



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**Analyse der idiothetischen Orientierung bei
Drosophila melanogaster mittels
Verhaltensanalyse und
molekulargenetischer Methoden**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

**Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

Eingereicht von Ann-Kathrin Mendel

*05.10.1984 in Hofgeismar

Mainz, 28.11.2019

*„Wissenschaft ist der Treueschwur
auf die Wahrscheinlichkeit“*

Walter Fürst (1932-2019), Schweizer Aphoristiker

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Die richtige Richtung..... | 2 |
| 1.2 Anatomie des Gehirns von <i>Drosophila melanogaster</i> | 3 |
| 1.3 Das visuelle Ortsgedächtnis und die Bedeutung der kolumnären Neurone für die Kursteuerung | 4 |
| 1.3.1 Persistente Aktivität | 4 |
| 1.3.2 Modifizierung des Kurssignals..... | 7 |
| 1.3.3 Die Pfadintegration | 9 |
| 1.4 Lernen und Gedächtnis | 11 |
| 1.5 Neue Aufgaben für Cryptochrom | 13 |
| 1.6 Die Idee der Magnetfeldorientierung bei <i>Drosophila</i> | 15 |
| 1.7. Das GAL4/UAS-System..... | 16 |
| 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit..... | 18 |
| 2. Material und Methoden | 19 |
| 2.1 Aufzucht und Haltung der Fliegenstämme | 19 |
| 2.2 Verkreuzen der Fliegenstämme | 19 |
| 2.3 Liste der in der Arbeit verwendete Fliegenstämme..... | 19 |
| 2.4 Versuchsdurchführung..... | 22 |
| 2.4.1 Simulation des Experiments von Gegear, jedoch ohne künstliches Magnetfeld | 23 |
| 2.4.2 <i>Buridan</i> Paradigma..... | 25 |
| 2.4.3 <i>Persistenz</i> Paradigma | 26 |
| 2.4.4. <i>Detour</i> Paradigma | 27 |
| 2.4.5 <i>IODA</i> | 29 |
| 2.5 Histologie..... | 31 |
| 2.6 Statistik | 34 |
| 3. Ergebnisse | 35 |
| 3.1 Gibt es eine Magnetfeldorientierung bei <i>Drosophila</i> ? | 35 |
| 3.2 Idiothetische Orientierung beim Wildtyp <i>Canton Spezial</i> | 38 |
| 3.3 Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> bei klassischen Lernmutanten, blinden Fliegen und Mutanten der inneren Uhr..... | 41 |
| 3.4 Idiothetische Orientierung nach Stilllegung der chemisch-synaptischen Transmission einzelner Ringneuronsysteme..... | 47 |
| 3.4.1 Silencing von R1 | 47 |
| 3.4.1.1 Silencing von R1 plus | 48 |
| 3.4.2 Silencing von R2 | 48 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.2.1 Silencing von R2 plus/minus..... | 48 |
| 3.4.3 Silencing von R3d&p | 49 |
| 3.4.4 Silencing von R4 minus | 49 |
| 3.4.4.1 Silencing von R4m und R4d | 50 |
| 3.5 Knock-Down und Rettungsexperimente von <i>dunce (dnc)</i> oder <i>rutabaga (rut)</i> im Ellipsoidkörper bei der idiothetischen Orientierung | 52 |
| 3.5.1 <i>dnc</i> in den Ringsystemen des Ellipsoidkörpers..... | 53 |
| 3.5.1.1 <i>dnc</i> im Ringsystem R1 | 54 |
| 3.5.1.2 <i>dnc</i> im Ringsystem R1 plus..... | 56 |
| 3.5.1.3 <i>dnc</i> im Ringsystem R2 | 58 |
| 3.5.1.4 <i>dnc</i> im Ringsystem R2 plus..... | 58 |
| 3.5.1.5 <i>dnc</i> im Ringsystem R3m und R3dp..... | 60 |
| 3.5.1.6 <i>dnc</i> im Ringsystem R3 plus/minus..... | 61 |
| 3.5.1.7 <i>dnc</i> im Ringsystem R4 minus..... | 63 |
| 3.5.2 <i>rut</i> in den Ringsystemen des Ellipsoidkörpers | 66 |
| 3.5.2.1 <i>rut</i> im Ringsystem R1 | 67 |
| 3.5.2.2 <i>rut</i> im Ringsystem R1 plus..... | 69 |
| 3.5.2.3 <i>rut</i> im Ringsystem R2 | 71 |
| 3.5.2.4 <i>rut</i> im Ringsystem R2 plus/minus | 72 |
| 3.5.2.5 <i>rut</i> im Ringsystem R3m und R3dp..... | 75 |
| 3.5.2.6 <i>rut</i> im Ringsystem R3 plus/minus..... | 76 |
| 3.5.2.7 <i>rut</i> im Ringsystem R4 minus..... | 78 |
| 3.6 Die Rolle von <i>cry</i> im Ellipsoidkörper bei der idiothetischen Orientierung..... | 81 |
| 3.7 Die Rolle der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU auf verschiedene Formen der Orientierung, sowie der Orientierungsgedächtnisse..... | 87 |
| 3.7.1 Visuelle Orientierung im <i>Buridan-</i> Paradigma bei Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und der AOTU..... | 88 |
| 3.7.2 Nachfixation von Landmarken im <i>Persistenz-</i> Paradigma bei Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und der AOTU | 90 |
| 3.7.3 Auswirkungen auf das visuelle Orientierungsgedächtnis im <i>Detour-</i> Paradigma bei Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und/oder der AOTU | 92 |
| 3.7.4 Auswirkungen auf das idiothetische Orientierungsgedächtnis im <i>IODA</i> , bei Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und/oder der AOTU | 94 |
| 3.8 Histologie..... | 100 |
| 3.8.1 Expressionsmuster Ringneuronen-spezifischer Treiber..... | 100 |
| 3.8.1.1. Ringsystem R1 | 100 |
| 3.8.1.2. Ringsystem R2 | 102 |

| | |
|---|-----|
| 3.8.1.3. Ringsystem R3 | 105 |
| 3.8.1.4. Ringsystem R4 | 109 |
| 3.8.1.5. E-PG Neurone | 112 |
| 3.8.1.6. P-EN Neurone | 117 |
| 3.8.1.7. Anteriore optische Tuberkel..... | 121 |
| 3.8.1.8. Doppelfärbungen zur Überprüfung gemeinsamer Expressionsbereiche zweier Treiber | 122 |
| 4. Diskussion | 129 |
| 4.1 Die idiothetische Orientierung in wildtypischen Fliegen | 131 |
| 4.2 Untersuchung ausgewählter Proteine als mögliche Kandidaten für die Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses | 132 |
| 4.3 Der Einfluss des Ellipsoidkörpers auf die idiothetische Orientierung..... | 136 |
| 4.4 Die Notwendigkeit der <i>dnc</i> -PDE und <i>rut</i> -AC in den Ringsystemen des Ellipsoidkörpers | 138 |
| 4.5 Cryptochrom ist in einem Subsystem des Ellipsoidkörpers für das idiothetische Orientierungsgedächtnis notwendig | 141 |
| 4.6 Die Bedeutung kolumnärer Neurone für die visuelle und idiothetische Orientierung . | 144 |
| 5. Zusammenfassung | 147 |
| 6. Summary | 148 |
| 7. Verzeichnisse | 149 |
| 7.1 Literaturverzeichnis | 149 |
| 7.2 Abbildungsverzeichnis | 160 |
| 7.3 Tabellenverzeichnis | 163 |
| 7.4 Anhang..... | 164 |
| 7.4.1 Messung der Strahlstärke der verwendeten Rotlichtlampe | 164 |
| 7.4.2 Durchführung der Rekombination von VT025526-GAL4 und <i>cry</i> ⁰¹ | 164 |
| 7.4.3 Rückkreuzung von R54B05-GAL4 | 165 |
| 7.4.4 Schema Durchführung Magnetfeldvibration nach Mendel (nächste Seite) | 165 |
| 7.4.5 Genehmigung zur Verwendung Abbildung Kristallstruktur von Cryprochrom ... | 167 |
| 7.4.6 Rohdaten..... | 167 |
| 7.4.7 Lebenslauf | 168 |

1 Einleitung

Die Fähigkeit der Orientierung ist eine der basalen Eigenschaften von Lebewesen. Dabei entwickelten sich im Laufe der Evolution verschiedene Orientierungsstrategien, z.B. die Orientierung nach chemischen Gradienten, die Geotaxis, Echoortung, oder die visuelle Orientierung. Taxis beschreibt hierbei die zielgerichtete Bewegung eines Individuums (Müller et al. 2015). Selbst niedere Lebensformen, wie der eukaryotische Einzeller *Euglena*, sind in der Lage, sich mit Hilfe eines photosensitiven Pigmentflecks nach der Richtung des Lichteinfalls zu orientieren (Daiker et al. 2011). Darüber hinaus besitzen einige Tiere, wie z.B. manche Vogelspezies (*Erithacus rubecula* oder *Columba livia*) oder auch Fische (*Onorhynchus mykiss*) die Fähigkeit, sich nach magnetischen Feldern zu orientieren (Wiltschko 1972; Wiltschko und Wiltschko 2006; Walker et al. 1997; Lendor und Walcott 1983). Auch bei dem Monarchfalter *Danaus plexippus* und der Taufliege *Drosophila melanogaster*, wird eine solche Fähigkeit zur Magnetotaxis postuliert. Dabei soll das Protein *Cryptochrom*, aus der Familie der Photolyasen, eine entscheidende Rolle bei der Detektion von magnetischen Feldern spielen (Gegear et al. 2008; Gegear et al. 2010; Yoshii et al. 2009).

Eine weitere, bemerkenswerte Orientierungsform ist die *idiothetische Orientierung*. Diese Orientierungsform benötigt keine äußeren Stimuli. Bei der Wüstenameise *Cataglyphis* konnten Hartmann und Werner schon vor mehr als zwei Jahrzehnten zeigen, dass dieses besondere Tier die Fähigkeit zur idiothetischen Orientierung mittels Pfadintegration besitzt. Auf ihren Wanderungen während der Futtersuche, führt die Ameise ausschweifende Erkundungsgänge durch, nutzt anschließend zur Rückkehr zum Nest aber den direkten Weg. Das kann sie leisten, indem sie die Richtungsvektoren während der Erkundungsgänge kontinuierlich miteinander verrechnet und den resultierenden Vektor zur Heimkehr nutzt. (Hartmann und Wehner 1995). In der Hummel *Bombus impatiens* konnte ebenfalls eine nicht-visuelle Orientierung nachgewiesen werden. Die Tiere wurden darauf trainiert, dass sich eine Futterquelle in einem bestimmten Winkel zum Nest befindet. Auch in völliger Dunkelheit konnten die trainierten Hummeln den Futterplatz auf Anhieb anfliegen (Chittka et al. 1999). Neben der Hummel, ist dieser idiothetische Orientierungssinn auch bei der Honigbiene *Apis mellifera* nachgewiesen worden (Chittka et al. 1995). Auch höhere Tiere besitzen diese Orientierungsfähigkeit. Ein Neuronentyp im Hippocampus des Gehirns der Ratte, zeigt eine besonders hohe Aktivität, sobald das Tier die Position seines Kopfes ändert. Diese sogenannten *head-direction cells* sind Teil eines umfangreichen neuronalen Netzwerkes, welches aus *place cells* (ortsspezifischen Zellen), *grid cells* (Rasterzellen) und *speed cells* (Geschwindigkeitszellen) besteht (Rank 1984; Taube et al. 1990; O'Keefe 1976; O'Keefe J. und Nadel 1978; Hafting et al. 2005; Kropff et al. 2015; Solstad et al. 2008; Moser et al. 2014). Mit Hilfe dieser drei Komponenten können permanent die Ortskoordinaten berechnet werden und somit kann eine Orientierung im Raum gewährleistet werden.

Bei *Drosophila melanogaster* konnte ebenfalls diese besondere Orientierungsfähigkeit nachgewiesen werden. Erste Versuche hierzu führten Putz und Heisenberg im *Heat-Box* Paradigma durch. Hierbei befand sich eine einzelne Fliege in einer kleinen, länglichen Box, die mit Hilfe eines sich am Boden befindlichen Peltierelements erhitzt werden konnte. Während des Versuchs lernte die Fliege, dass das Betreten einer Hälfte der Box einen unangenehmen Hitzereiz zur Folge hat und sie vermied daraufhin jene Seite, selbst wenn anschließend keine Hitzebestrafung mehr stattfand (Putz und Heisenberg 2002; Putz et al. 2004). Seelig und Jayaraman konnten überdies 2015 mittels Kalziumimaging mit Kalzium-sensitiven Fluoreszenz-Proteinen zeigen, dass der *Ellipsoidkörper* (eine torusförmige Struktur im

Zentralkomplex des Gehirns von *Drosophila* (siehe Abbildung 1, EK, violett) Positionen von Landmarken codieren kann. Ein Objekt, in einer bestimmten Position im visuellen Feld der Fliege, erzeugt einen Aktivitätsanstieg in einem definierten Bereich des EK. Der Kalziumeinstrom in diesen Zellen bewirkt ein Fluoreszenz-Signal des Kalziumsensorproteins in selbigem Bereich („activity-bump“, Aktivitätshügel) (Chen et al. 2013). Verändert die Fliege nun ihre Position relativ zum Objekt, rotiert dieser „Aktivitätshügel“ entlang des EK. Sogar nach Verschwinden des Objekts, oder in Dunkelheit, kann der „Aktivitätshügel“ mind. 40 Sekunden detektiert werden und sogar ebenfalls seine Position auf dem EK ändern, sobald die Fliege eine Drehung vornimmt (Seelig und Jayaraman 2015, 2013).

Basierend auf dem Prinzip der *Heat-Box* wurde für die vorliegende Arbeit das *IODA* (**I**diothetic **O**rientation in the **D**ark **A**ssay) entwickelt. In einem kleinen Plastikröhrchen wird der Aufenthalt in einer der Seiten mittels Vibration bestraft; die Fliegen vermeiden daraufhin die bestrafte Seite. Die Versuchsdurchführung findet unter Rotlichtbedingungen statt; Licht dieser Qualität ist für *Drosophila* nicht sichtbar (Osorio und Vorobyev 2008); somit kann eine visuelle Orientierung ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit werden mit Hilfe des *IODA* die in die Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses involvierten Proteine und deren Wirkungsort im EK der Fliege untersucht. Darüber hinaus werden, unter Miteinbeziehung weiterer Versuchsaufbauten wie des *Buridan Paradigmas*, des *Persistenz-Paradigmas* und des *Detour-Paradigmas*, die Bedeutung von kolumnären Neuronen in der visuellen und idiothetischen Orientierung untersucht. Durch moderne genetische Manipulationsmöglichkeiten bietet *Drosophila* ein exzellentes Untersuchungsobjekt zur Katalogisierung involvierter Hirnstrukturen, Neuronengruppen und beteiligter Proteine.

1.1 Die richtige Richtung

Eine große Herausforderung für ein lokomotorisches System ist die Beibehaltung der korrekten Bewegungsrichtung, selbst wenn das angesteuerte Zielobjekt verschwindet. Für *Drosophila* ist im Lauf ein senkrechter, dunkler Balken ein attraktives Zielobjekt, welches sie versucht zu erreichen (Götz 1980). Basierend auf dieser Tatsache konnten, mit Hilfe des *Buridan Paradigmas* (siehe Kapitel 2.4.2), in welchem eine laufende Fliege zwischen zwei Landmarken patrouilliert, anatomische Strukturen und Proteine identifiziert werden, welche für die visuelle Orientierung zuständig sind (Götz 1980; Strauss et al. 1992). Verschwindet nun die angesteuerte Landmarke, hält eine wildtypische Fliege dennoch die Laufrichtung ein (Strauss und Pichler 1998). Selbst wenn für eine Sekunde ein Ablenkblock im 90° Winkel zum verschwundenen Zielobjekt gezeigt wird, nimmt die Fliege wieder den Ursprungskurs zur angesteuerten Landmarke an (*Detour Paradigma*, siehe Kapitel 2.4.4) (Neuser et al. 2008). Foucaud et al. (2010) und Ofstad et al. (2011) entwickelten parallel ein Paradigma, welches auf dem Prinzip des *Morris water maze* aufbaut. Das *water maze* besteht aus einem mit milchigen Wasser gefüllten, runden Becken, in welchem schwimmende Ratten oder Mäuse eine sich unter der Wasseroberfläche befindliche, kleine Plattform erreichen müssen. Zur Orientierung dient ein das Becken umgebendes Muster (Morris 1984). Im von Foucaud und Ofstad entwickelten *Cold spot Paradigma* muss *Drosophila* anhand eines Musters, welches eine ca. 37°C heiße Plattform umgibt, einen kühlen Platz innerhalb des Versuchsaufbaus finden. Der Platz befindet sich immer in einer festen Relation zum visuellen Muster, beides zusammen wird aber auf vier verschiedene Positionen auf der heißen Platte randomisiert geschaltet und wird von der Fliege von Trainingsdurchlauf zu Trainingsdurchlauf immer schneller gefunden (Ofstad et al. 2011; Foucaud et al. 2010). Ersetzt man das Muster durch einen simplen Farbverlauf, ist sogar das

ausreichend, um ein Wiederauffinden des kühlen Platzes zu gewährleisten (Steiof 2018). Selbst in völliger Dunkelheit besitzt *Drosophila* die Fähigkeit, sich zu orientieren. Erste Versuche hierzu wurden von Putz und Heisenberg in der *Heat Box* durchgeführt. Wurde eine Seite der Box mit Hitze bestraft, so vermied die Fliege diese Seite (Putz und Heisenberg 2002; Putz et al. 2004). Die Vermutung lag nahe, dass die Fliege, ähnlich wie die Wüstenameise *Cataglyphis* (Hartmann und Wehner 1995), ihre Laufrichtung nicht-visuell mittels Vektoraddition ermittelt.

1.2 Anatomie des Gehirns von *Drosophila melanogaster*

Obwohl das Gehirn der Taufliege, verglichen mit höheren Lebewesen, doch sehr klein erscheint und eine um zwei Zehnerpotenzen geringere Neuronendichte, verglichen mit Nagern (Lagercrabtz et al. 2010), in den für die Orientierung zuständigen Bereichen aufweist, zeigt es doch eine enorme Komplexität. Ebenso wie ein Vertebratengehirn ist das Fliegenhirn in unterschiedliche Kompartimente unterteilt, von denen jedes unterschiedliche Aufgabenbereiche erfüllt.

