / 10	CS				
15 / 10	210Y	0,000151			
		4,213029			
15 / 10	217YY	0,000000	1,000000		
		5,572071	1,359042		
15 / 10	007Y	0,518640	0,074822	0,000687	
		1,714483	2,498546	3,857588	



RNA-Interferenz von <i>dunce</i> an einer 5,0 mm breiten Lücke					
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(3, N=60) = 37,82605$ $p = 0,0000$					
		CS	210Y	217YY	007Y
R		17,633	40,600	17,033	46,733
N / n					
15 / 10	CS				
15 / 10	210Y	1,000000			
		0,094088			
15 / 10	217YY	0,001899	0,001316		
		3,601461	3,695548		
15 / 10	007Y	0,000030	0,000019	1,000000	
		4,563244	4,657332	0,961783	

### 7.1.12 Die spatiotemporale Rettung des *rut<sup>1</sup>*-Hintergrunds

**Tabelle 21: Statistische Auswertung der Abbildung 28**

Die Fraktionen der Kletterversuche von induziert *rut<sup>1</sup>*-geretteten Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben der kletternden Fliegen wurden mit dem Wilcoxon-Test verglichen. N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Variablen	N / n	T	Z	p	Signifikanz
210Y 17°C & 31°C	15 / 10	3,000000	3,107436	0,001887	**
007Y 17°C & 31°C	15 / 10	15,500000	1,843492	0,065258	n.s.
210Y 25°C & 17°C / 8d	15 / 10	15,000000	0,888523	0,374260	n.s.
210Y 25°C & 17°C / 18d	15 / 10	20,500000	0,236940	0,812704	n.s.

### 7.1.13 Die Auswirkungen verschiedener PKA- Regulationen

**Tabelle 22: Statistische Auswertung der Abbildung 29**

Die Fraktionen der Kletterversuche von Männchen, die verschiedene PKA-Regulationen in ihrem Genom inseriert hatten, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(2, N=45) = 9,003175$ $p = 0,0111$				
		CS	210Y	007Y
R		16,233	23,133	29,633
N / n				
15 / 10	CS			
15 / 10	210Y	0,450665		
		1,438749		
15 / 10	007Y	0,015614	0,525924	
		2,794093	1,355344	
RNA Interferenz von PKA-C3 an einer 5,0 mm breiten Lücke				
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(2, N=45) = 27,89110$ $p = 0,0000$				
		CS	210Y	007Y
R		8,667	30,100	30,233
N / n				
15 / 10	CS			
15 / 10	210Y	0,000024		
		4,469159		
15 / 10	007Y	0,000021	1,000000	
		4,496961	0,027802	
RNA Interferenz von PKA-R1 an einer 5,0 mm breiten Lücke				
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(2, N=45) = 14,89538$ $p = 0,0006$				
		CS	210Y	007Y
R		19,200	17,400	32,400
N / n				
15 / 10	CS			
15 / 10	210Y	1,000000		
		0,375326		
15 / 10	007Y	0,017749	0,005285	
		2,752390	3,127716	
Überexpression von PKA-C1 an einer 5,0 mm breiten Lücke				
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(2, N=45) = 22,69029$ $p = 0,0000$				
		CS	210Y	007Y
R		13,133	20,967	34,900
N / n				
15 / 10	CS			
15 / 10	210Y	0,307178		
		1,633363		
15 / 10	007Y	0,000017	0,011007	
		4,538664	2,905301	

## 7.1.14 Die Regulierung von CREB

**Tabelle 23 Statistische Auswertung der Abbildung 30**

Die Fraktionen der Kletterversuche von Männchen, die verschiedene CREB-Regulationen in ihrem Genom inseriert hatten, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe. Die normal verteilten abhängigen Stichproben wurden mit dem t-Test verglichen. Die nicht parametrischen abhängigen Gruppen bekamen einen gepaarten Wilcoxon-Test.