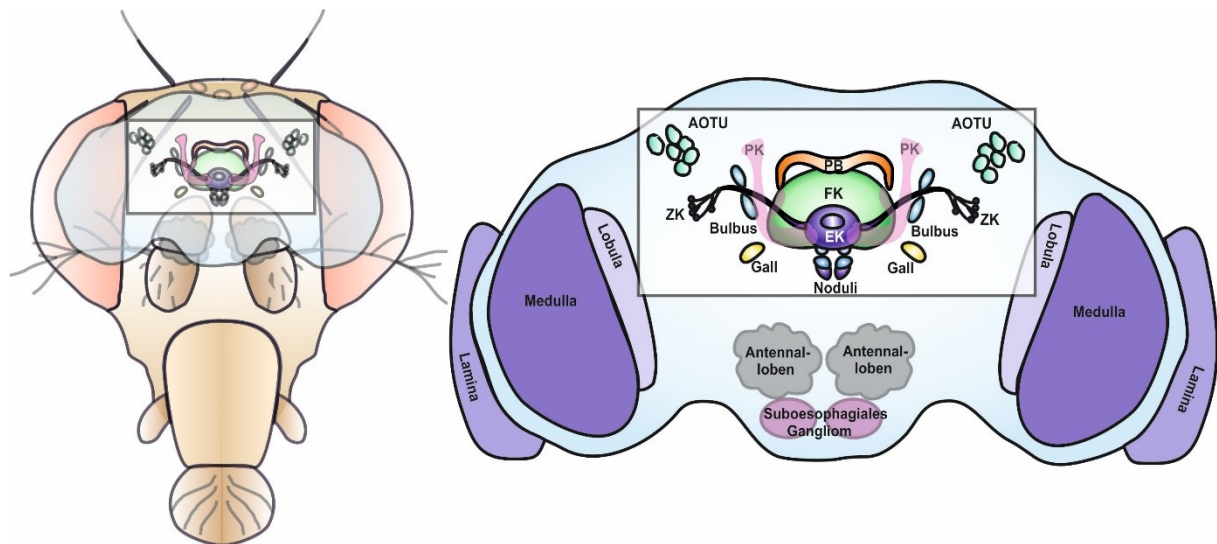


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gehirns von *Drosophila*. Anterior liegen die Antennalloben (grau) und die Loben der Pilzkörper (PK), welche aus Strukturen der Kenyonzellen gebildet werden. Dahinter folgt der Zentralkomplex und die anterioren optischen Tuberkel (AOTU). Der Zentralkomplex setzt sich von anterior nach posterior aus dem Ellipsoidkörper (EK) - mit den dendritischen Auswüchsen (Bulbus) und Zellkörpern (ZK) der Ringneurone, den Noduli, dem Fächerförmigen Körper (FK) und der Protozerebralbrücke (PB) zusammen. Daneben befinden sich weiter die zur akzessorischen Region gehörigen, paarigen Gall und lateral die anterioren optischen Tuberkel (AOTU). Für die Verarbeitung visueller Stimuli sind primär die optischen Loben zuständig. Diese teilen sich in Lamina, Medulla und Lobulakomplex, bestehend aus Lobula und Lobulaplatte auf.

Duftmoleküle werden über die Antennen perzipiert, welche die Information über die Antennalloben und Projektionsneurone zu den Pilzkörpern (Abbildung 1, PK) und in die lateralen Horn-Regionen leiten (Masse et al. 2009). Die Vorverarbeitung visueller Informationen erfolgt über die optischen Loben, welche Informationen von den für *Drosophila* typischen neuronalen Superpositionsäugen erhalten. Die optischen Loben teilen sich in die drei Kompartimente Lamina, Medulla und Lobulakomplex, bestehend aus Lobula und Lobulaplatte, auf (Abbildung 1).

Die für die vorliegende Arbeit wichtige Struktur, ist der Zentralkomplex, sowie die anterioren optischen Tuberkel (Abbildung 1, AOTU). Der Zentralkomplex kann in vier Substrukturen unterteilt werden und ist bedeutend für visuell-basierte Gedächtnisformen, welche mit räumlicher Orientierung assoziiert werden (Ofstad et al. 2011; Neuser et al. 2008; Neuser 2012). Fliegen, die Defekte in diesen Strukturen aufwiesen, zeigen ein gestörtes Lauf- und Flugverhalten (Strauss und Heisenberg 1993; Strauss et al. 1992; Martin et al. 1999).

Anterior im Zentralkomplex liegt der Ellipsoidkörper (Abbildung 1, EK), eine toroidförmige Struktur, welche aus den axonalen Auswüchsen der Ringneuronen und intrinsischen Kleinfeldneuronen gebildet wird, deren Zellkörper (Abbildung 1, ZK) weiter anterior liegen und distal globuläre dendritische Auswüchse (Mikroglomeruli) besitzen, welche die Bulbi bilden (Abbildung 1, Bulbus) (Hanesch et al. 1989). Die Bulbi enthalten Eingänge von den AOTU (Abbildung 1, AOTU), welche visuelle Informationen über die Bulbi an die Ringneurone weitergeben (Omoto et al. 2017; Shiozaki und Kazama 2017). Die Ringneurone können zunächst konzentrisch in vier verschiedene Ringneuronengruppen unterteilt werden (R1,R2,R3,R4 mit R4m und R4d) (Renn et al. 1999). Seit neuestem werden auch zwei weitere, äußere Ringneuronentypen postuliert, R5 und R6, sowie eine Unterteilung des Ringsystems R3 in R3a, R3d, R3m, R3p und R3w (Omoto et al. 2017; Omoto et al. 2018). Weiter kann der EK in acht Sektoren, sogenannte *tiles* unterteilt werden, welche den posterioren Teil des EK innervieren und neuronale Ausgangsdomänen darstellen. Die 16 Hemisektoren (*wedges*) hingegen arborisieren den posterioren, anterioren und medialen Teil des Torus und fungieren als Eingangsdomänen (Abbildung 2) (Wolff et al. 2015).

Der fächerförmige Körper (FK) wird horizontal in neun Schichten und vertikal in 16 Säulen gegliedert und fasst den EK teilweise ein (Wolff et al. 2015). Er ist u.a. für die Mustererkennung während des Flugs wichtig (Liu et al. 2006).

Ventral zum EK und FK befinden sich die Noduli (Abbildung 1), welche wahrscheinlich ebenfalls in das Laufverhalten involviert sind (Martin et al. 1999).

Eine weitere essentielle Struktur für das Laufverhalten ist die Protozerebralbrücke (Abbildung 1, PB). Sie besteht aus einer Kette von 18 Glomeruli (Abbildung 2) und wird zur Schrittlängenkoordination für die Laufrichtungssteuerung (Strauss 2002) sowie für die Richtungssteuerung im Kletterverhalten eingesetzt (Triphan et al. 2010) und enthält das Körpergrößengedächtnis (Krause et al. 2019).

1.3 Das visuelle Ortsgedächtnis und die Bedeutung der kolumnären Neurone für die Kursteuerung

1.3.1 Persistente Aktivität

Wie wird die Position eines Objekts im Raum im Zentralkomplex der Fliege gespeichert? Hierzu machten Seelig und Jayaraman folgende Entdeckung: Mittels Calciumimaging konnten sie nachweisen, dass ein Objekt im visuellen Feld der Fliege einen Kalziumeinstrom in einem Hemisektor auf dem EK erzeugt, zu erkennen an einem Fluoreszenzsignal in den entsprechenden Neuronen („Aktivitätshügel“). Dreht sich die Fliege, oder bewegt sich das Objekt, so rotiert dieser „Aktivitätshügel“ über die Sektoren des EK und markiert so die neue Position des Objekts. Selbst in Dunkelheit bleibt das Signal erhalten und rotiert, sobald die Fliege eine Drehung vornimmt (Turner-Evans et al. 2017).

Welche Strukturen des Zentralkomplexes sind für die Ausbildung des Kurssignals („Aktivitätshügel“) auf dem EK verantwortlich? Hierbei spielen die *kolumnären Neurone* eine entscheidende Rolle. Diese Neuronenklasse verbindet einzelne Glomeruli der Brücke mit Sektoren oder Hemisektoren („*tiles*“ oder „*wedges*“) des EK. Je nach Lage der Ein- und Ausgänge dieser Neurone, werden sie nach Seelig und Jayaramann als *P-EN*; *E-PG* oder *P-EN* bezeichnet (Abbildung 3) (Seelig und Jayaraman 2015). Hierbei beschreibt der erste Buchstabe den wahrscheinlichen Eingang des Neurons (bei *E-PG* Neuronen der EK), die nachfolgenden die möglichen Ausgänge (bei *E-PG* Neuronen die *PB* und die *Gall*). Somit verbinden *E-PG* Neurone den EK mit der *PB* und den *Gall*; *P-EN* Neurone die *PB* mit EK und *Noduli*; *P-EG* die *PB* mit dem EK und den *Gall* (Abbildung 3); wobei die $\Delta 7$ -Neurone lokale Brückenneurone definieren (Abbildung 4). Diese Annahme über die Ein- und Ausgänge der genannten Neurone basiert auf der Arbeit von Wolff et al., in welcher sie mittels lichtmikroskopischer Analyse dieser Neurone Eingänge aufgrund ihrer dornenartigen und Ausgänge aufgrund ihrer bläschenförmigen Morphologie identifiziert haben (Wolff et al. 2015). Ein Ca^{2+} Signal in einem bestimmten Bereich des EK ist immer mit einem Aktivitätssignal in zwei bis drei Glomeruli der Brücke assoziiert. Befindet sich die Fliege in einem Versuchsaufbau mit geschlossenem Regelkreis („*closed-loop*“), beispielsweise stationär laufend auf dem *Buchnerball*, erkennt man einen Zusammenhang zwischen Kurssignal, ausgelöst durch ein visuelles Objekt im Sichtfeld der Fliege und der Drehbewegung der Fliege. Sobald die Fliege stillsteht, bewegt sich auch das Signal nicht; führt die Fliege eine Drehbewegung nach links durch, rotiert auch das Signal auf dem EK im Uhrzeigersinn und das Signal der Brücke verschiebt sich weiter nach rechts (Abbildung 5) (Seelig und Jayaraman 2015; Green et al. 2017). Selbst in völliger Dunkelheit kann das Signal aufrechterhalten werden und rotiert sogar, sobald die Fliege eine Drehbewegung ausführt (Turner-Evans et al. 2017; Green et al. 2017).

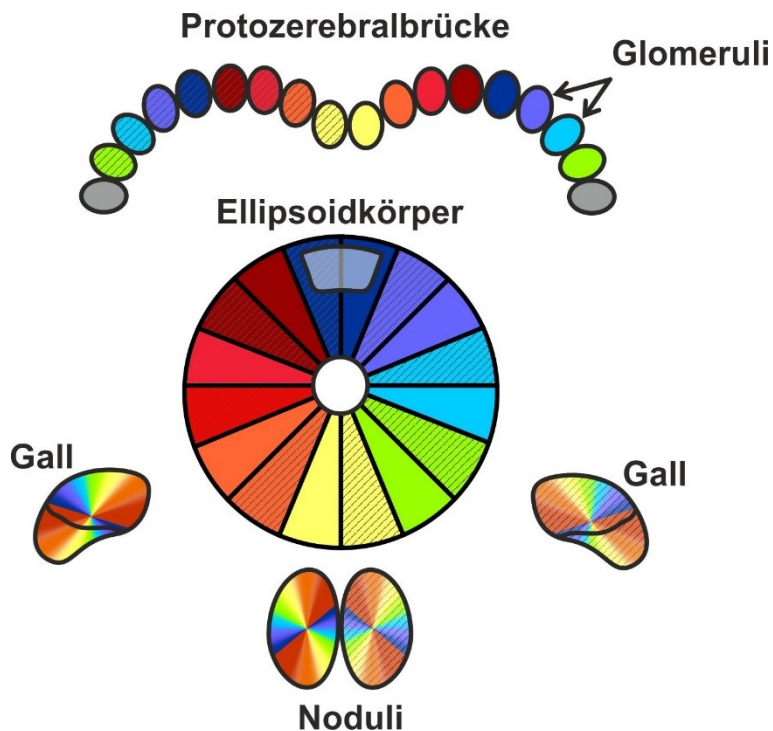


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Protozerebralbrücke, Ellipsoidkörper, Gall und Noduli. Die Protozerebralbrücke besteht aus 18 Glomeruli, neun pro Hemisphäre. Der Ellipsoidkörper kann in 16 Sektoren differenziert werden, von welchen jeweils zwei Hemisektoren einem von jeweils acht Sektoren zugehörig sind (verändert nach Green und Maimon (Green und Maimon, 2018)).

Diese persistente Aktivität der E-PG Neuronen wird erzeugt, da die Neurone innerhalb eines EK-Hemisektors sich immer wieder gegenseitig anregen; benachbarte Hemisektoren weisen dagegen eine nur schwache Aktivierung auf. Ferner können E-PG Neurone eine Art „Erregungsschleife“ mit P-EG Neuronen bilden, da jene in die entgegengesetzte Richtung der E-PG Neurone projizieren, aber denselben Glomerulus und Hemisektor adressieren (Abbildung 3). Neurone mit der gleichen Projektionsrichtung wie P-EG Neurone finden sich in den P-EN Neuronen (Abbildung 3). Allerdings adressieren P-EN Neurone die angrenzenden Sektoren der von den E-PG Neuronen aktivierten Hemisektoren, obwohl beide Neuronenklassen mit demselben Glomerulus assoziiert sind (Abbildung 3). Wird der synaptische Ausgang der P-EN Neurone blockiert, so wird auch das E-PG Signal schwächer (Turner-Evans et al. 2017; Green et al. 2017).

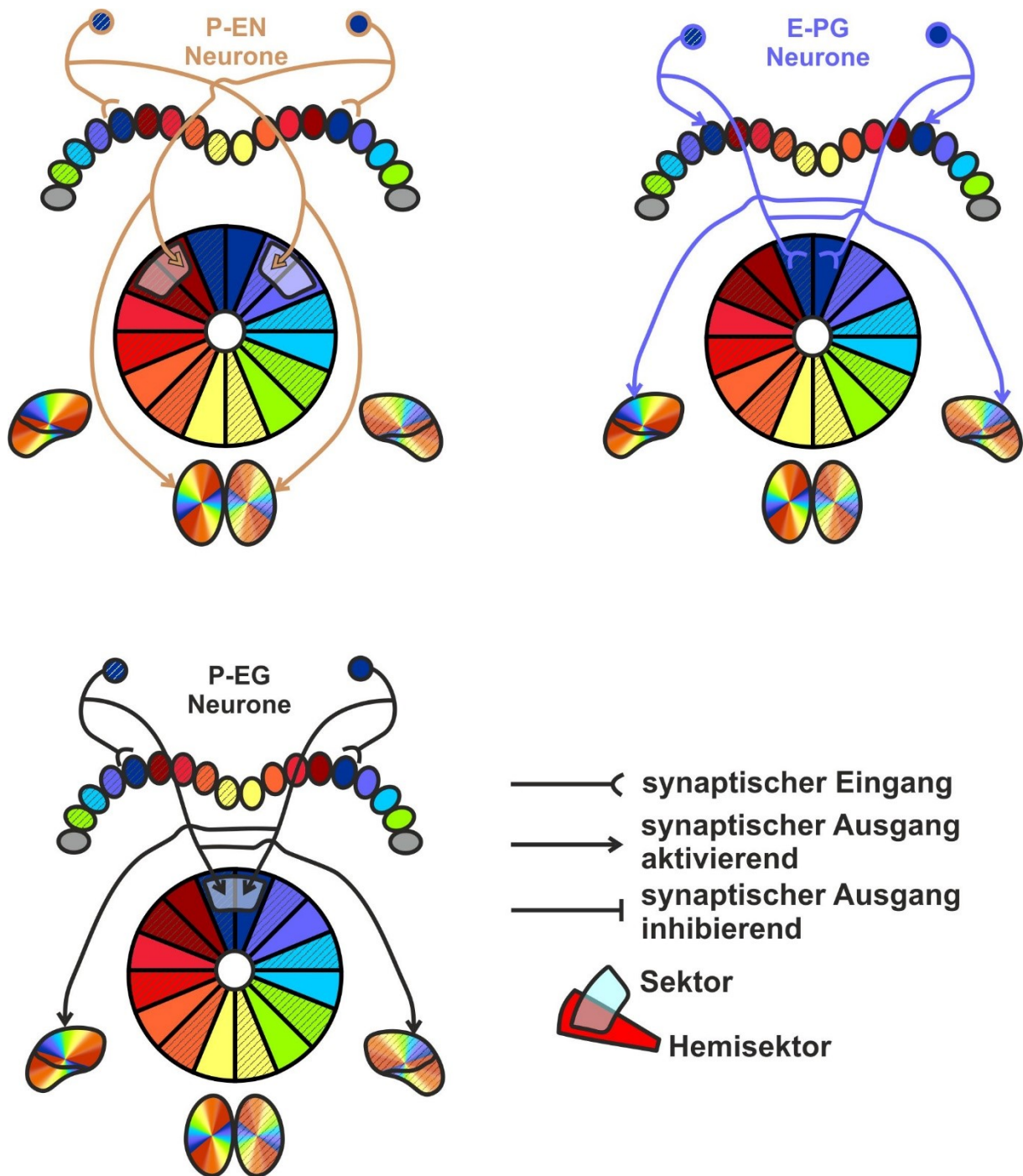


Abbildung 3: Synaptische Ein- und Ausgänge kolumnärer Neurone. Jeder Glomerulus der Protozerebralbrücke hat neuronale Verbindungen zu bestimmten Sektoren und Hemisektoren des Ellipsoidkörpers (farblich identisch). Die Glomeruli der PB sind über E-PG, P-EN und P-EG Neurone mit den Hemisektoren/Sektoren des EK verschaltet und besitzen weitere Ausgänge in die Gall/Noduli. (Verändert nach Green und Maimon, (Green and Maimon, 2018)).

1.3.2 Modifizierung des Kurssignals

Bewegt sich das Objekt oder die Fliege relativ zum Zielobjekt, so verschiebt sich auch das Signal auf dem EK. Das bedingt aber, dass vorher aktive E-PG Neurone inaktiviert werden müssen und neue E-PGs aktiviert. Einen möglichen Mechanismus beschreibt die *laterale Inhibition* (Abbildung 4, A). Hierbei spielen die $\Delta 7$ Neurone der PB als lokale Schaltstelle eine

wichtige Rolle. E-PG Neurone, welche in Kontakt mit den aktiven Glomerulus der Brücke stehen, können andere E-PG Neurone über die $\Delta 7$ Neurone der PB im übrigen Teil des EK oder der PB inhibieren. $\Delta 7$ Neurone weisen eine inhibitorische Aktivität auf Glomeruli auf, welche fünf Glomeruli entfernt von dem Glomerulus sind, welcher die stärkste Aktivierung durch E-PG Neurone erhält. (Abbildung 4) (Green et al. 2017; Kim et al. 2017; Wolff et al. 2015).

Globale Inhibition hingegen basiert auf der Aktivität von Ringneuronen, deren Neuriten den EK umschließen (Hanesch et al. 1989). Unter der Annahme, dass Ringneurone eine bidirektionale Ein-/Ausgangsrichtung besitzen, können sie von E-PG Neuronen angeregt werden und über reziproke Inhibition der E-PG Neurone alle Hemisektoren inhibieren (Abbildung 4, B) (Martín-Peña et al. 2014). Das Model der *globalen Inhibition* wird gegenüber der *lateralen Inhibition* als wahrscheinlicher bezüglich der Feedback-Inhibition zwischen den E-PG Neuronen angesehen.

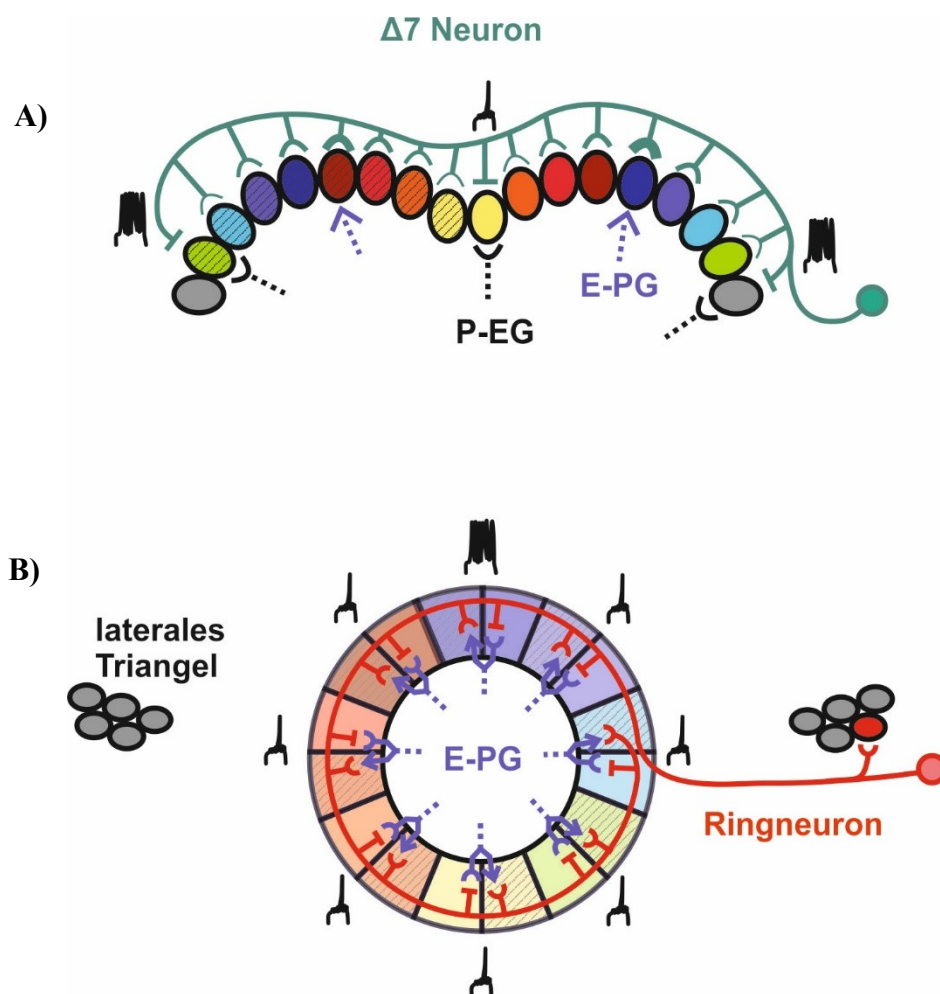


Abbildung 4: Laterale und globale Inhibition. $\Delta 7$ Neurone umfassen die gesamte Brücke. Sie erhalten synaptische Eingänge von den E-PG Neuronen und besitzen Ausgänge zu den P-EG Neuronen, auf welche sie inhibierend wirken (A, laterale Inhibition). Ein einzelnes Ringneuron des EK erhält seinen synaptischen Eingang vom zugehörigen Glomerulus des Bulbus des lateralen Triangels. Als bidirektionale Schaltstelle erhalten sie erregende Eingänge von E-PG Neuronen und wirken gleichzeitig global inhibierend auf alle Hemisektoren (B, globale Inhibition) (verändert nach Green und Maimon, 2018).

1.3.3 Die Pfadintegration

Nach Verschwinden der Landmarke bleibt die Aktivität der für die Position kodierenden E-PG Neurone auf dem EK erhalten und rotiert auf dem EK, sobald sich die Fliege bewegt. Die für die Modifikation des Signals auf dem EK wichtigen Neurone sind die P-EN Neurone, welche, bezogen auf denselben Glomerulus in der PB, auf die der E-PG Neurone benachbarten Hemisektoren projizieren (Abbildung 5, A). Sobald sich die Fliege nach rechts dreht, findet eine verstärkte Aktivität der rechten Brückenglomeruli statt, wodurch das Kurssignal auf dem EK gegen den Uhrzeigersinn verschoben wird (Abbildung 5, B-D). Wird die Aktivität der P-EN Neurone unterdrückt, so wird auch das Signal der E-PG Neurone schwächer und die Rotation des Kurssignals auf dem EK stark verlangsamt (Turner-Evans et al. 2017; Green et al. 2017). Um die Information über die eigene Position im Raum auch in Dunkelheit gewährleisten zu können, muss das E-PG Signal nach Eigenbewegung der Fliege, stetig im Ellipsoidkörper und der Protozerebralbrücke neu berechnet werden. Hierzu scheint sich das neuronale System der Fliege mathematischer Integration zu bedienen, indem es die Winkelgeschwindigkeit der Körperdrehung, welche wahrscheinlich über Propriozeption oder Kopien der motorischen Steuerung wahrgenommen wird, benutzt und darüber den möglichen Kurs der Fliege berechnet (Green und Maimon 2018). Die E-PG Neurone, welche für die Pfadintegration wichtige neuronale Strukturen im Gehirn der Fliege darstellen, ähneln, aufgrund ihrer zirkulären Anordnung, den *head-direction* Zellen in Nagern im Modell von Skaggs et al. Auch die nach Skaggs et al. entdeckten *Rotationszellen* decken sich mit den P-EN Neuronen der Fliege, ebenso wie seine *visuellen Zellen* mit den Ringneuronen des Ellipsoidkörpers bei *Drosophila* vergleichbar sind (Skaggs et al. 1995).

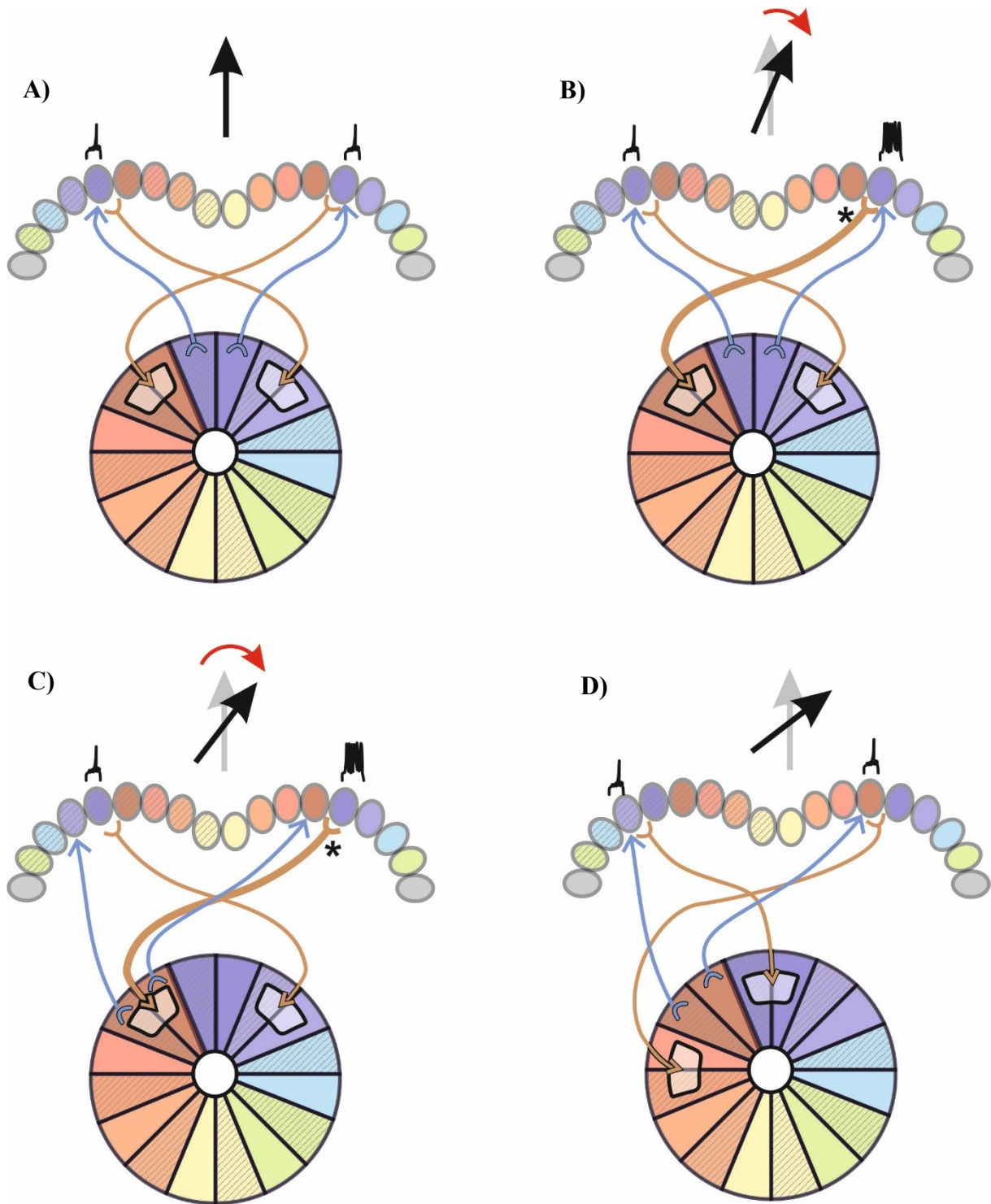


Abbildung 5: Die über P-EN Neurone vermittelte Rotation des Kurssignals auf dem EK. E-PG und P-EN Neurone, welche auf denselben Glomerulus der PB projizieren, besitzen ihre Ein- /Ausgänge in benachbarten Hemisektoren des EK (A). Sobald die Fliege eine Rechtsdrehung vornimmt, werden Glomeruli der rechten Brückenseite stärker aktiviert (B), was zu einer stärkeren Aktivierung der zugehörigen P-EN Neurone und des verbundenen Hemisektors führt. Nachfolgend werden die dem Hemisektor zugehörigen E-PG Neurone aktiviert, welche die Glomeruli links vom Ursprungssignal ansprechen (C), die gleichzeitig die ihnen zugehörigen P-EN Neurone aktivieren (D). Das E-PG Signal rotiert gegen den Uhrzeigersinn (verändert nach Green and Maimon, 2018).

1.4 Lernen und Gedächtnis

Nicht nur höhere Lebewesen wie Wirbeltiere sind in der Lage zu lernen, auch bei Insekten, wie beispielsweise *Drosophila* kann diese Fähigkeit beobachtet werden. Nach Dudai beschreibt ein Lernprozess eine langfristige Anpassung des Verhaltens an eine bestimmte Erfahrung (Dudai 2002). Die ersten, wichtigen Versuche zum Lernverhalten der Tiere machte der russische Physiologe Iwan P. Pawlow Anfang 1900 mit Hunden. Er konnte beweisen, dass eine angeborene Reaktion auf einen unbedingten Stimulus auch durch einen bedingten Reiz ausgelöst werden, wenn dieser zuvor mit dem unbedingten Stimulus gekoppelt wurde (Pawlow 1923). Später konnte Skinner zeigen, dass für die klassische Konditionierung die Kontiguität zweier Ereignisse entscheidend ist. Die Belohnung/Bestrafung muss in einem genau definierten Zeitfenster nach dem Stimulus CS erfolgen, sonst kann keine Verknüpfung der beiden Ereignisse stattfinden. Weder darf die Belohnung/Bestrafung zusammen mit dem CS, noch vor oder zu lange nach jenem stattfinden (Skinner 1958). Schon 1949 stellte D.O. Hebb die These auf, dass Lernprozesse eine metabolische und/oder strukturelle Veränderung des Nervensystems bedingen (Hebb 1949).

Wir unterscheiden drei Gedächtnisformen, das Ultrakurzzeit, sowie das Kurz- und das Langzeitgedächtnis (Dudai 2002; Markowitsch, H.-J. 2005). Hierbei spielen Veränderungen auf elektrischer, sowie auf Protein- und zellulärer Ebene die entscheidende Rolle. Ein kurzzeitiges Gedächtnis reicht von einer Anhebung des Membranpotentials, was die Ausbildung eines Aktionspotentials wahrscheinlicher macht, über vermehrte Bereitstellung oder Degradierung von Rezeptoren und Ionenkanälen. Eine weitere wichtige Rolle für diese Gedächtnisform spielt die Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung, wodurch die Transmitterfreisetzung an der Synapse verändert wird (Hawkins et al. 1993).

Das Langzeitgedächtnis wird durch die Modifizierung synaptischer Verbindungen oder die Ausbildung neuer Synapsen, bzw. deren Abbau bestimmt (Davis 2011), aber auch durch epigenetische Prozesse, wie z.B. die Methylierung bestimmter Gene (Miller und Sweatt 2007). Maßgeblich an der Etablierung eines Langzeitgedächtnisses ist das Protein CREB (*cAMP response element-binding protein*) beteiligt, welches von der *Proteinkinase A* (PKA) phosphoryliert wird und die Expression verschiedener Zielgene anregt, welche für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses essentiell sind (Drain et al. 1991; Kuntz et al. 2012). Die Ausprägung dieser Gedächtnisform bei *Drosophila* wurde von Tully und Quinn 1985 in der sogenannten *Tully-Quinn-Maschine*, auf deren Prinzip heute noch die meisten Paradigmen zur klassischen Konditionierung basieren, untersucht. Hierbei wird ein für die Fliege neutraler Duft mit einem Elektroschock gekoppelt. (Tully und Quinn 1985). Diese olfaktorische Duftkonditionierung funktioniert über die sogenannte Koinzidenzdetektion, die über eine zyklisches Adenosin-3`5`-Mono-Phosphat (cAMP)- abhängige Transduktionskaskade vermittelt wird, an deren Ende CREB mit seinen Zielgenen steht.

Die erste Bestimmung von Lernmutanten bei *Drosophila* wurde in der *Tully-Quinn-Maschine* durchgeführt. Quinn untersuchte einzelne, mutante *Drosophila*- Fliegen auf Lerndefizite, isolierte diese Lernmutanten und etablierte somit die ersten lernmutanten Stämme. Er bewies somit, dass *rutabaga*, *dunce* und *amnesiac*, wichtige Gene für die Ausbildung eines Gedächtnisses sind (Tully und Quinn 1985).

Das Zusammentreffen eines US mit einem Duft wird über Neurone des Pilzkörpers verarbeitet. Die beiden wichtigsten Proteine in dieser Kaskade sind eine doppelt regulierte *Adenylylzyklase* (AC) und eine *Phosphodiesterase* (PDA). Es sind heute ungefähr zehn verschiedene PDAs

bekannt, wobei die für das olfaktorische Lernen relevante PDA von dem Gen *dunce* (*dnc*) codiert wird und cAMP in 5'-AMP spaltet. Die vom Gen *rutabaga* (*rut*) codierte Ca²⁺/Calmodulin-abhängige *Adenylylzyklase* (AC) hingegen stellt cAMP aus Adenosin-Triphosphat (ATP) her. Die Koinzidenzdetektion von olfaktorischem und aversiven/appetitiven Stimulus geschieht über die AC, nachdem durch das modulatorische Neuron über Transmitterfreisetzung eine α -Untereinheit am G-Protein-gekoppelten Rezeptor des präsynaptischen Pilzkörperneurons abgespalten wurde, welche an die AC bindet. Gleichzeitig bindet die AC auch Ca²⁺/Calmodulin (CaM), welches durch einen Ca²⁺-Einstrom in das PK-Neuron aktiviert wird, nachdem die Erregung durch einen olfaktorischen Reiz, über die Antennalloben, an jene Pilzkörperneurone weitergeleitet wurde. Nach dieser Zweifachbindung stellt die nun aktivierte AC cAMP aus ATP her; somit steigt der cAMP-Spiegel in der Zelle und cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der *Proteinkinase A* (PKA). Nachfolgend löst sich die katalytische Untereinheit der PKA. Bei mehrfacher Aktivierung ist diese dissoziierte Untereinheit nun in der Lage, CREB zu phosphorylieren, was zu einer Aktivierung von CREB-regulierter Genexpression führt (Langzeitgedächtnis). Überdies kann die PKA Modifizierungen an Ionenkanälen der Präsynapse vornehmen, was im Sinne eines Kurzzeitgedächtnisses zu einer Veränderung der Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt und einer modifizierten Verhaltensantwort führt. Als Gegenspieler zur AC überführt die von *dnc* codierte PDA cAMP zu 5'-AMP; der cAMP-Spiegel der Zelle sinkt und die PKA reassoziert wieder zu einem Holoenzym. Diese beiden Proteine AC und PDA sorgen somit für ein fein abgestimmtes Regulationswerk des cAMP-Spiegels (Davis 2005; Davis et al. 1996) (Abbildung 6).

Ein weiteres Element dieser Transduktionskaskade ist das Gen *amnesiac* (*amn*), welches erstmals von Quinn 1979 als Repressor des *rutabaga*-mutanten Phänotyps beschrieben wurde (Quinn et al. 1979). Tully konnte 1990 in der *Tully-Maschine* beweisen, dass *amn*-Mutanten defizient für negatives, assoziatives Lernen sind (Tully und Quinn 1985).

Doch nicht nur für die olfaktorische Koinzidenzdetektion sind *rut* und *dnc* notwendig, auch im visuellen Orientierungsgedächtnis spielen sie eine entscheidende Rolle. Kuntz konnte 2015 ein cAMP-abhängiges Orientierungsgedächtnis im dritten Ringsystem nachweisen (Kuntz 2015). Nach Omoto entspricht das Expressionsmuster des von Kuntz verwendeten Treibers Ring R3d und R3p (Omoto et al. 2018).

Für das visuelle Orientierungsgedächtnis sind strukturelle Schädigungen an Zentralkomplexkompartimenten weniger bedeutend, vielmehr kann der Verlust einer einzigen Proteinklasse ursächlich für den Verlust des Orientierungsgedächtnisses sein. So zeigt die Mutante *ellipsoid-body-open* (*ebo*⁶⁷⁸) einen ventral gespaltenen EK, sowie ein mutantes Verhalten im *Detour*-Paradigma (Strauss 2002). *ebo* kodiert für das Protein *Exportin-6*, welches für den Transport von Aktin aus dem Zellkern zuständig ist. Bei einer Mutation des *ebo*-Gens akkumuliert Aktin im Zellkern und verhindert somit die Transkription durch den dSRF/dMRTF-Komplex (*Serum Response Factor/Myocardin-related transcriptional factor*) (Thran 2013; Stüven et al. 2003). Jedoch kann das visuelle Orientierungsgedächtnis, auch bei irreversibler Schädigung der Ellipsoidkörperstruktur, durch akute, ektopische Expression von *ebo*-cDNA im Ellipsoidkörper wieder hergestellt werden (Thran 2013).