Dominant Negativ von CREB an einer 5,0 mm breiten Lücke				
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(2, N=45) = 24,69258$ $p = 0,0000$				
		CS	210Y	007Y
R		16,233	23,133	29,633
N / n				
15 / 10	CS			
15 / 10	210Y	0,000005		
		4,802782		
15 / 10	007Y	0,138198	0,014955	
		1,994788	2,807994	

Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(3, N=80) = 33,22754$ $p = 0,0000$					
		optimal 17°C	optimal 30°C	no 17°C	no 30°C
R		15,125	48,800	45,600	52,475
N / n					
20 / 10	optimal 17°C				
20 / 10	optimal 30°C	0,000202			
		4,147122			
20 / 10	no 17°C	0,000028	1,000000		
		4,582587	0,435465		
20 / 10	no 30°C	0,000002	1,000000	1,000000	
		5,082691	0,935569	0,500104	

Student'scher t-Test für zwei abhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Variablen	N / n	t	p	Signifikanz	
210Y-GAL80ts 17°C & 30°C	15 / 10	0,108740	0,914952	n.s.	
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Variablen	N / n	T	Z	p	Signifikanz
007Y-GAL80ts 17°C & 30°C	15 / 10	0,000000	3,407771	0,000655	***

### 7.1.15 Die Interaktionen möglicher cAMP-Zielgene

**Tabelle 24: Statistische Auswertung der Abbildung 31**

Die Fraktionen der Kletterversuche von einfach oder doppelt heterozygoten Weibchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Erfolgreiche Versuche an einer 5,0 mm breiten Lücke				
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(2, N=45) = 9,493232$ $p = 0,0087$				
		<i>CrebB</i> <sup>S162</sup> /+	<i>PKAC1</i> <sup>H</sup> /+	<i>CrebB</i> <sup>S162</sup> / <i>PKAC1</i> <sup>H</sup>
R		16,167	23,533	29,300
N/n				
15 / 10	<i>CrebB</i> <sup>S162</sup> /+			
15 / 10	<i>PKAC1</i> <sup>H</sup> /+	0,373574 1,536056		
15 / 10	<i>CrebB</i> <sup>S162</sup> / <i>PKAC1</i> <sup>H</sup>	0,018517 2,738489	0,687587 1,202433	
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(2, N=45) = 26,77916$ $p = 0,0000$				
		<i>rut</i> <sup>1</sup> /+	<i>PKAC1</i> <sup>H</sup> /+	<i>rut</i> <sup>1</sup> / <i>PKAC1</i> <sup>H</sup>
R		24,000	10,233	34,767
N/n				
15 / 10	<i>rut</i> <sup>1</sup> /+			
15 / 10	<i>PKAC1</i> <sup>H</sup> /+	0,012293 2,870548		
15 / 10	<i>rut</i> <sup>1</sup> / <i>PKAC1</i> <sup>H</sup>	0,074303 2,245005	0,000001 5,115554	
Kruskal-Wallis post-hoc-Test: $H(2, N=45) = 25,63417$ $p = 0,0000$				
		<i>CrebB</i> <sup>S162</sup> /+	<i>rut</i> <sup>1</sup> /+	<i>CrebB</i> <sup>S162</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>
R		9,367	31,033	28,600
N/n				
15 / 10	<i>CrebB</i> <sup>S162</sup> /+			
15 / 10	<i>rut</i> <sup>1</sup> /+	0,000019 4,517812		
15 / 10	<i>CrebB</i> <sup>S162</sup> / <i>rut</i> <sup>1</sup>	0,000182 4,010427	1,000000 0,507385	

Kruskal-Wallis post-hoc-Test: H ( 2, N= 45) = 13,94242 p = 0,0009				
		<i>rut</i> <sup>1</sup> /+	<i>dnc</i> <sup>1</sup> /+	<i>rut</i> <sup>1</sup> / <i>dnc</i> <sup>1</sup>
R		15,733	20,400	32,867
N / n				
15 / 10	<i>rut</i> <sup>1</sup> /+			
15 / 10	<i>dnc</i> <sup>1</sup> /+	0,991560		
		0,973067		
15 / 10	<i>rut</i> <sup>1</sup> / <i>dnc</i> <sup>1</sup>	0,001061	0,028010	
		3,572547	2,599480	