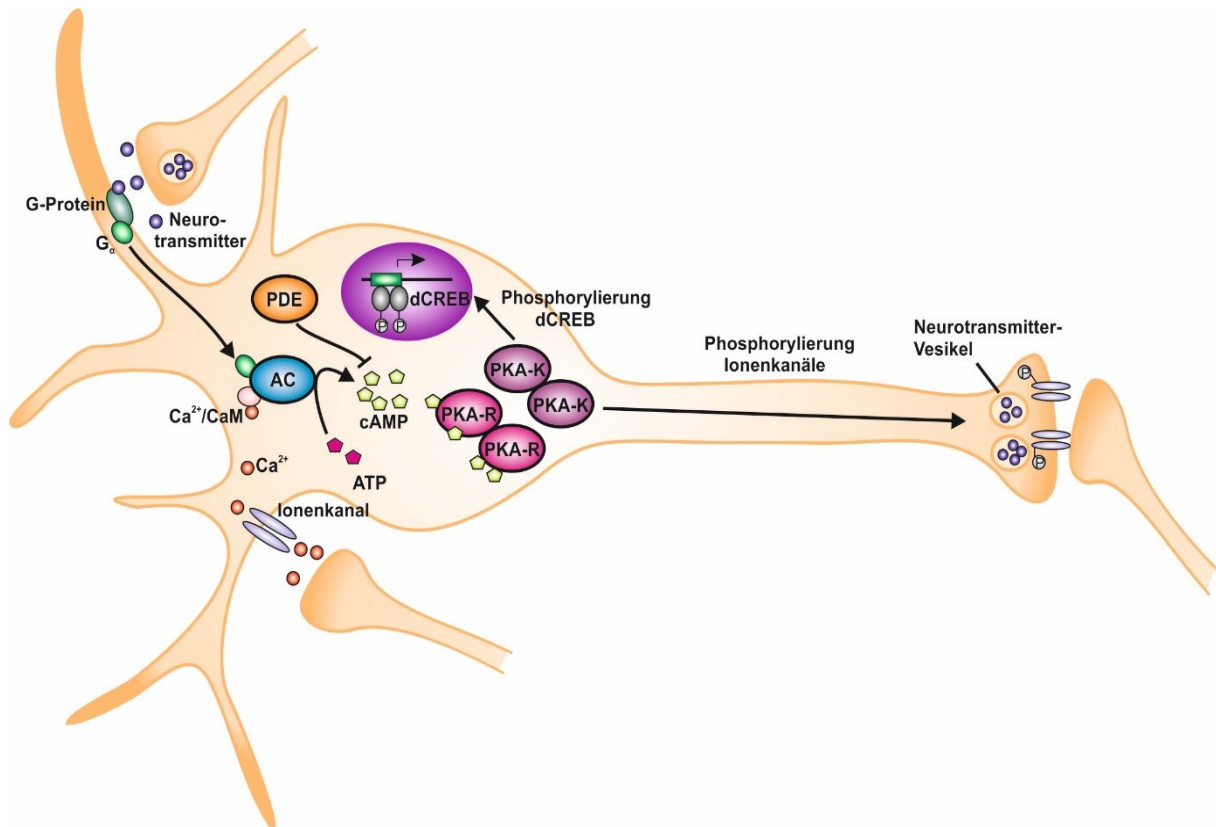


Abbildung 6: Die Koinzidenzdetektion. Binden Neurotransmitter an ein G-Protein, so löst sich die α -Untereinheit welche in den Zellkörper wandert und dort an die von *rutabaga* codierte Adenylylzyklase (AC) bindet. Gleichzeitig wird über Ca^{2+} -Freisetzung in einer Kenyonzelle ein Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex aktiviert, welcher ebenfalls an die AC bindet. Durch diese Koinzidenzdetektion wird die AC aktiv und bildet zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) aus Adenosin-Tri-Phosphat (ATP). Das cAMP bindet an die Proteinkinase A (PKA), woraufhin die katalytische Einheit der PKA (PKA-K) von der regulatorischen (PKA-R) dissoziiert und in den Kern wandert. Hier sorgt sie für die Phosphorylierung (P) des *cAMP Response Element-binding Proteins* (dCREB), welches, nun aktiviert, die Expression bestimmter Gene startet, welche in die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses involviert sind. Darüber hinaus kann die PKA-K entlang des Axons bis in die Präsynapse wandern und dort über Phosphorylierung bestimmter Ionenkanäle die Neurotransmittersekretion und damit das Antwortverhalten der Zelle ändern. Dieser Prozess ist essentiell für die Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses. Das Gen *dunce* codiert für das Protein *Phosphodiesterase* (PDE), welche als Gegenspieler zur AC cAMP zu 5'-AMP abbaut, wodurch der cAMP-Spiegel der Zelle sinkt (Davis, 2005).

1.5 Neue Aufgaben für Cryptochrom

Das Photopigment *Cryptochrom* (CRY), welches in der Fliege von dem Gen *cry* codiert wird, zählt aufgrund seiner Gensequenzähnlichkeit zur Familie der Photolyasen, obwohl es selber keine Photolyaseaktivität mehr zeigt (Sancar 2003). Es ist im Tier,- sowie im Pflanzenreich weit verbreitet und wurde erstmals von Ahmad und Cashmore aus der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* unter der Bezeichnung *HY4* isoliert (Ahmad und Cashmore 1993). Sie konnten einen Verlust der Sensitivität auf blaues Licht am Hypokotyl von Pflanzen nachweisen, welche mutant für *cry* waren. Heute schreiben wir dem Protein vielfältige, biologische Signalfunktionen zu, wie Regulation der inneren Uhr (Ahmad und Cashmore 1993), Pflanzenwachstum (Yang und Li 2017) und Rezeption von magnetischen Feldern (Wiltschko

und Wiltshko 2006). Im Zusammenhang mit der inneren Uhr teilen wir CRY in zwei Klassen ein, dem lichtabhängigen Typ I der Invertebraten und dem lichtunabhängigen TypII der Vertebraten (Gegeat et al. 2010). Allen gemeinsam ist der redoxreaktive Cofaktor *Flavin-Adenin-Dinucleotid* (FAD), sowie ein C-Terminus (CTT), welcher für die Phototransduktion verantwortlich ist (Chaves et al. 2011). Bei *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass Licht kurzer Wellenlängen eine Konformationsänderung vom CRY CTT bewirkt und damit eine Bindung an *TIMELESS* (*TIM*), einem Hauptbestandteil der inneren Uhr, stattfindet (Busza et al. 2004; Dissel et al. 2004; Ceriani 1999) und als negativer Regulator der transkriptionalen Rückkopplungsschleife wirkt (Ozturk et al. 2013). Nach Photoabsorption von FAD^{ox}, wodurch ein angeregter Singulettzustand erreicht wird (¹FAD*), wird nachfolgend, über eine nachgeschaltete sequenzielle Elektronentransportkette, welche aus einer Triade von *Tryptophan*-Aminosäuren (Trp-Triade, Abbildung 7) besteht, ein Flavosemiquionradikal aus FAD•- oder FADH•, zusammen mit einem Trp-Radikal am terminalen Ende der Trp-Kette gebildet. Das Flavosemiquionradikal kann sich hierbei aufgrund seiner intramolekularen Elektronen-Kern-Hyperfeininteraktionen im Singulett- oder Triplettzustand befinden, was durch das Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes beeinflusst werden kann (Maeda et al. 2012). Es wird vermutet, dass ein Organismus über das Verhältnis der Ausgangsprodukte von Singulett- und Triplettzuständen daraufhin ein magnetisches Feld, bzw. dessen Ausrichtung wahrnehmen kann (Liedvogel et al. 2007). Beweise für diese Funktionsweise bei *Drosophila* müssen aber noch erbracht werden. CRY-Expression findet sich bei *Drosophila* in PDF-Neuronen, in sechs DN1p-Neuronen, ein bis zwei DN3-Neuronen, drei LNd-Neuronen (mit oszillierenden Expressionsstärken), den Antennen, in den Photorezeptorzellen R7 und R8, sowie im Ring R4 des EK. (Yoshii et al. 2009; Yoshii et al. 2008). Neben den typischen *Clock*-Neuronen befindet sich CRY also auch in Zellen, die nicht in die Steuerung der inneren Uhr involviert sind. In der vorliegenden Arbeit konnte überdies ein lichtunabhängiger Funktionsmechanismus von CRY im Zusammenhang mit der idiothetischen Orientierung bewiesen werden. Über welche Interaktionspartner diese Funktion stattfindet ist noch nicht geklärt. Bekannte Interaktionspartner von CRY sind *bruchpilot* (*brp*) (Damulewicz et al. 2017), *MagneticReceptor* (*MagR*) (Qin et al. 2015), *inactivation no afterpotential D* (*inaD*) (Schlichting et al. 2018; Mazzotta et al. 2013), *neither inactivation nor afterpotential C* (*ninaC*) (Mazzotta et al. 2013), *neither inactivation nor afterpotential E* (*ninaE*) (Hanai und Ishida 2009), *period* (*per*) (Schlichting et al. 2018; Ozturk et al. 2013; Rosato E. et al. 2001; Ceriani 1999), *retinal degeneration A* (*rdgA*) (Mazzotta et al. 2013), *shaggy* (*sgg*) (Stoleru et al. 2005), sowie *no receptor potential A* (*norpA*) (Ni et al. 2017).

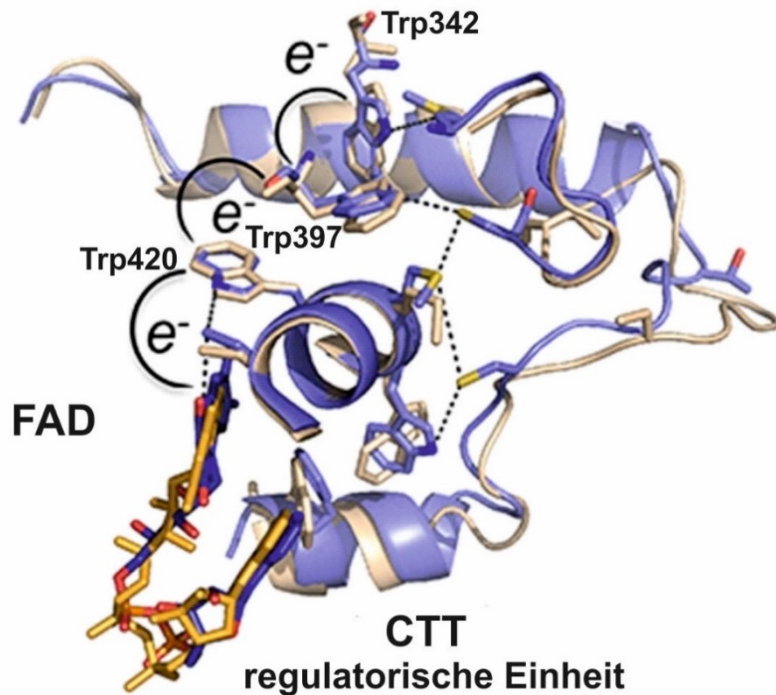


Abbildung 7: Schematischer Aufbau von dCRY. Kristallstruktur von *Drosophila Crypochrom*. Dargestellt ist der Elektronentransport (e^-) entlang der *Tryptophan-Triade* (Trp342, Trp397, Trp420), *Flavin-Adenin-Dinucleotid* (FAD) und der regulatorische C-terminus (CTT) (mit freundlicher Genehmigung aus und verändert nach Czarna et al., 2013 (Czarna et al., 2013)).

1.6 Die Idee der Magnetfeldorientierung bei *Drosophila*

Im Jahre 2008 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Gegear eine Studie, in der sie nachweisen wollten, dass wildtypische *Drosophila melanogaster* Fliegen magnetische Felder vermeiden, aber sich mittels Zuckerbelohnung auf die Hinwendung in Magnetfelder trainieren lassen. Als Schlüsselprotein für diese Orientierungsleistung wurde das Flavoprotein *Cryptochrom* (CRY), in Verbindung mit Licht geeigneter Wellenlänge, in Betracht gezogen.

Die Arbeitsgruppe verwendete ein T-Labyrinth, welches in der Mitte einen Hohlkubus besitzt, welcher an zwei gegenüberliegenden Seiten je eine verschließbare Öffnung mit je einem Röhrchen besitzt. Um die beiden Röhrchen ist jeweils eine Drahtspule im Winkel von 45° gewickelt, in welcher ein magnetisches Feld der Stärke 5G ($\hat{=} 0,5$ mT) [das entspricht der ca. zehnfachen Stärke des Erdmagnetfeldes in unseren Breiten ($\sim 49,42 \mu\text{T}$), gemessen mittels eines Fluxgatemagnetometers in Braunschweig (<https://www.ptb.de>)], erzeugt werden kann. Die Tiere wurden in Gruppen darauf trainiert, das magnetische Feld mit einer Zuckerbelohnung in Verbindung zu bringen. Gegear und Kollegen fanden heraus, dass diese Magnetotaxis in Abhängigkeit von Licht der Wellenlänge <420 nm, sowie des Proteins CRY stand (Gegear et al. 2008; Gegear et al. 2010).

1.7. Das GAL4/UAS-System

Die Möglichkeit zur genetischen Modifikation über das GAL4/UAS-System (GAL4-Transkriptionsfaktor/ upstream activating sequence), macht *Drosophila* zu einem wertvollen Modellorganismus in der Neurobiologie. Mit Hilfe dieses genetischen “Schweizer Taschenmessers” bietet sich die Möglichkeit, in der Taufliege Gene nur in ganz bestimmten Bereichen des Organismus ein- bzw. abzuschalten. Wichtig hierbei ist das bei *Drosophila* natürlich vorkommende *P-Element*, welches eine Transposase benötigt, um sich aus seinem Integrationsort herauszuschneiden und in anderer Stelle des Genoms wieder einzufügen (Seyffert 2003). Ohne diese Transposase bleibt es stabil integriert. Seinen Ursprung hat das GAL4/UAS System in der Arbeit von Fischer et al. in den 80er Jahren. Mittels einer P-Element-Transformation klonierten sie die cDNA des GAL4-Gens aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* auf einen Vektor, auf welchem es unter der Kontrolle eines *Adh*-Promotors steht, und integrierten es in die Fliegen. Bei Anwesenheit von Transposase inseriert das P-Element nun in zufällige Stellen des Genoms und kann unter die Kontrolle eines genomischen Enhancers gelangen. Einem anderen Teil der Tiere wurde ein P-Element eingefügt, auf welchem sich ein Hybrid aus einer *Drosophila* TATA-Box und einer GAL4-Bindungsstelle (UAS-Sequenz) befand, sowie downstream das *E.coli*-Gen *lacZ* (codiert für das Gen β -Galactosidase). Kreuzt man beide Fliegenlinien, so kommen beide Konstrukte in der F1-Generation zusammen. GAL4 wird unter der Kontrolle von *Adh* exprimiert, bindet an die UAS-Sequenz und induziert die Expression von β -Galactosidase. Unter Zugabe von farblosen X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranosid) spaltet β -Galactosidase dieses Substrat zu einem blauen Farbstoff. Somit sind im Organismus nur die Bereiche blau gefärbt, welche auch GAL4 exprimieren (Fischer et al. 1988). Brand und Perrimon entwickelten dieses System in den 90ern weiter, indem sie das *lacZ* Gen durch jeweils verschiedene Gensequenzen ersetzen. Dadurch ist es möglich, durch Verkreuzen der GAL4-Linien (Treiber) mit der UAS-Sequenz tragenden Linie (Effektor) das gewünschte Gen räumlich kontrolliert zu exprimieren (Abbildung 8) (Brand und Perrimon 1993; Dietzl et al. 2007; Ni et al. 2008).

Moderne GAL4-Linien, welche auf dem *Phi-Integrase-System* beruhen, beinhalten auf dem integrierten P-Element einen eigenen Enhancer. Das P-Element wird von zwei *attB*-Sequenzen flankiert, die eine Integration des Elements in eine nicht-codierende Region des Genoms ermöglichen (Abbildung 8) (Pfeiffer et al. 2008; Pfeiffer et al. 2010).

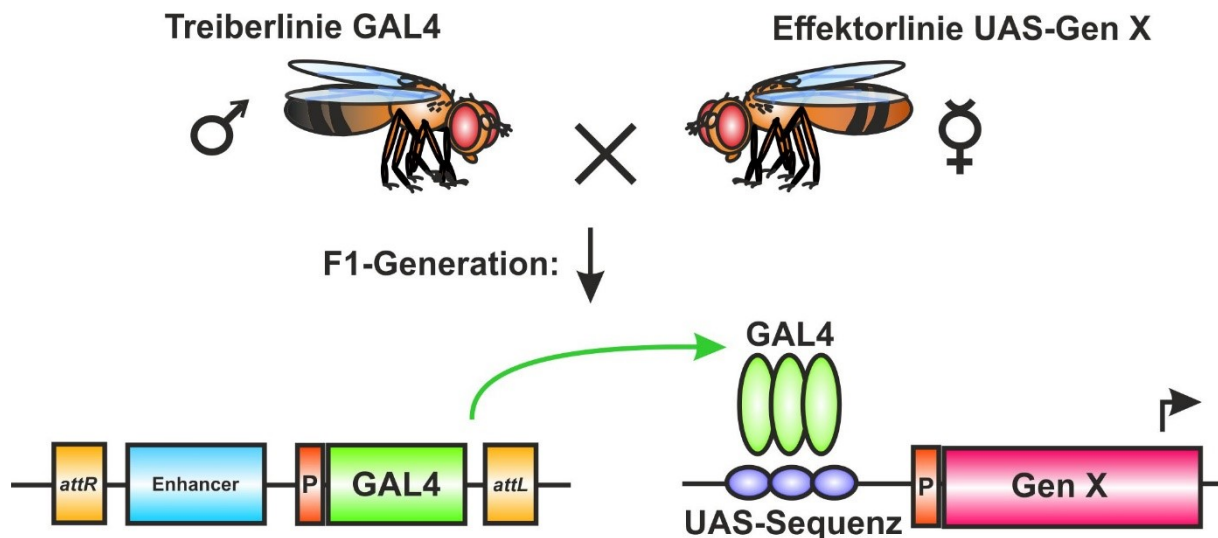


Abbildung 8: Das GAL4/UAS-System. Kreuzt man eine Treiberlinie mit einer Effektorlinie, so erhält die F1-Generation sowohl das Effektor-, wie auch das Reporterkonstrukt. Um an der richtigen Stelle des Genoms zu integrieren, wird das P-Element der Treiberlinie von zwei *attB*-Seiten (*attR* und *attL*) flankiert. Weiter befinden sich auf dem P-Element *Enhancer*, *Promotor*, sowie die *GAL4*-Sequenz. Die Effektorlinie besitzt die *UAS*-Sequenz, welche GAL4 bindet und das nachgeschaltete Gen X mit dessen Promotor. Sobald GAL4 exprimiert wird, bindet das Protein an die UAS-Sequenz des Effektorkonstrukts und veranlasst die Expression des klonierten Gens (Pfeiffer et al., 2010).