### 7.1.16 Die Auswirkungen unterschiedlicher ACs

#### Tabelle 25: Statistische Auswertung der Abbildung 32

Die Fraktionen erfolgloser Ketterversuche von Männchen, die unterschiedliche *RNAi*s von Adenylzyklasen in ihrem Genom inseriert hatten, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapiro-Wilks W Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 25,96858 p = 0,0000					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / <i>rut</i> <sup>RNAi</sup>	007Y / <i>rut</i> <sup>RNAi</sup>
R		18,733	24,033	48,033	31,200
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,831106			
15 / 10	210Y / <i>rut</i> <sup>RNAi</sup>	0,000026	0,001005		
		4,594607	3,763500		
15 / 10	007Y / <i>rut</i> <sup>RNAi</sup>	0,303548	1,000000	0,049791	
		1,954929	1,123823	2,639677	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 19,07378 p = 0,0003					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / ACACC <sup>RNAi</sup>	007Y / ACACC <sup>RNAi</sup>
R		18,353	23,967	39,833	39,667
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,852015			
15 / 10	210Y / ACACC <sup>RNAi</sup>	0,005519	0,082909		
		3,313971	2,461956		
15 / 10	007Y / ACACC <sup>RNAi</sup>	0,005025	0,077058	1,000000	
		3,340107	2,488092	0,026135	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 28,18700 p = 0,0000					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / AC78C <sup>RNAi</sup>	007Y / AC78C <sup>RNAi</sup>
R		18,033	22,433	33,500	48,033
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,689975			
15 / 10	210Y / AC78C <sup>RNAi</sup>	0,091758	0,496029		
		2,425367	1,735392		
15 / 10	007Y / AC78C <sup>RNAi</sup>	0,000015	0,000358	0,135999	
		4,704375	4,014400	2,279009	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 2,701147 p = 0,4400					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / AC76E <sup>RNAi</sup>	007Y / AC76E <sup>RNAi</sup>
R		26,800	31,267	28,500	35,433
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,700429			
15 / 10	210Y / AC76E <sup>RNAi</sup>	1,000000	1,000000		
		0,266581	0,433848		
15 / 10	007Y / AC76E <sup>RNAi</sup>	1,000000	1,000000	1,000000	
		1,353815	0,653385	1,087233	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 29,88505 p = 0,0000					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / AC39E <sup>RNAi</sup>	007Y / AC39E <sup>RNAi</sup>
R		21,600	25,833	24,100	50,467
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,663840			
15 / 10	210Y / AC39E <sup>RNAi</sup>	1,000000	1,000000		
		0,392031	0,271808		
15 / 10	007Y / AC39E <sup>RNAi</sup>	0,000036	0,000673	0,000213	
		4,526655	3,862815	4,134623	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 18,09729 p = 0,0004					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / CG32305 <sup>RNAi</sup>	007Y / CG32305 <sup>RNAi</sup>
R		20,033	25,167	32,367	44,433
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,804971			
15 / 10	210Y / CG32305 <sup>RNAi</sup>	0,318663	1,000000		
		1,934021	1,129050		
15 / 10	007Y / CG32305 <sup>RNAi</sup>	0,000781	0,015104	0,350783	
		3,826225	3,021254	1,892204	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 21,41723 p = 0,0001					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / AC35C <sup>RNAi</sup>	007Y / AC35C <sup>RNAi</sup>
R		19,867	24,667	31,133	46,333
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,752700			
15 / 10	210Y / AC35C <sup>RNAi</sup>	0,463616	1,000000		
		1,766754	1,014054		
15 / 10	007Y / AC35C <sup>RNAi</sup>	0,000199	0,004079	0,102879	
		4,150304	3,397604	2,383550	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 41,95453 p = 0,0000					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / ACXD <sup>RNAi</sup>	007Y / ACXD <sup>RNAi</sup>
R		14,967	18,767	49,933	38,333
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,595888			
15 / 10	210Y / ACXD <sup>RNAi</sup>	0,000000	0,000006		
		5,483211	4,887323		
15 / 10	007Y / ACXD <sup>RNAi</sup>	0,001489	0,012917	0,413446	
		3,664186	3,068298	1,819025	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 14,61382 p = 0,0022					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / ACXA <sup>RNAi</sup>	007Y / ACXA <sup>RNAi</sup>
R		20,567	25,133	41,500	34,800
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,716110			
15 / 10	210Y / ACXA <sup>RNAi</sup>	0,006171	0,061639		
		3,282609	2,566498		
15 / 10	007Y / ACXA <sup>RNAi</sup>	0,153704	0,777337	1,000000	
		2,231965	1,515854	1,050644	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 25,17260 p = 0,0000					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / ACXB <sup>RNAi</sup>	007Y / ACXB <sup>RNAi</sup>
R		18,667	24,1	31,700	47,533
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,852015			
15 / 10	210Y / ACXB <sup>RNAi</sup>	0,245846	1,000000		
		2,043790	1,191775		
15 / 10	007Y / ACXB <sup>RNAi</sup>	0,000036	0,001429	0,078198	
		4,526655	3,674640	2,482865	

### 7.1.17 Die Auswirkungen unterschiedlicher PDEs

#### Tabelle 26: Statistische Auswertung der Abbildung 33

Die Fraktionen erfolgloser Kletterversuche von Männchen, die unterschiedliche *RNAis* von Phosphodiesterasen in ihrem Genom inseriert hatten, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test der mittleren Ränge aller Gruppen post-hoc verglichen. Multiple Vergleichs p-Werte in der oberen Reihe; z-Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.



Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 31,33914 p = 0,0000					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / <i>dnc</i> <sup>RNAi</sup>	007Y / <i>dnc</i> <sup>RNAi</sup>
R		23,333	27,333	21,000	50,333
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,627250			
15 / 10	210Y / <i>dnc</i> <sup>RNAi</sup>	1,000000	1,000000		
		0,365896	0,993146		
15 / 10	007Y / <i>dnc</i> <sup>RNAi</sup>	0,000138	0,001861	0,000025	
		4,233938	3,606688	4,599834	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 3,632572 p = 0,3040					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / PDE1c <sup>RNAi</sup>	007Y / PDE1c <sup>RNAi</sup>
R		24,933	29,233	32,333	35,500
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,674294			
15 / 10	210Y / PDE1c <sup>RNAi</sup>	1,000000	1,000000		
		1,160413	0,486119		
15 / 10	007Y / PDE1c <sup>RNAi</sup>	0,585134	1,000000	1,000000	
		1,656986	0,982692	0,496573	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 19,27837 p = 0,0002					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / PDE6 <sup>RNAi</sup>	007Y / PDE6 <sup>RNAi</sup>
R		20,633	25,500	30,167	45,700
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,763154			
15 / 10	210Y / PDE6 <sup>RNAi</sup>	0,809571	1,000000		
		1,494946	0,731792		
15 / 10	007Y / PDE6 <sup>RNAi</sup>	0,000508	0,009222	0,089148	
		3,930767	3,167613	2,435821	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 26,79551 p = 0,0000					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / PDE8 <sup>RNAi</sup>	007Y / PDE8 <sup>RNAi</sup>
R		21,100	25,300	49,367	26,233
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,658613			
15 / 10	210Y / PDE8 <sup>RNAi</sup>	0,000056	0,000964		
		4,432567	3,773954		
15 / 10	007Y / PDE8 <sup>RNAi</sup>	1,000000	1,000000	0,001716	
		0,804971	0,146358	3,627596	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 41,56119 p = 0,0000					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / PDE9 <sup>RNAi</sup>	007Y / PDE9 <sup>RNAi</sup>
R		16,033	19,533	52,000	34,433
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,548844			
15 / 10	210Y / PDE9 <sup>RNAi</sup>	0,000000	0,000002		
		5,640023	5,091180		
15 / 10	007Y / PDE9 <sup>RNAi</sup>	0,023459	0,116789	0,035250	
		2,885350	2,336506	2,754673	

Kruskal-Wallis pos-hoc-Test: H ( 3, N= 60) = 42,75751 p = 0,0000					
		210Y / GFP	007Y / GFP	210Y / PDE11 <sup>RNAi</sup>	007Y / PDE11 <sup>RNAi</sup>
R		14,700	17,500	44,433	45,367
N / n					
15 / 10	210Y / GFP				
15 / 10	007Y / GFP	1,000000			
		0,439075			
15 / 10	210Y / PDE11 <sup>RNAi</sup>	0,000019	0,000144		
		4,662559	4,223484		
15 / 10	007Y / PDE11 <sup>RNAi</sup>	0,000009	0,000075	1,000000	
		4,808917	4,369842	0,146358	

### 7.1.18 Die Rolle von *amnesiac* beim Körpergrößelernen

**Tabelle 27: Statistische Auswertung der Abbildung 34**

Die erfolglosen Versuche der wildtypischen Männchen bzw. der *amn*<sup>1</sup>-Fliegen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die

nicht parametrischen unabhängigen Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen

Vergleich der unter Beleuchtung aufgezogenen <i>amnesiac</i> <sup>1</sup> - Männchen mit den CS- Fliegen					
Mann-Whitney U- Test für unabhängige Gruppen der erfolglosen Versuche					
Variablen	N / n	U	Z	p	Signifikanz
CS standard & 1 d dunkel	15 / 10	68,500000	-1,804296	0,067496	n.s.
<i>amn</i> <sup>1</sup> standard & 1 d dunkel	15 / 10	22,000000	-3,733026	0,000056	***
CS standard & <i>amn</i> <sup>1</sup> standard	15 / 10	14,000000	-4,064851	0,000007	***
Vergleich der in Dunkelheit aufgezogenen <i>amnesiac</i> <sup>1</sup> - Männchen mit den CS- Fliegen					
CS t. & CS n.t.	15 / 10	46,500000	-2,737552	0,004940	**
<i>amn</i> <sup>1</sup> t. & <i>amn</i> <sup>1</sup> n.t.	15 / 10	66,500000	-1,907991	0,055530	n.s.