Eine Möglichkeit der Manipulation über dieses System besteht in der Expression von *Tetanustoxin* (TNT). Wird TNT unter der Kontrolle von GAL4 exprimiert, wird die synaptische Transmission der Neurone, welches GAL4 exprimieren, über die durch TNT verhinderte Ausschüttung von Neurotransmittern unterbunden. Hierbei spaltet TNT das Membranprotein *Synaptobrevin*, wodurch die neurotransmitterbeinhaltenden synaptischen Vesikel nicht mehr mit der Zellmembran verschmelzen und folgend die Neurotransmitter nicht in den synaptischen Spalt entlassen können (Sweeney et al. 1995).

Mit Hilfe der RNA-Interferenz Linien (RNAi Effektor Linien) können ganz gezielt bestimmte Gentranskripte degradiert und damit die Expression der Produkte unter GAL4-Kontrolle unterbunden werden. Hierbei wird nach GAL4-Bindung eine, der mRNA eines gewünschten Gens komplementäre Antisense-RNA exprimiert, welche sich zu *doppelsträngiger* RNA (dsRNA) zusammenlagert (Tabara et al. 1999). Die dsRNA wird nachfolgend vom Enzym *Dicer* in *small interfering* RNA (siRNA) Stücke zerschnitten. Nachfolgend verbinden sich diese siRNAs mit dem Enzym *RISC* (RNA-induced silencing complex) und RISC trennt die siRNA in Einzelstränge, welche an die komplementäre endogene *messenger* RNAs (mRNA) binden. Diese werden geschnitten und sorgen somit für einen raschen Abbau der mRNA Bruchstücke (Duffy 2002).

Auch eine Expression eines gewünschten Gens über *complementary* DNA (cDNA) in einem genetisch mutanten Hintergrund, ist mit dem GAL4/UAS-System möglich. Einem Tier, welches defizient für ein Protein ist, kann somit nur in einem ganz bestimmten Bereich des Nervensystems dieses Protein zurückgegeben werden. Folgend kann man in Verhaltensexperimenten untersuchen, ob das exprimierte Protein in diesem Bereich für ein bestimmtes Verhalten verantwortlich ist.

Zur Untersuchung von Expressionsmustern eines Treibers finden Effektorlinien Verwendung, welche nach GAL4-Bindung ein Fluoreszenzprotein exprimieren. Nach anschließender Präparation des Gehirns (*Whole Mounts*, Ganzpräparate) und anschließender Antikörperfärbung zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals, kann die Fluoreszenz mittels Anregung durch Laser entsprechender Wellenlängen in einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop beobachtet werden (Lee und Luo 1999).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die ursprüngliche Fragestellung meiner Dissertation beschäftigte sich mit dem Sitz des Magnetfeldrezeptors und der nachgeschalteten Transduktionskaskade in *Drosophila melanogaster*. Im Zuge der Arbeiten hat sich jedoch herausgestellt, dass es keinen Nachweis bei *Drosophila* für die Orientierung mit Hilfe magnetischer Felder gibt und die Fliegen sich im dafür publizierten Paradigma, einem T-Labyrinth, idiothetisch orientieren konnten. Das dafür zugrundeliegende Netzwerk und einige, für die Pfadintegration essentielle, Proteine konnten darauf hin identifiziert werden.

Hierbei wird der Sitz dieser Orientierungsleistung hauptsächlich im Ellipsoidkörper und der Protozerebralbrücke vermutet und daher das Hauptaugenmerk auf diese Strukturen des Zentralkomplexes und die verbindenden Neuronenklassen gelegt.

Auf Beteiligung an der idiothetischen Orientierung untersucht, wurde der Einfluss der Genprodukte von Genen, die in Verbindung mit Lernverhalten und Orientierung stehen (*rutabaga*, *dunce*, *amnesiac*, *radish*, *ellipsoid-body-open* und *ignorant*), ein Gen der Phototransduktionskaskade des visuellen Systems (*norpA*), sowie Gene für die Regulation der circadianen Rhythmik (*period* und *cryptochrome*), wobei für *rutabaga*, *dunce* und *cryptochrome* der Einfluss der Genexpression in den einzelnen Ringsystemen des Ellipsoidkörpers genauer betrachtet wurde.

Weiter wird die Notwendigkeit der P-EN und E-PG Neurone für die idiothetische, sowie für die visuelle Orientierung untersucht und verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Aufzucht und Haltung der Fliegenstämme

Die Fliegenstämme wurden in einer Klimakammer bei 25°C, 60% Luftfeuchte und einem 14/10h Hell-/Dunkelzyklus gehalten. Es wurden Futtergläschen mit einem Durchmesser von 3,6 cm und einer Höhe von 8,2 cm aus transparenten Polystrol (Fa. Greiner BioOne), verschlossen mit einem milbdichten Schaumstoffstopfen (Fa. K-TK Retzstadt), verwendet. Die Futtergläschen wurden ca. 2 cm hoch mit Standardfuttermedium, bestehend aus Maisgrieß, vollfetttem Sojamehl, Malzextrakt, Zuckerrübensirup, inaktiver Bierhefe, Agar-Agar, Methyl-4-Hydroxybenzoat und Wasser befüllt. In den Futterbrei wurden mittig ca. 1 cm tief 2x4x0,2 cm große Pappstreifen (Fa. K-TK Retzstadt), gegeben, welche zuvor mit Methyl-4-Hydroxybenzoat getränkt worden waren und die an der sich im Medium befindlichen Seite ca. 2 mm hoch mit in Wasser gelöster aktiver Bäckerhefe benetzt waren.

2.2 Verkreuzen der Fliegenstämme

Für die Kreuzungen wurden jeweils jungfräuliche Weibchen (erkennbar am Meconium im Abdomen; das Meconium besteht aus verdautem pupalen Gewebe und kennzeichnet die Jungfräulichkeit einer Fliege, da sie sich in diesem Stadium noch nicht verpaart aufgrund der in diesem Stadium noch unzureichend ausgehärteten Kutikula (Dahmann 2008)) eines Stammes mit jungen Männchen eines anderen Stammes verpaart. Dazu wurden die gewünschten Tiere mittels CO₂ Betäubung unter dem Binokular separiert und mithilfe eines weichen Pinsels in ein frisches Futterbreigläschen überführt. Nach ca. 3-5 Tagen wurde die Elterngeneration in ein frisches Futterbreigläschen umgesetzt, um eine Vermischung mit der Filialgeneration zu vermeiden.

2.3 Liste der in der Arbeit verwendete Fliegenstämme

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Fliegenstämme unter Berücksichtigung des betroffenen Chromosom, der Bezugsquelle, sowie der Referenz. Chr.=Chromosom

| Stamm | Chr. | Bezugsquelle | Referenz |
|--|------|--------------------------------|---------------------|
| Canton Spezial (CS) | WT | Bloomington Stock Center #1 | |
| Wildtyp Berlin (WTB) | WT | DGRCenter #103397 | |
| <i>amnesiac</i> [1]/FM7a (<i>amn</i> ¹) | X | Bloomington Stock Center #5954 | (Quinn et al. 1979) |
| <i>dunce</i> [1] (<i>dnc</i> ¹) | X | AG Strauß, Univ. Mainz | (Dudai et al. 1976) |

| | | | |
|---|----------|--|--|
| <i>ellipsoid-body-open</i> [678] (<i>ebo</i> ⁶⁷⁸) | X | AG Heisenberg, Univ. Würzburg | (Strauss and Heisenberg, 1993; Thran et al., 2013) |
| <i>ignorant</i> [58/1] (<i>ign</i> ^{58/1}) | X | AG Heisenberg, Univ. Würzburg | (Putz et al., 2004; Kuntz et al., 2012) |
| <i>no receptor potential A</i> [P24] (<i>norpA</i> ^{P24}) | X | Bloomington Stock Center #9048 | (Zhu et al. 1993) |
| <i>period</i> [01] (<i>per</i> ⁰¹) | | AG Helfrich- Förster, Univ. Würzburg | (Livingstone und Tempel 1983) |
| <i>radish</i> [1] (<i>rad</i> ¹) | X | AG Strauß, Univ. Mainz | (Gong et al. 1998; Folkers et al. 2006) |
| <i>rutabaga</i> [1] (<i>rut</i> ¹) | X | AG Strauß, Univ. Mainz | (Levin et al. 1992) |
| <i>cryptochrome</i> [01] (<i>w</i> [*];; <i>cry</i> ⁰¹ /TM3, <i>Sb</i>) | X;III | AG Strauß, Univ. Mainz | (Dolezelova et al. 2007) |
| Effektorlinien | | | |
| <i>rut</i> ¹ /FM7a;;P(UAS- <i>rut</i>)Z1/TM3, <i>Sb</i> | X;III | AG Heisenberg, Univ. Würzburg | (Dolezelova et al. 2007) |
| <i>dnc</i> ¹ /FM7a;P(UAS- <i>dnc</i>)Z1/CyO | X;II | M. Schwärzel, Univ. Berlin | |
| <i>y</i> ¹ <i>w</i> [*];UAS-CD4-tdGFP/CyO | X:II | Bloomington Stock Center #35839 | |
| <i>w</i> *;;UAS-mCD8::GFP/TM3, <i>Sb</i> | X;III | Bloomington Stock Center #5137 | (Lee und Luo 1999) |
| <i>y</i> ¹ <i>w</i> UAS-mCD8::RFP LexAop2-mCD8::GFP | X | Bloomington Stock Center #32229 | |
| <i>w</i> ¹¹¹⁸ / <i>w</i> ⁺ ;P(UAS-TeTxLC)/CyO | X;II | H. Scholz, Univ. Köln | (Scholz et al. 2000; Sweeney et al. 1995) |
| <i>w</i> *;UAS- <i>cry</i> /CyO; <i>cry</i> ⁰¹ /TM3, <i>Sb</i> | X;II;III | R. Staneswski, Univ. Münster | (Emery et al. 1998) |
| RNA Interferenz Knock-down Linien | | | |
| <i>y</i> ¹ <i>v</i> ¹ ;;UAS- <i>cry</i> ^{RNAi} | X;III | Bloomington Stock Center; #25859 | (Sathyanarayanan et al. 2008) |
| <i>y</i> ¹ <i>v</i> ¹ ;;UAS- <i>rut</i> ^{RNAi} /TM3, <i>Sb</i> | X;III | Bloomington Stock Center; #27035 | (Ni et al. 2009) |

| | | | |
|--------------------------------|-------|----------------------------------|---|
| $y^1v^1;UAS-dnc^{RNAi}/TM3,Sb$ | X;III | Bloomington Stock Center; #27250 | |
| Reporter Linien | | | |
| $w^{1118};R28D01-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #47342 | (Ofstad et al. 2011; Omoto et al. 2018) |
| $w^{1118};R31A12-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #49661 | (Omoto et al. 2018) |
| $w^{1118};R19C08-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #48845 | (Omoto et al. 2017; Xie et al. 2017) |
| $w^{1118};R54B05-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #50465 | (Xie et al. 2017; Omoto et al. 2017) |
| $w^{1118};R12D09-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #48503 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^{1118};R13D06-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #48560 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^{1118};R41G11-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #41244 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^{1118};R37F06-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #49962 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^{1118};R26B12-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #49165 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^{1118};R26C04-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #49168 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^{1118};R19G02-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #48860 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^{1118};R60D05-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #39247 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^*;R49E09-GAL4$ | X;III | Bloomington Stock Center #38692 | (Jenett et al. 2012) |

| | | | |
|---|----------|---------------------------------|---|
| $w^{*};;VT039763-GAL4$ | X;III | Vienna Stock Center | (Dietzl et al. 2007) |
| $w^{*};;VT49921-GAL4$ | X;III | Vienna Stock Center #203353 | (Dietzl et al. 2007) |
| $w^{*};;VT42759-GAL4$ | X;III | Vienna Stock Center | (Dietzl et al. 2007) |
| $w^{*};;VT043679-GAL4$ | X;III | Vienna Stock Center | (Dietzl et al. 2007) |
| $w^{*};;VT025526-GAL4$ | X;III | Vienna Stock Center #203474 | (Dietzl et al. 2007) |
| $w^{*};;VT025526-GAL4 cry[01]/TM3,Sb$ | X;III | A. Mendel, Univ. Mainz | |
| 198Y-GAL4 | IV | Bloomington Stock Center #30817 | (Renn et al. 1999) |
| EB1-GAL4 | II | B. Poeck, Univ. Mainz | (Young und Armstrong 2010; Omoto et al. 2018) |
| 189Y-GAL4 | II | D. Armstrong, Univ. Edingburgh | (Omoto et al. 2018; Renn et al. 1999) |
| <i>ftz-ng-GAL4/TM3,Sb</i> | III | J. Simpson, Univ. Ashburn | (Pereanu et al. 2011) |
| $w^{*};;ftz-ng cry[01]/TM3,Sb [clone1]$ | X;III | Bloomington Stock Center #8767 | |
| $w^{*};189Y-GAL4/CyO;cry[01]/TM3,Sb$ | X;II;III | A. Mendel, Univ. Mainz | |
| $w^{1118};;R54B05-LexA$ | X;II | Bloomington Stock Center #54892 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^{1118};;R28D01-LexA$ | X;III | Bloomington Stock Center #54764 | (Jenett et al. 2012) |
| $w^{1118};;R19C08-LexA$ | X;II | Bloomington Stock Center #52543 | (Jenett et al. 2012; Omoto et al. 2017) |

2.4 Versuchsdurchführung

Die gewünschten Genotypen wurden unter Kälteanästhesie separiert und waren in der Zeit der Versuche drei bis sechs Tage alt. Zwischen der Kältebetäubung und den Versuchen lagen mindestens 16 h. Für das Simulationsexperiment nach Gegear, sowie für das *IODA* wurden den Fliegen keine Flügel gekürzt. Für das *Buridan*-, *Persistenz*- und *Detour*-Paradigma wurden die Flügel der Fliegen mit Hilfe einer Iridektomieschere unter Kälteimmobilisierung auf ca. $\frac{1}{3}$ der Länge gekürzt, ohne dabei die Flügelvene zu beschädigen.

2.4.1 Simulation des Experiments von Gegear, jedoch ohne künstliches Magnetfeld

Für die Simulation von Gegears Experiment, verwendeten wir ein quaderförmiges Mittelstück mit röhrenförmigen Innenteil, an dessen gegenüberliegenden Seiten jeweils ein Kunststoffröhrchen, hergestellt aus je einem 15 ml Falcontube®, angeschraubt wird. An der Mittelstückvorderseite befindet sich eine Einfüllöffnung, über welche, mittels eines Aspirators, Gruppen von ca. 6-25 männlichen Fliegen eingefüllt werden. Die Öffnung wird mit einem Verschlussstopfen geschlossen. Die Übergänge in die Röhrchen können mit Hilfe von Schiebern verschlossen werden. Die Röhrchen sind an den distalen Enden aufgeschnitten, um mit Hilfe von Schaumstoffstopfen, welche an einem Spritzenkolben befestigt sind, die sich im Röhrchen befindlichen Fliegen in das Mittelstück zurückschieben zu können. Ebenfalls am distalen Ende befindet sich eine kleine Öffnung, durch welche ein Kunststofftrichter eingeführt werden kann, welcher ein mit einer 10%igen Zuckerlösung getränktes Zellstofftuchlein enthält (Abbildung 9).

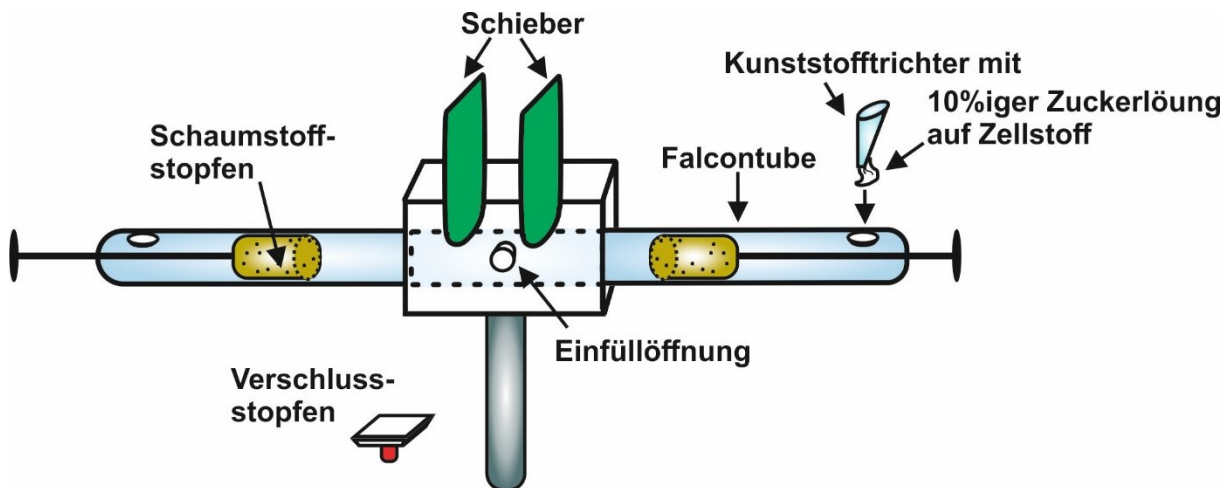


Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Simulation des Experiments von Gegear. An einem, mit zwei Schiebern verschließbaren Kunststoffwürfel, sind an den gegenüberliegenden Seiten Kunststoffröhrchen angeschraubt. An den äußeren Enden der Röhrchen befinden sich an Spritzenkolben befestigte Schaumstoffstopfen, mit Hilfe welcher die Versuchstiere aus den Röhrchen in das Mittelstück zurückgeschoben werden können. Über die Einfüllöffnung werden jeweils 20 Gruppen von 6-25 Tieren eingefüllt; die Öffnung wird mit einem Verschlussstopfen verschlossen. Für die Belohnung wurde ein Zellstofftuch mit einer 10%igen Zuckerlösung getränkt und durch einen Kunststofftrichter in das obere, äußere Ende des gewünschten Röhrchens gesteckt.

Im Unterschied zu den Arbeiten von Gegear und Kollegen verwendeten wir kein künstliches Magnetfeld, um zu untersuchen, ob sich die Tiere in Gegears Experimenten eher nach der Seite und nicht nach einem Magnetfeld orientiert haben. Zwar war um jedes Kunststoffröhrchen eine Magnetspule gewickelt, mit Hilfe welcher, nach Anlegen einer Spannung auf jeweils einer Seite ein künstliches, ca. 1,39 mT starkes Magnetfeld erzeugt werden konnte. Jedoch fanden die Experimente ohne angelegte Spannung statt.

Wir trainierten die Versuchstiere gemäß der Vorgehensweise von Gegear et al.; die Tiere erhielten im Training immer auf jener Seite die Zuckerbelohnung im nicht vorhandenen, „künstlichen Magnetfeld“, auf welcher im anschließenden Test das „künstliche Magnetfeld“ präsentiert worden wäre. Nachdem im Training ein Schieber geöffnet wurde, hatten die Tiere

jeweils 60s Zeit, sich in dem entsprechenden Röhrcchen ohne Zuckerbelohnung aufzuhalten, danach wurden sie mit Hilfe des Schaumstoffstopfens vorsichtig in das Mittelstück zurückgeschoben und der Schieber wieder geschlossen. Dann wurde der gegenüberliegende Schieber geöffnet und die Tiere konnten sich 60s in dem Röhrcchen mit Zuckerbelohnung aufhalten, bevor sie wieder mit dem Stopfen in das Mittelstück zurückgeschoben wurden. Im anschließenden Test wurden beide Schieber geöffnet und die Tiere hatten für 60s die Wahl zwischen beiden Röhrcchen (Abbildung 10). Es wurde anschließend die Anzahl der Tiere im Röhrcchen mit nicht vorhandenem, „künstlichem Magnetfeld“ und vorheriger Zuckerbelohnung; die Anzahl der Tiere auf der vorherig nicht-belohnten Seite ohne „künstliches Magnetfeld“; sowie die Gesamtzahl der Tiere ermittelt. Für jeden Versuchsdurchlauf wurde eine neue Fliegengruppe verwendet.

Unsere ursprüngliche Versuchsdurchführung (siehe Anhang). wich von der Vorgehensweise von Gegear ab Wir präsentierten die Zuckerbelohnung mit künstlichem Magnetfeld im Training in jeder Gruppe auf beiden Seiten und im anschließenden Test alternierten wir die Seite des künstlichen Magnetfeldes. So konnte ausgeschlossen werden, dass sich die Tiere im Test in die zuvor belohnte Seite orientierten

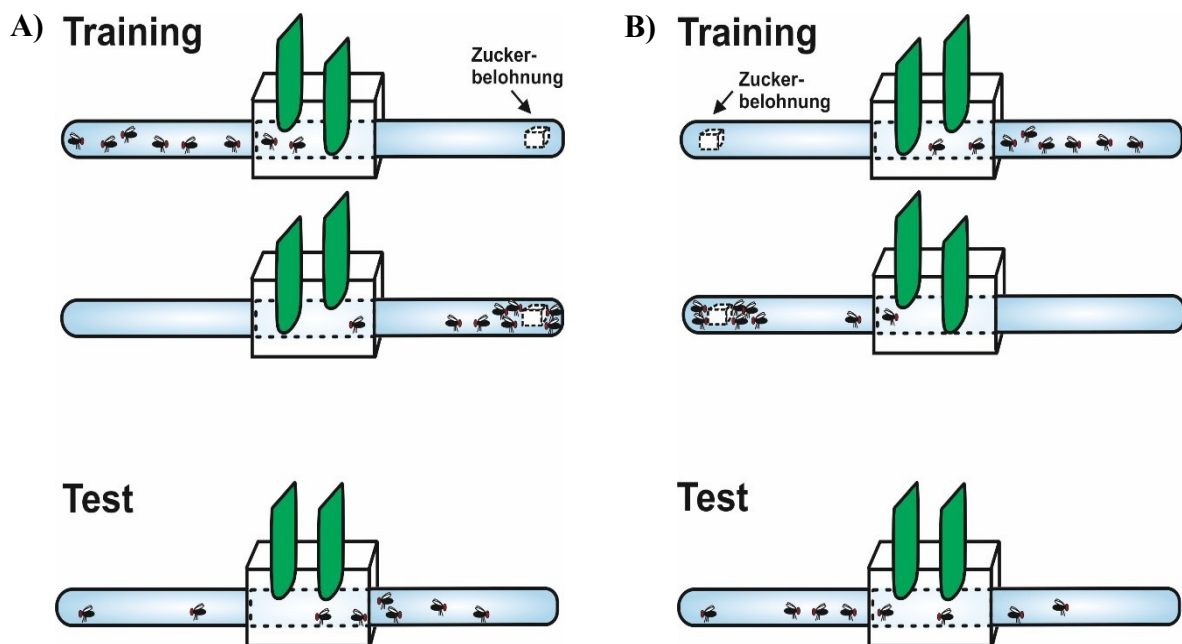


Abbildung 10: Versuchsdurchführung zur Simulation des Experiments von Gegear. Gemäß der Versuchsdurchführung nach Gegear et al. erhielt eine Gruppe der Versuchstiere im Training keine Zuckerbelohnung auf der linken Seite, danach eine Zuckerbelohnung im nicht vorhandenen „künstlichen Magnetfeld“ auf der rechten Seite. Nachfolgend hatten die Tiere im Test die Wahl zwischen beiden Seiten (A). Für die nächste Versuchsgruppe wurden belohnte und unbelohnte Seite, sowie das „künstliche Magnetfeld“ vertauscht (B). Das „künstliche Magnetfeld“ wurde im Test wie bei Gegear immer auf derselben Seite angenommen, auf der die Zuckerbelohnung stattgefunden hatte.

2.4.2 *Buridan* Paradigma

Das *Buridan* Paradigma erhielt seinen Namen von dem *Buridan'schen Paradoxon*, das eine Entscheidungsunfähigkeit eines Individuums zwischen zwei identischen Stimuli beschreibt (Götz 1980). Die Fliege befindet sich hierbei auf einer runden, 8,5 cm im Durchmesser dimensionierten Plattform, welche von einem für die Fliege unüberwindbaren 4 cm breiten Wassergraben umgeben ist. Um die Plattform schließt sich ein milchig-diffus durchscheinender Kunststoffzylinder an, welcher von außerhalb mit vier ringförmigen Neonröhren (3000 Lux) beleuchtet wird. An der Innenseite des Zylinders sind zwei sich gegenüberliegende „Landmarken“ (Metallstreifen mit einer Breite von 2cm und einer Länge von 17,3 cm, mit schwarzer Folie beklebt) angebracht. Für die Fliege stellen die beiden Landmarken eine attraktive Fluchtmöglichkeit da. Sie wird sich annähern und so lange vor dem Wassergraben der einen Landmarke aufhalten, bis sie ihr Verhalten als sinnlos erachtet und auf die zweite Landmarke zuläuft. Das führt dazu, dass wildtypische Fliege permanent zwischen den beiden Landmarken hin und her laufen (Strauss et al. 1992) (Abbildung 11, A). Die Bewegungen der Fliege werden alle 0,2s mit einer sich oberhalb und parallel zur Plattform befindlichen Kamera aufgezeichnet und als X-Y-Koordinate an das Programm Tracker.exe weitergeleitet. Ein Versuchsdurchlauf dauert 15 min, insgesamt werden für jede Fliege 4500 Koordinaten aufgezeichnet. Für jeden Genotyp werden zehn Individuen einzeln gemessen. Anschließend werden die Koordinaten mit dem Programm Buridan0725 als Laufspuren dargestellt (Abbildung 11, B) und der absolute mediane Fehlerwinkel berechnet, d.h., der Median der 4500 Fehlerwinkel (Orientierungswinkel [°] zu der winkelmäßig näheren der beiden Landmarken), welche die Fliege während ihres Laufes einnimmt. Somit ist eine Analyse der Fähigkeit zur Objektorientierung möglich (Strauss und Heisenberg 1993).

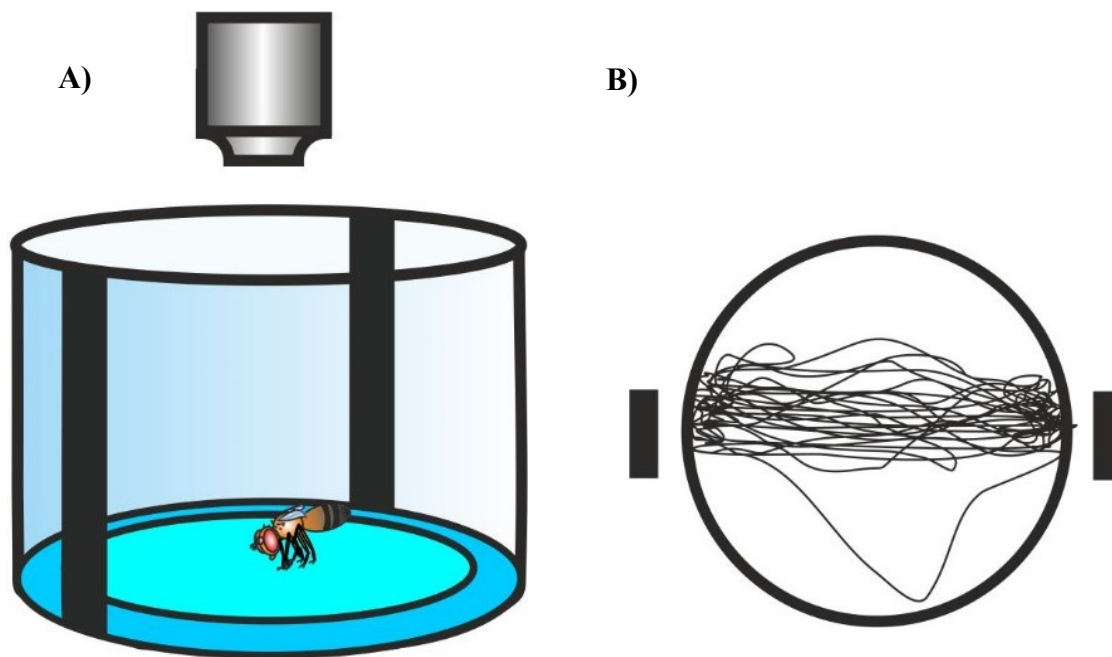


Abbildung 11: Buridan Paradigma. A) Die Fliege bewegt sich auf der Plattform zwischen den beiden Landmarken. Mit Hilfe der sich über der Arena befindlichen Kamera werden die Positionen der Fliege aufgezeichnet und an das Auswertungsprogramm weitergegeben. Während des 15 minütigen Versuchs wird alle 0,2s eine Aufnahme gemacht und die Daten als XY-Koordinaten gespeichert. Sobald die Fliege die Plattform verlässt, wird die Aufzeichnung angehalten und ein Alarmton gegeben. B) Die zurückgelegte Strecke kann als Laufspur dargestellt werden. Die Größenverhältnisse von Fliege und Arena entsprechen nicht den tatsächlichen Verhältnissen.

2.4.3 Persistenz Paradigma

Das *Persistenz* Paradigma wurde von Strauß und Pichler 1998 entwickelt. Es dient dazu, die Persistenz in der Orientierung der Fliege auf eine Landmarke zu untersuchen, nachdem die Landmarke verschwunden ist (Strauss und Pichler 1998). Der Versuchsaufbau besteht aus einer Plattform mit einem Durchmesser von 26 cm und einem sie umgebenden Wassergraben von 2 cm Breite, welchen die Fliege nicht überwinden kann. Um die Arena befindet sich ein Zylinder aus 180 LED-Kolumnen zu je 32 LEDs. Die LED-Kolumnen können über einen Rechner mit einem speziellen Programm angesteuert werden. Die virtuellen Landmarken werden erzeugt, indem man einige Kolumnen ausschaltet, sodass zwei sich gegenüberliegende, 4 cm breite, dunkle Landmarken erzeugt werden (Kontrast $c = 0,94$). Der Versuch wird in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Lediglich unter der milchig-trüben Plattform befindet sich eine Rotlichtlampe, welche ein für die Fliege nicht sichtbares Licht erzeugt. Mit einer über der Plattform angebrachten, rotsensitiven Kamera wird die Fliege erfasst und kann auf einem Monitor als Schatten verfolgt werden (Abbildung 12). Auf dem Monitor ist ein Gitternetz angebracht, welches mit zur Mittellinie parallelen Linien im Abstand von 0,5 cm versehen ist. Zunächst werden der Fliege beide Landmarken präsentiert; sobald die Fliege die Mittellinie der Plattform überquert hat, verschwinden beide Landmarken. Es wird die zurückgelegte Strecke der Fliege als Vektor mit Ausrichtung in X-Richtung notiert. Ein Lauf ist beendet, sobald die Fliege einen 0° Winkel zur Mittellinie einnimmt, den Rand der Arena erreicht oder länger als zehn Sekunden stillsteht. Jede Fliege unternimmt zehn Anläufe; pro Genotyp werden zehn Fliegen getestet.

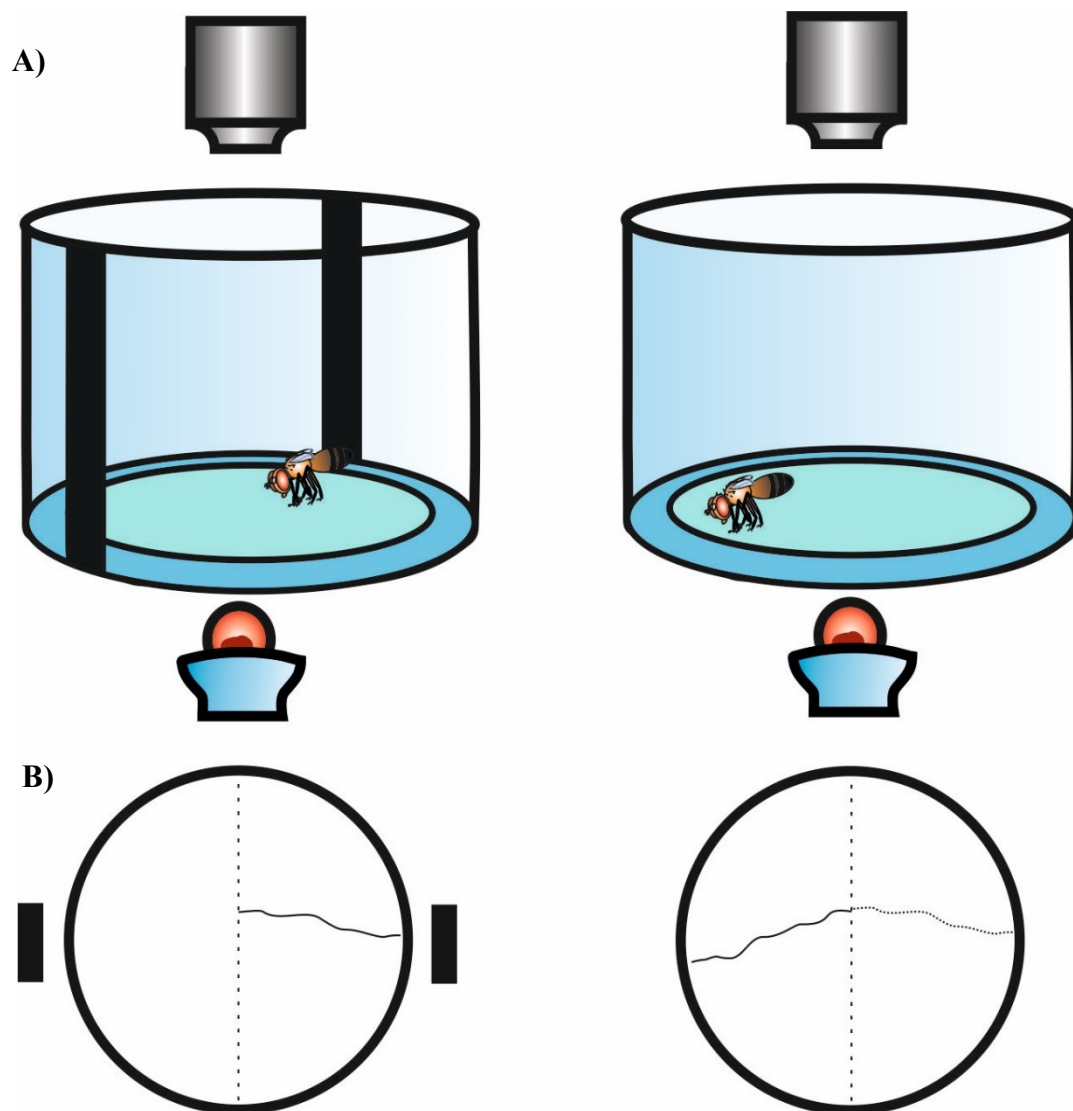


Abbildung 12: Persistenz Paradigma. A) Die Fliege bewegt sich zwischen zwei Landmarken. Sobald sie die imaginäre Mittellinie überquert, verschwinden beide Landmarken und es wird die zurückgelegte Strecke als Vektor in X-Richtung gemessen. B) Laufspur einer wildtypischen Fliege, auch ohne visuellen Reiz wird die Richtung hin zur verschwundenen Landmarke eingehalten.

2.4.4. Detour Paradigma

Für das *Detour*-Paradigma wird derselbe Aufbau wie für die *Persistenz* Versuche verwendet. Das Paradigma wurde von Neuser entwickelt, um das Orientierungsgedächtnis von Fliegen zu untersuchen (Neuser et al. 2008). Hierfür werden einer einzelnen Fliege zwei Landmarken präsentiert, zwischen welchen sie patrouillieren kann. Überquert die Fliege die imaginäre Mittellinie, verschwinden die Landmarken und in einem randomisierten Winkel von $\pm 90^\circ$ zur angestrebten Landmarke wird eine Ablenklandmarke gezeigt. Sobald sich die Fliege der Ablenklandmarke zuwendet, verschwindet auch diese und keine Landmarke ist mehr präsent. erinnert sich die Fliege an die zuerst gezeigte Landmarke, wird sie sich dieser nach Verschwinden der Ablenklandmarke wieder zuwenden (Abbildung 13). Diese positive

Entscheidung wird angenommen, wenn sie einen Winkel $>45^\circ$ zwischen Ausrichtung zur verschwundenen Ablenkländmarke und ihrer Laufrichtung gerichtet zur erstgezeigten Ländmarke einnimmt. Eine negative Entscheidung wird angenommen, wenn sich die Fliege von der Ablenkländmarke in einem Winkel $>45^\circ$ in Richtung weg von der zuerst angelaufenen Ländmarke dreht. Nach Strauß und Pichler (1998) folgt in Zufallsläufen nach einer Rechtsdrehung der Fliege mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,58 eine Linksdrehung und vice versa; daher wird in diesem Paradigma das Zufallsniveau bei 58% angenommen (Strauss und Pichler 1998). Jede andere Entscheidung wird als „nicht entschieden“ gewertet. Pro Genotyp werden zehn Fliegen mit je zehn Entscheidungen getestet.