### 7.1.19 Die Kandidaten weiterer Signalwege

**Tabelle 28: Statistische Auswertung der Abbildung 35**

Die Fraktionen erfolgloser Kletterversuche der Männchen mit unterschiedlichen Lernmutationen, wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Kruskal- Wallis-Test der Ränge verglichen. Multiple Vergleichs p- Werte in der oberen Reihe; z- Werte in der unteren Reihe; N: Anzahl der Fliegen; n: Anzahl der Anläufe.

Kruskal-Wallis post-hoc-Test: H ( 5, N= 90) = 63,29672 p = 0,0000							
		CS	<i>for</i> <sup>R</sup>	<i>for</i> <sup>S</sup>	<i>ign</i> <sup>58/1</sup>	<i>leo</i> <sup>P1357</sup> <i>lleo</i> <sup>2.3</sup>	<i>homer</i> <sup>R102</sup>
R		29,500	42,067	24,333	27,967	74,967	74,167
N / n							
15 / 10	CS						
15 / 10	<i>for</i> <sup>R</sup>	1,000000 1,317345					
15 / 10	<i>for</i> <sup>S</sup>	1,000000 0,541614	0,945495 1,858958				
15 / 10	<i>ign</i> <sup>58/1</sup>	1,000000 0,160737	1,000000 1,478082	1,000000 0,380877			
15 / 10	<i>leo</i> <sup>P1357</sup> <i>lleo</i> <sup>2.3</sup>	0,000028 4,766202	0,008444 3,448857	0,000002 5,307816	0,000013 4,926939		
15 / 10	<i>homer</i> <sup>R102</sup>	0,000043 4,682339	0,011482 3,364994	0,000003 5,223953	0,000019 4,843076	1,000000 0,083863	

## 7.1.20 Das wildtypische motorische Lernen

**Tabelle 29: Statistische Auswertung der Abbildung 36**

Die Überquerungsraten in den Testläufen der wildtypischen Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W-Test auf Normalverteilung getestet. Die normal verteilten abhängigen Stichproben wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen.

Trainingserfolg männlicher CS-Fliegen				
Student'scher t-Test abhängiger Stichproben der Überquerungsrate				
Variablen	N	t	p	Signifikanz
naiv & STM	30	-3,625721	0,001094	**
naiv & LTM	30	-3,733836	0,000820	***
STM & LTM	30	-1,516082	0,140324	n.s.

Trainingserfolg männlicher WTB-Fliegen				
Student'scher t-Test abhängiger Stichproben der Überquerungsrate				
Variablen	N	t	p	Signifikanz
naiv & STM	30	-2,188063	0,036870	*
naiv & LTM	30	-4,868159	0,000037	***
STM & LTM	30	-3,041070	0,004962	**

## 7.1.21 Die Rettung des *rut*<sup>2080</sup>-Defizits im motorischen Lernen

**Tabelle 30: Statistische Auswertung der Abbildung 37**

Die Überquerungsraten in den Testläufen der *rut*<sup>2080</sup>-partiellen Rettungen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapirowilks W Test auf Normalverteilung getestet. Die normal verteilten abhängigen Stichproben wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen. Die nicht parametrisch verteilten Stichproben wurden mit dem Wilcoxon-Test überprüft.

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /+;007Y-GAL4/+-Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	55,000000	3,513770	0,000442	***
naiv & LTM	30	34,500000	3,581115	0,000342	***

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /+;R73D06-GAL4/+-Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	3,500000	4,456637	0,000008	***
naiv & LTM	30	99,000000	2,745873	0,006035	**

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /+;mb247-GAL4/+-Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	26,500000	4,237078	0,000023	***
naiv & LTM	30	59,000000	3,427277	0,000610	***

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /+;;OK107-GAL4/+ -Männchen					
Student'scher t-Test abhängiger Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	t	p	Signifikanz	
naiv & STM	30	-4,1125500	0,000294	***	
naiv & LTM	30	1,3368594	0,191662	n.s.	