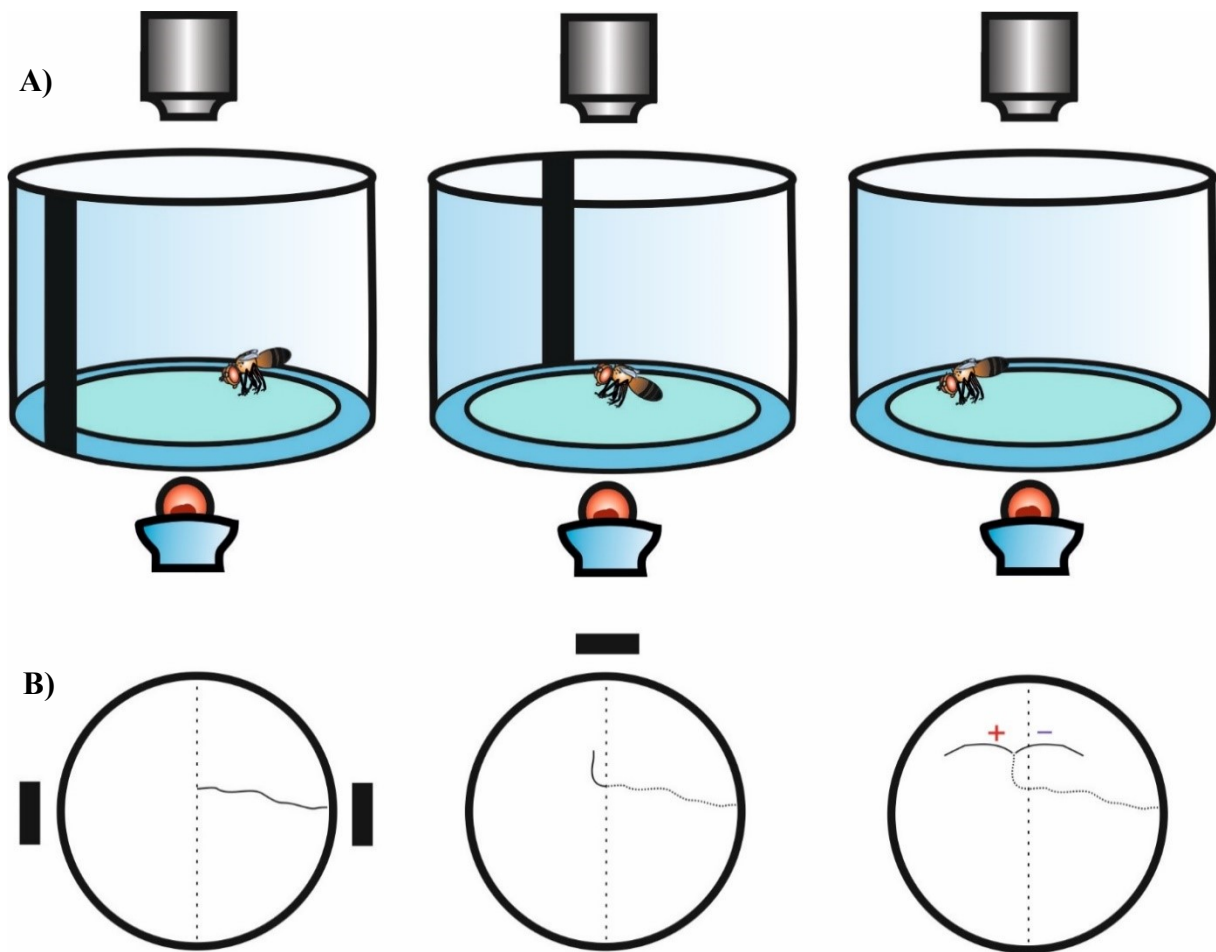


Abbildung 13: Detour Paradigma. A) Der Versuch wird in derselben Arena durchgeführt, wie der Persistenz-Versuch. Nachdem die Fliege die imaginäre Mittellinie überquert hat, verschwindet die Ziel-Ländmarke und eine Ablenkländmarke erscheint 90° zur Ziel-Ländmarke. Wird diese von der Fliege angesteuert, verschwindet auch diese und keine Ländmarke wird mehr gezeigt. B) Laufspur einer wildtypischen Fliege; nach Verschwinden der Ablenkländmarke wendet sie sich der verschwundenen Ziel-Ländmarke zu (positive Entscheidung "+"). Eine Abwendung von der Ziel-Ländmarke wird als negative Entscheidung gewertet ("-").

2.4.5 IODA

Der *Idiothetic Orientation in the Dark Assay (IODA)* wurde auf der Grundlage der *Heat-Box* Experimente von Putz und Heisenberg konzipiert. Putz und Heisenberg konnten in dieser Arbeit eine idiothetische Orientierung von *Drosophila* nachweisen. Die Apparatur besteht aus einer kleinen, geschlossenen länglichen Box, auf deren Boden ein Perltierelement angebracht ist. Damit kann die Box schnell auf eine für die Fliege unangenehme Temperatur erhitzt werden. Die Fliege wird darauf trainiert, dass eine Seite der Box mit einem unangenehmen Hitzereiz gekoppelt ist; die Fliege vermeidet daraufhin diese Seite (Putz und Heisenberg 2002). In der vorliegenden Arbeit wird die Fliege in ein Kunststoffröhrchen gesetzt und die Bestrafung mittels Hitze wird durch eine Bestrafung durch Vibration von 300 Hz ersetzt. Ries konnte 2011 in ihrer Diplomarbeit nachweisen, dass *Drosophila* einem Vibrationsreiz von 300 Hz zu entfliehen versucht (Ries 2011). Das Kunststoffröhrchen ist horizontal über einem Mikroshaker aufgeschraubt. Mittels eines Frequenzgenerators wird der Mikroshaker manuell angesteuert. Über dem Versuchsaufbau ist eine Rotlichtlampe, welche Licht, in einem für *Drosophila* nicht sichtbaren Wellenlängenbereich emittiert (siehe Anhang), bzw. eine Tageslichtlampe für die Tageslichtversuche, angebracht. Um die Apparatur herum befindet sich ein blickdichter Karton (Abbildung 14). Der gesamte Versuchsaufbau befindet sich in einer mit dicken, schwarzen Stoff abgehangener Box, welche in einem fensterlosen Raum aufgebaut ist. Während des Versuchs gibt es, außer der über der Apparatur angebrachten Lampen, keine künstlichen Lichtquellen in diesen Raum.

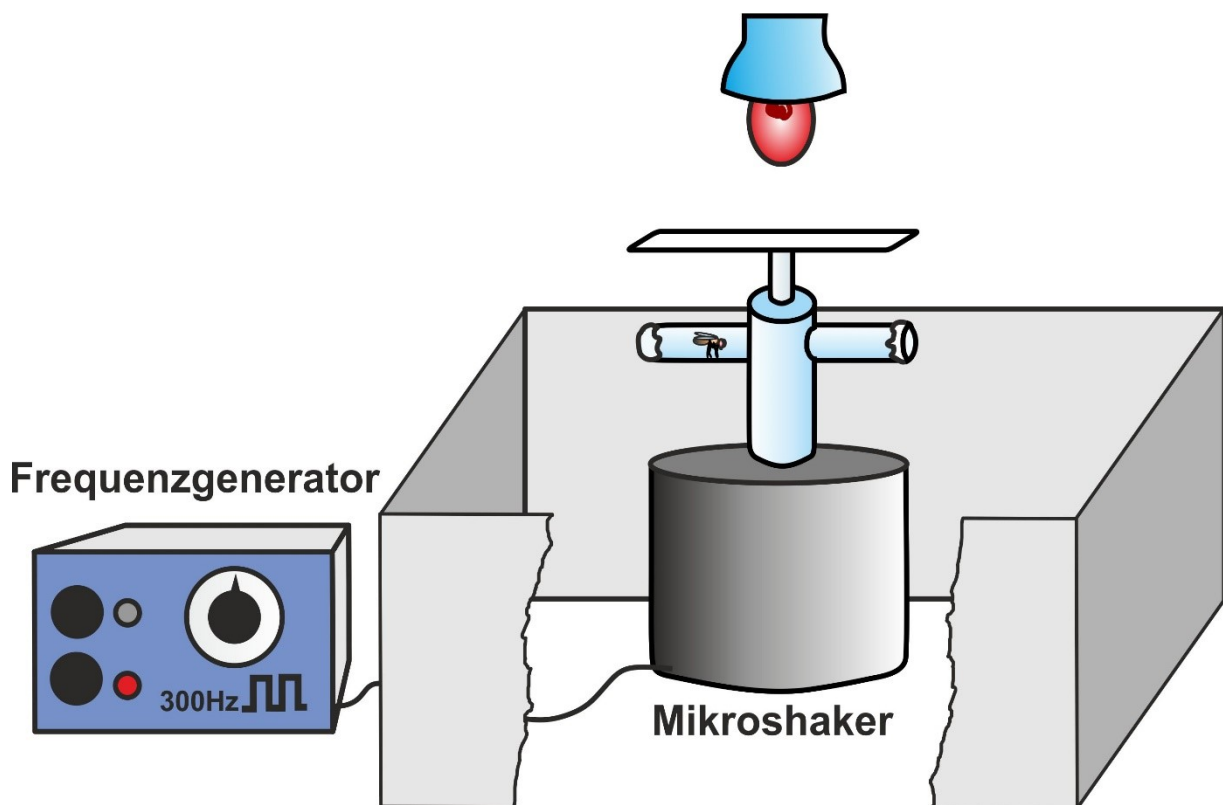


Abbildung 14: *Idiothetic Orientation in the Dark Assay* Das IODA basiert auf dem Prinzip des Heat Box Paradigmas von Putz und Heisenberg (Putz und Heisenberg, 2002). Für jede Fliege ist entweder die linke Seite des Röhrchens oder die rechte Seite mit einem Vibrationsreiz von 300 Hz während des Trainings gekoppelt. Wildtypische Tiere zeigen im anschließenden Test ohne Vibration eine signifikante Vermeidung der zuvor bestrafte Seite.

Der Versuchsdurchlauf im *IODA* besteht aus drei Abschnitten (Abbildung 15).

- Einem ein-minütigen *Vortest*, welcher dazu dient, sicherzustellen, dass die Fliege mindestens zwei Mittellinienüberquerungen in der Minute zeigt.
- Einem vier-, bzw. acht-minütigen *Training*, in welchem eine Seite der Apparatur mit einer Bestrafung mittels Vibration gekoppelt ist.
- Einem anschließenden drei-minütigen *Test*, hier findet keine Vibration statt.

Die Fliege wird mit dem Aspirator unter einer Tageslichtlampe aus dem Futterbreigläschen entnommen und sanft in das Kunststoffröhrchen gesetzt. Die Apparatur wird an beiden Enden mit Parafilm® verschlossen. Die Tageslichtlampe wird ausgeschaltet, der restliche Versuch findet nur unter der Rotlichtlampe als Lichtquelle statt. Nach ca. zehn Sekunden startet der *Vortest*. Es werden die Sekunden der Minute notiert, in der die Fliege die Mittellinie überquert. Fliegen mit weniger als zwei Überquerungen werden verworfen. Sobald die Minute des *Vortests* abgelaufen ist, startet das *Training*. Befindet sich die Fliege zu dieser Zeit noch auf der zu bestrafenden Seite, wird die Stoppuhr angehalten und gewartet, bis die Fliege wieder auf die nicht zu bestrafende Seite gewechselt hat. Die Uhr läuft weiter. So wird sichergestellt, dass die Fliege die Vibration mit ihrer Mittellinienüberquerung in Verbindung bringen kann. Überquert die Fliege während des vierminütigen *Trainings* die Mittellinie auf die bestrafte Seite, wird die Vibration manuell gestartet, bis sie wieder die Mittellinie auf die unbestrafte Seite überquert. Hier stoppt die Vibration. Die Zeiten der Mittellinienüberquerungen werden notiert. Sollte sich die Fliege nach Ablauf der letzten *Trainings*minute noch auf der vibrierten Seite befinden, wird die Stoppuhr angehalten und mit der Vibration fortgefahren, bis eine Überquerung auf die unbestrafte Seite stattfindet. Die Vibration stoppt, die Uhr läuft weiter und der drei-minütige *Test* beginnt. Hier findet keine Vibration statt. Die Zeiten der Mittellinienüberquerungen werden notiert. Abweichend zur vier-minütigen *Trainingseinheit* wurde zu Anfang der Experimente mit einer acht-minütigen *Trainingseinheit* gearbeitet (bei *CS*, *ebo*⁶⁷⁸, *norpA*^{P24}, *rut*¹, *dnc*¹). Nachdem bewiesen worden war, dass auch eine vier-minütige *Trainingseinheit* ausreichend ist, um ein idiothetisches Gedächtnis auszubilden, wurde mit dem verkürzten Training weiterverfahren. Nach jedem Versuchsdurchlauf wird die Fliege verworfen und eine neue Fliege für die nächste Versuchseinheit verwendet; die bestrafte Seite alterniert, sodass jede Seite gleichmäßig bestraft wird.

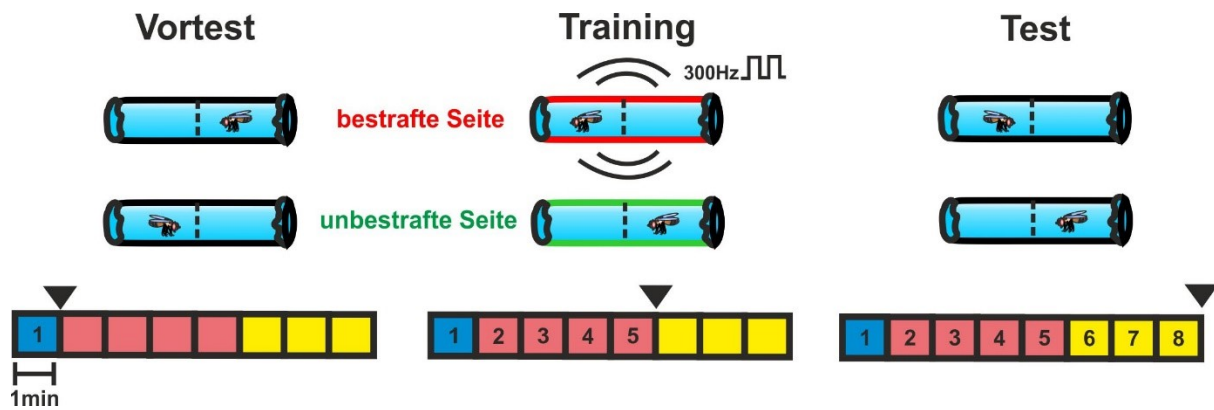


Abbildung 15: Versuchsablauf IODA. Der Versuchsablauf im IODA besteht aus einem ein-minütigen, unviбриerten Vortest (blau), einem vier-minütigen Training, in welchem die Fliege eine Bestrafung mittels Vibration auf einer Hälfte der Röhre erfährt (rot) und einem anschließenden drei-minütigen Test, in jenem ebenfalls nicht vibriert wird (gelb). Die Aufenthaltszeiten der Fliege in jeder Seite wird in jedem Abschnitt notiert.

2.5 Histologie

Zur Überprüfung der Treiberexpression wurden jungfräuliche Tiere des Stammes $w^*;;UAS-mCD8::GFP$ verwendet und mit Männchen der gewünschten Treiberlinie verkreuzt. Von den Gehirnen der F1-Generation wurden Ganzpräparate (*Whole Mounts*) angefertigt. Die fertigen *Whole Mounts* werden in Kunststoffboxen dunkel, bei 4°C aufbewahrt.

Um zu untersuchen, ob zwei verschiedenen Treiberlinien in überlappenden Bereichen exprimieren, wurden homozygote, weibliche Tiere des Genotyps $y^1w UAS-mCD8::RFP LexAop2-mCD8::GFP$ (Chr.X) mit homozygoten Männchen des GAL4-Stammes verkreuzt. Die F1-Generation trägt somit sowohl Treiber- wie auch Effektor-konstrukt. Die männlichen F1-Nachkommen wurden mit homozygoten Weibchen des LexA-Stammes verpaart. Statistisch trägt die Hälfte der weiblichen F1-Generation aus dieser Verpaarung das Effektor-konstrukt, sowie das GAL4 und das LexA-Konstrukt. Die andere Hälfte der Weibchen besitzt neben dem Effektor-konstrukt nur das LexA-Konstrukt. Das Vorhandensein beider Konstrukte kann erst nach der Anfertigung von *Whole Mounts* unter dem Laserscanningmikroskop ersehen werden.

Tabelle 2: Anfertigung von *Whole Mounts* der Fliegengehirne.

| Tag 1 | |
|--------------|---|
| | <p>Vorbereitungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 8%PFA auftauen, eine Isolierbox mit Eis füllen • Fliegen auf Eis in breifreien Fliegenglas betäuben • 1 Präparationsschälchen mit EtOH 70% (eiskalt) füllen • 1 Präparationsschälchen mit 1x PBS (eiskalt) füllen • 1 schwarzes Präparationsschälchen mit 1x PBS (eiskalt) füllen • Eppendorfgefäß mit eiskalten 1x PBS (250µl/Eppendorf) füllen |
| 1. | <p>Durchführung:</p> <p>Betäubte Fliegen wurden in eiskaltem 70% EtOH gewaschen (ca. 1 min); in eiskaltem PBS 1x gewaschen und unter dem Binokular in eiskaltem 1xPBS präpariert. Anschließend in eiskaltem Eppendorfgefäß mit 1xPBS gesammelt</p> |
| 2. | Fixation in 4%igem PFA (250µl 8%PFA+250µl 1xPBS / Eppendorfgefäß) für 15 min bei Raumtemperatur (RT) |
| 3. | 2x5min waschen mit 1xPBS (500µl/ Eppendorfgefäß) bei RT (vor jedem Waschschrift wird der Überstand abgezogen) |
| 4. | Blocken mit Pferdeserum (5% Serum in 0,2%igem PBT) (500µl/Eppendorfgefäß) [475 µl 0.2% PBT + 25µl Serum] für 20 min bei RT |
| 5. | Inkubation des primären Antikörpers (AK) (AK in 5% Pferdeserum und 0,2%igem PBT) (500µl/Eppendorfgefäß) für zwei bis drei Tage auf einem Kipp-Laborschüttler bei 4°C |
| Tag 2 | |
| 1. | 3x 20 min waschen mit 0,2%igem PBT bei RT |
| 2. | Inkubation des sekundären AK (AK in 0,2%igem PBT) (500µl/Eppendorfgefäß) für zwei bis drei Tage auf einem Kipp-Laborschüttler bei 4°C |
| Tag 3 | |
| 1. | 2x 10 min waschen in 0,2%igem PBT bei RT |
| 2. | ca. 5 min waschen in 1xPBS bei RT |
| 3. | Einen Objektträger mit Abstandhalter versehen; Gehirne kaltstellen und zügig mit einer Pipette aufsaugen und einzeln auf einen Objektträger geben. PBS mit einem Kosmetiktuch vorsichtig absaugen und etwas Mountingmedium (Vectashield®) auf das Objekt geben. Ein Deckglas (Stärke 0) darauflegen und Deckglas rundherum mit Nagellack versiegeln. Bei 4°C in einer Isolierbox dunkel aufbewahren |

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper. Verwendete Antikörper für die immunhistologischen Untersuchungen der Expressionsmuster. Angabe von Bindungsprotein des Antikörpers, verwendetes Spendertier, Verdünnung und Hersteller.

| | Antikörper | Tier | Verdünnung | Firma |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------------|--------------------------|
| primäre Antikörper | α -GFP | Huhn | 1:1000 | Aves #GFP697986 |
| | α -mCherry | Ziege | 1:1000 | Sicgen #0081221018 |
| | α -FASII | Maus | 1:100 | DSHB |
| sekundäre Antikörper | α -chicken Alexa 488 | Esel | 1:1000 | Sigma |
| | α -goat Cy3 | Esel | 1:1000 | Dianova |
| | α -mouse Cy3 | Esel | 1:1000 | Jackson Lab #715-165-150 |
| | α -mouse Cy5 | Esel | 1:1000 | Dianova |

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Lösungen. Herstellung der verwendeten Stammlösungen

| | |
|-------------------------|---|
| PBS | 130mM NaCl |
| | 7mM Na ₂ PO ₄ *2H ₂ O |
| | 3mM Na ₂ PO ₄ *H ₂ O |
| 8% PFA (10ml) | 0.8g Paraformaldehyd auf Katalogpapier |
| | 8ml ddH ₂ O |
| | 100 μ l 1N NaOH |
| | 60°C Wasserbad 1/2h |
| | 100 μ l 1N HCl |
| | 1ml 10x PBS |
| | mit ddH ₂ O auf 10ml auffüllen |
| | bei -18°C lagern |
| 45ml ddH ₂ O | |
| 0,2% PBT (50ml) | 1ml 0,1% Triton X (10% Stammlösung in ddH ₂ O) |
| | 49ml 10x PBS |

Von den Präparaten wurden anschließend mit einem Laserscanningmikroskop (Leica TCS SP8) und dem Programm *LAS AF* Aufnahmen erstellt. Um die Präparate einzuscannen, wurden ein Bildformat von 1024x1024 und eine Frequenz von 600 Hz verwendet. Es wurde sequenziell gescannt mit einer Scanwiederholung von zwei. Für das 20x Objektiv wurde eine Schichtdicke von 0,75 μ m und für das 63x Objektiv 0,75 μ m, bzw. 0,33 μ m gewählt. Die erhaltenen Bilder wurden anschließend mit dem Programmen *Fiji ImageJ V5* und *CorelDRAW X7 V5* bearbeitet.