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /+;210Y-GAL4/+ -Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	103,500000	2,265757	0,023467	*
naiv & LTM	30	125,000000	1,776171	0,075706	n.s.

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /+;R55G08-GAL4/+ -Männchen					
Student'scher t-Test abhängiger Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	t	p	Signifikanz	
naiv & STM	30	-3,390150	0,002032	**	
naiv & LTM	30	-0,679186	0,502405	n.s.	

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /+;R65A06-GAL4/+ -Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	38,000000	3,757285	0,000172	***
naiv & LTM	30	142,000000	1,632552	0,102564	n.s.

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /201Y-GAL4;+/+ -Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	30,500000	3,928071	0,000086	***
naiv & LTM	30	92,500000	2,318412	0,020428	*

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /+;H24-GAL4/+ -Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	97,500000	2,198287	0,027929	*
Student'scher t-Test abhängiger Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	t	p	Signifikanz	
naiv & LTM	30	-0,7664180	0,449622	n.s.	

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /c305a-GAL4;+/+ -Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	132,000000	1,616771	0,105929	n.s.
naiv & LTM	30	97,000000	2,605596	0,009172	**

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /c739-GAL4;+/+ -Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	103,500000	1,587508	0,112399	n.s.
naiv & LTM	30	130,500000	0,557143	0,577430	n.s.

Trainingserfolg der <i>rut</i> <sup>2080</sup> /Y;UAS- <i>rut</i> <sup>+</sup> /c309-GAL4;+/-Männchen					
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der Überquerungsrate					
Variablen	N	T	Z	p	Signifikanz
naiv & STM	30	117,000000	1,729800	0,083667	n.s.
naiv & LTM	30	152,000000	0,888925	0,374044	n.s.

### 7.1.22 Detaillierten Anpassungen beim motorischen Lernen

**Tabelle 31: Statistische Auswertung der Abbildung 38**

Die vermessenen Parameter aus den Hochgeschwindigkeitssequenzen wildtypischer CS-Fliegen auf einer Kletterschiene wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapiro-Wilk's W-Test auf Normalverteilung getestet. Die normal verteilten abhängigen Stichproben wurden mit dem gepaarten Student'schen t-Test verglichen.

Trainingserfolg der CS-Männchen auf einer Kletterschiene				
Student'scher t-Test abhängiger Stichproben des Winkels der Körperposition				
Variablen	N	t	p	Signifikanz
naiv & STM	60	-3,853878	0,000289	***
naiv & LTM	60	-3,234317	0,001999	**
Student'scher t-Test abhängiger Stichproben der Abdomendistanz				
Variablen	N	t	p	Signifikanz
naiv & STM	60	3,148819	0,002572	**
naiv & LTM	60	3,270297	0,001796	**
Student'scher t-Test abhängiger Stichproben des Beinabstands				
Variablen	N	t	p	Signifikanz
naiv & STM	60	3,413806	0,001164	**
naiv & LTM	60	3,336419	0,001473	**

### 7.1.23 Der Strategiewechsel nach Verletzungen

**Tabelle 32: Statistische Auswertung der Abbildung 39**

Die Fraktionen der Überquerungen von intakten und verletzten CS-Männchen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-, Lillifors- und Shapiro-Wilk's W-Test auf Normalverteilung getestet. Die normal verteilten abhängigen Stichproben wurden mit dem Student'schen t-Test verglichen. Die nicht parametrisch verteilten gepaarten Stichproben wurden mit dem Wilcoxon-Test überprüft. Die nicht normal verteilten unabhängigen Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen.

Student'scher t-Test für gepaarte Stichproben der Überquerungen					
Variablen	N / n	t	p	Signifikanz	
intakt Tag1 & intakt Tag2	30 / 10	-0,563282	0,577573	n.s.	
Gepaarter Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben der erfolglosen Versuche					
Variablen	N / n	T	Z	p	Signifikanz
verletzt Tag1 & verletzt Tag2	30 / 10	12,000000	3,717317	0,000201	***
Mann-Whitney U-Test für unabhängige Gruppen der Überquerungen an 3,5 mm					
Gruppen	N / n	U	Z	p	Signifikanz
intakt Tag2 & verletzt Tag2	30 / 10	393,00000	0,835320	0,406289	n.s.

## **8. Danksagung**

## **9. Lebenslauf**