2.6 Statistik

Die Rohdatenerfassung erfolgte mit dem Programm *Microsoft Office Excel 2013*, die zu berechnenden Daten wurden in ein separates Datenblatt übertragen und im Format *.csv* (Trennzeichen getrennt) abgespeichert. Diese Dateien wurden in das Statistikprogramm *RStudio V5 3.5.0* eingelesen. Alle statistischen Auswertungen wurden mit *RStudio* und den Basispaketen durchgeführt. Zusätzlich wurde für die Auswertung mittels des *Vorzeichentests* (SIGN Tests) das Paket *BSDA* verwendet. Mit dem *Shapiro-Wilk* Test wurde die Verteilung der Daten überprüft, das Signifikanzniveau liegt bei $\alpha = 0,05$. Für Datensätze für die $p \geq 0,05$ gilt, wurde eine Normalverteilung angenommen, ist $p < 0,05$ so wurden die Daten als nicht normalverteilt angesehen. Normalverteilte metrische Datensätze wurden mit dem *Ein-Stichproben t-Test* (one sample t-test) gegen ein Zufallsniveau, oder mit dem *gepaarten t-Test* (paired t-test) für zwei gepaarte Daten und dem *Welch zwei-Stichproben t-Test* (Welch two-sample t-test) für zwei ungepaarte Datensätze gegeneinander getestet. Waren die metrischen Datensätze nicht normalverteilt, wurde der *Wilcoxon Vorzeichen-Rangtest* (Wilcoxon signed rank test) gegen ein Zufallsniveau verwendet. Sollten zwei ungepaarte, nicht normalverteilte Datensätze miteinander verglichen werden, wurde der *Wilcoxon Rangsummentest* (Wilcoxon rank sum test), für zwei gepaarte, nicht normalverteilte Datensätze ebenfalls der *Wilcoxon Vorzeichen-Rangtest* verwendet. Gegebenenfalls wurde die *Bonferroni-Methode* als Korrekturverfahren angewendet. Zusätzlich wurde für die Auswertung der Daten aus dem *Detour* Experiment der *Vorzeichentest* verwendet. Die Durchführung dieses Tests erfolgte aufgrund der Verwendung dieses Tests für dieses Paradigma in vorausgegangenen Arbeiten (Kuntz et al. 2017; Kuntz et al. 2012), damit sind die Daten stets vergleichbar. Aufgrund der Tatsache, dass die Datensätze aus diesem Experiment sowohl metrische, als auch kategoriale Eigenschaften besitzen, war es hier legitim, einen Test für kategoriale Daten anzuwenden.

Für die graphische Darstellung der Datensätze mit den jeweiligen Testergebnissen wurden *Boxplots* verwendet. Hierbei beschreiben die Boxen das erste Quartil (25% Perzentil) bis dritte Quartil (75% Perzentil) mit dem Median innerhalb, die Fehlerbalken den 1,5fachen Interquartilsabstand (1,5 IQR), Kreise außerhalb der Box geben die Ausreißer an. Die horizontale, gestrichelte Linie zeigt das Zufallsniveau an. Signifikante Unterschiede der dargestellten Datensätze zum Zufallsniveau, bzw. zu einem weiteren Datensatz sind mit Signifikanzsternen gekennzeichnet. Hierbei gilt: $p \geq 0,05$ = nicht signifikant; n.s.; $p < 0,05$ = * signifikant unterschiedlich; $p < 0,01$ = ** hoch signifikant unterschiedlich; $p < 0,001$ = *** höchst signifikant unterschiedlich.

Im *Buridan* Paradigma wurden die absoluten medianen Fehlerwinkel der experimentellen Gruppe und Kontrollgruppen mit jenen des Wildtyps CS verglichen. Für das *Persistenz* Paradigma wurden die zurückgelegten vektoriellen Strecken der Treiberkontrolle mit der entsprechenden experimentellen Gruppe verglichen. Im *Detour* Experiment wurde die Anzahl der korrekten Entscheidungen der einzelnen Gruppen gegen das Zufallsniveau von 58% getestet. Im *IODA* wurden die Zeiten, die sich die Tiere auf der unbestraften Seite aufgehalten haben, für die Auswertung verwendet. Dabei wurden jeweils die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in Sekunden der letzten beiden Trainingsminuten, bzw. der letzten beiden Testminuten addiert und gegen das Zufallsniveau von 60s getestet. Zusätzlich wurde die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten gegen die Aufenthaltsdauer in den letzten beiden Testminuten getestet. Bei allen Tests liegt das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Gibt es eine Magnetfeldorientierung bei *Drosophila*?

Basierend auf Gegears Forschungsergebnissen sollte diese besondere Orientierungsform in meiner Arbeit, bezüglich des Sitzes des Magnetrezeptors und die darin eingebundene photochemische Transduktionskaskade, weiter untersucht werden. Hierzu wurde eine ähnliche, zu der in Gegears Arbeiten benutzten, Apparatur entwickelt (siehe Anhang).

Die von Gear verwendete Formel zur Berechnung des Präferenzindex (PI) wies eine kleine, aber entscheidende Unkorrektheit auf. Der PI wurde von Gear folgend berechnet (Originalterm aus Nature (Gear et al. 2008)):

$$PI_{\text{Gear}} = (P_M - 0,5) / [(P_M + 0,5) - (2P_M * 0,5)]$$

Wobei P_M den Verhältnisanteil der Fliegen auf der Magnetfeldseite darstellt:

$$P_M = \text{Anzahl der Fliegen auf Magnetfeldseite} / \text{Gesamtzahl der Fliegen}$$

Nach Kürzen ergibt sich der Index zwischen -1,0 und 1,0 zu:

$$PI_{\text{Gear}} = 2P_M - 1$$

Diese Formel soll darstellen, ob die Fliegen sich für die Magnetfeldseite (positiver PI), oder gegen die Magnetfeldseite (negativer PI) entscheiden. Jedoch wird in Gegears Formel vernachlässigt, dass sich die Tiere nicht nur für oder gegen die Magnetfeldseite entscheiden, sondern auch KEINE Entscheidung treffen können, d.h. im würfelförmigen Mittelstück verbleiben. Das hat zur Folge, dass diese Tiere ohne Entscheidung in Gegears Formel wie Tiere behandelt werden, die sich GEGEN die Magnetfeldseite entschieden haben.

Wir hingegen verwendeten eine Formel zur Berechnung des PI, welche das Verhältnis zwischen den Tieren, die sich für die Magnetfeldseite, und jenen, welche sich dagegen entschieden haben, abbildet:

$$PI_{\text{Mendel}} = (P^+ - P^0) / P_{\text{Gesamt}}$$

Hier beschreibt P^+ die Zahl der Tiere auf der Magnetfeldseite, P^0 die Zahl der Tiere auf der magnetfeldfreien Seite und P_{Gesamt} die Gesamtzahl der Tiere in der Versuchsanordnung.

Nachdem sich jedoch keine eindeutige Orientierungsfähigkeit der Tiere in unserem Versuchsaufbau zeigte (siehe Anhang), simulierten wir Gegears Experiment (Abbildung 9) mit zwei verschiedenen Wildtypstämmen, jedoch ohne aktiviertes, künstliches Magnetfeld (Abbildung 16). Ebenso wurden die Daten sowohl mit der von Gear verwendeten Formel (PI_{Gear}), als auch der von uns verwendeten Formel (PI_{Mendel}) berechnet. Nach Berechnung der Daten mit PI_{Gear} (Tabelle 6) stellte sich heraus, dass eine Wildtypgruppe, Wildtyp *Canton Spezial* (CS) im naiven Versuch, also im Test auf Spontanpräferenz das „Magnetfeld“ vermied, obwohl kein Magnetfeld vorhanden war ($p = 0,02924$; $t = -2,358$; $N = 20$; $n = 653$). Ein

Trainingseffekt, also eine Hinwendung in das Magnetfeld nach Zuckerbelohnung wurde nicht beobachtet ($p= 0,4726$; $t= -0,73281$) (Abbildung 16, B). Berechnete man denselben Datensatz mit der von uns verwendeten Formel PI_{Mendel} (Tabelle 5), so verschwindet die „Vermeidungsreaktion“ der Tiere auf das „Magnetfeld“ im naiven Versuch ($p= 0,4019$; $t= -0,8574$), und eine Hinwendung zum „Magnetfeld“ nach dem Training konnte auch nicht beobachtet werden ($p= 0,8322$; $t= 0,21483$) (Abbildung 16, A). *Wildtyp Berlin* (WTB) zeigte mit keiner der beiden Berechnungen eine naive Vermeidung des imaginären Magnetfeldes, jedoch eine signifikante Hinwendung zum „Magnetfeld“ nach dem Training über die Berechnung mit PI_{Mendel} ($p= 1,16e^{-03}$; $t= 3,8171$; $N=20$, $n=599$) (Tabelle 5, Abbildung 16, A) und mit einem grenzwertig nicht signifikanten p-Wert über die Berechnung mit PI_{Gegear} ($p= 0,0595$; $t= 2,0043$) (Tabelle 6). Somit ist anzunehmen, dass die Spontanvermeidung des Magnetfeldes in Gegears Experimenten eher auf einem statistischen Effekt beruht, als auf einer aktiven Vermeidung von magnetischen Feldern. Zusätzlich wurden in meinen Versuchen auch lediglich zwischen 596-730 Fliegen in Gruppen von 6-25 Tieren getestet; dagegen waren es in Gegears Versuchen weit über 1000 Tiere, welche gruppenweise getestet wurden. Würde die Anzahl der verwendeten Fliegen in meinem Experiment auf die in Gegears Experimenten benutzte Anzahl der Tiere erhöht werden, könnte wahrscheinlich auch ein deutliches „Vermeidungsverhalten“ der naiven Tiere, wie auch ein Trainingseffekt bei CS beobachtet werden, unter Berechnung mit PI_{Gegear} . Basierend auf diesen Erkenntnissen war es naheliegend, dass sich die Tiere im Training einfach die Seite der Zuckerbelohnung gemerkt hatten und diese nach dem Training aufgesucht haben, unabhängig davon, ob ihnen ein künstliches Magnetfeld die korrekte Seite markieren sollte.

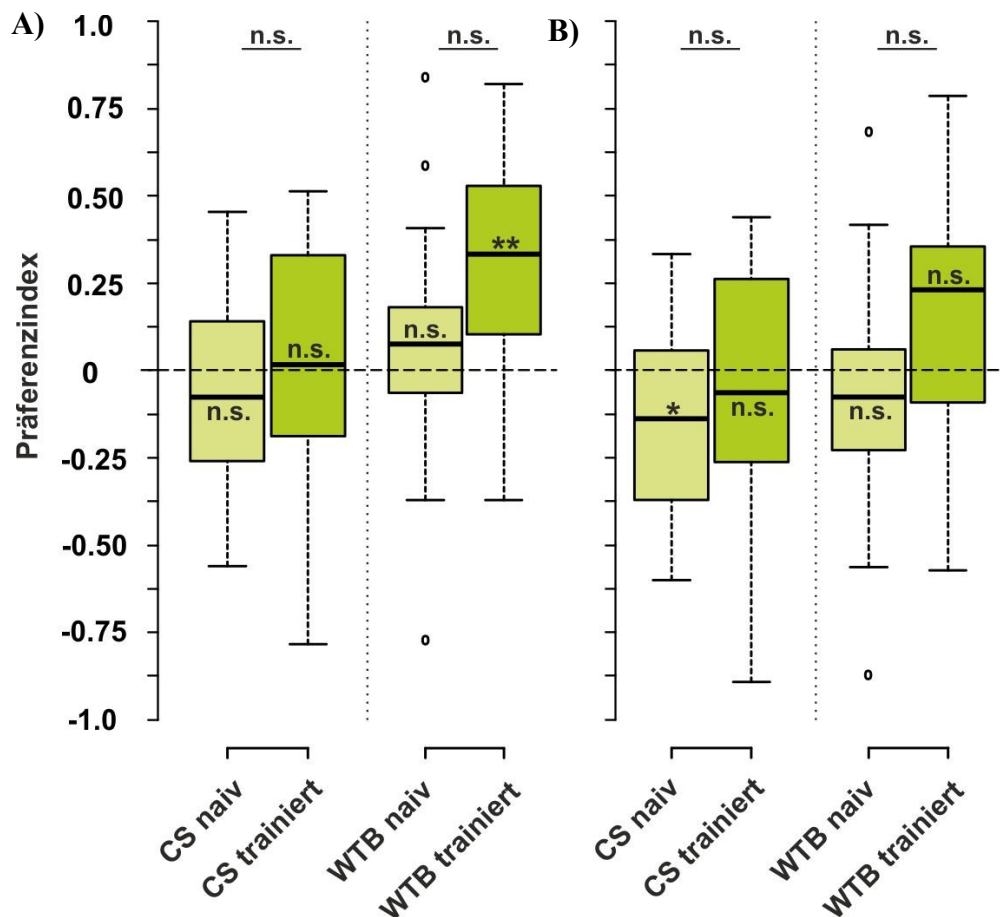


Abbildung 16: Seitenpräferenz von CS und WTB bei Versuchsdurchführung gemäß Gegear, jedoch ohne künstliches Magnetfeld. Dieselben Datensätze von CS und WTB wurden jeweils mit PI_{Mendel} (A) und PI_{Gegear} (B) berechnet. Ein negativer PI zeigt eine Abwendung von der „Magnetfeldseite“, ein positiver PI eine Hinwendung. Für die statistische Auswertung wurden die PIs gegen das Zufallsniveau von 0, sowie untereinander als Paarvergleich getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *; $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. $N_{naiv} = 20$; $n_{naiv} = 653$ (CS), 599 (WTB); $N_{trainiert} = 20$; $n_{trainiert} = 730$ (CS), 596 (WTB).

Tabelle 5: Seitenpräferenz ohne künstliches Magnetfeld berechnet mit PI_{Mendel} . Statistische Werte der Wildtypstämme *Canton Spezial* und *Wildtyp Berlin* bei Versuchsdurchführung nach Gegear et al., 2008 ohne künstliches Magnetfeld. $PI = PI_{Mendel} = (P^+ - P^0) / P_{Gesamt}$. PI_{naiv} = Spontanpräferenz ohne Training, $PI_{trainiert}$ = Präferenz nach Zuckerbelohnung, $N_{naiv} = 20$; $n_{naiv} = 653$ (CS), 599 (WTB); $N_{trainiert} = 20$; $n_{trainiert} = 730$ (CS), 596 (WTB); $p =$ Signifikanzniveau; t-Test ($t =$ Abweichung der Mittelwerte); Daten aus Abbildung 16.

| Genotyp | PI_{naiv} gegen 0 | | $PI_{trainiert}$ gegen 0 | | PI_{naiv} gegen $PI_{trainiert}$ | |
|-----------------------|---------------------|---------|--------------------------|---------|------------------------------------|---------|
| | p | t | p | t | p | t |
| <i>Canton Spezial</i> | 0,4019 | -0,8574 | 0,8322 | 0,21483 | 0,5033 | -0,6763 |
| <i>Wildtyp Berlin</i> | 0,4575 | 0,75842 | $1,16e^{-03}$ | 3,8171 | 0,4903 | -2,0339 |

Tabelle 6: Seitenpräferenz ohne künstliches Magnetfeld berechnet mit PI_{Gegear} . Statistische Werte der Wildtypstämme *Canton Spezial* und *Wildtyp Berlin* bei Versuchsdurchführung nach Gegear et al., 2008, jedoch ohne künstliches Magnetfeld. $PI = PI_{\text{Gegear}} = (P_{M-0,5}) / [(P_{M+0,5}) - (2P_{M*0,5})]$; PM = Anzahl der Fliegen auf Magnetfeldseite / Gesamtzahl der Fliegen. PI_{naiv} = Spontanpräferenz ohne Training, $PI_{\text{trainiert}}$ = Präferenz nach Zuckerbelohnung, $N_{\text{naiv}} = 20$; $n_{\text{naiv}} = 653$ (CS), 599 (WTB); $N_{\text{trainiert}} = 20$; $n_{\text{trainiert}} = 730$ (CS), 596 (WTB). p = Signifikanzniveau; t -Test (t = Abweichung der Mittelwerte); Daten aus Abbildung 16.

| Genotyp | PI_{naiv} gegen 0 | | $PI_{\text{trainiert}}$ gegen 0 | | PI_{naiv} gegen $PI_{\text{trainiert}}$ | |
|-----------------------|----------------------------|----------|---------------------------------|----------|--|----------|
| | p | t | p | t | p | t |
| <i>Canton Spezial</i> | 0,02924 | -2,358 | 0,4726 | -0,7328 | 0,1381 | -1,5155 |
| <i>Wildtyp Berlin</i> | 0,3038 | -1,057 | 0,0595 | 2,0043 | 0,5634 | -0,5845 |

Hieraus stellte sich die Frage, wenn die Tiere sich nicht an magnetischen Feldern orientiert haben, welche Orientierungsstrategie sie zum Auffinden des korrekten Röhrchens benutzt hatten. Das Erdmagnetfeld wurde als Orientierungsmöglichkeit ebenfalls ausgeschlossen (siehe Abbildung 17). Von Ameisen ist bekannt, dass sie mittels Vektorberechnung den direkten Weg zurück zum Nest einnehmen können, obwohl sie sich über einen anderen Weg von ihm entfernt haben (Collett et al. 2013). Wäre es möglich, dass *Drosophila* diese Fähigkeit der Vektoraddition ebenfalls besitzt? Um das zu überprüfen, entwickelte ich eine Apparatur, in welcher die Fliegen einzeln darauf trainiert werden konnten, eine durch Vibration bestrafte Seite zu vermeiden (*IODA*). Das Prinzip des Versuchsaufbaus wurde von einem Experiment übernommen, in welchem die Tiere die Wahl zwischen zwei unterschiedlich gefärbten Röhrchen hatten, wobei eine Farbe immer mit einer unangenehmen Vibration bestraft wurden (Farbvibrationsparadigma, A. Ries, Arbeitsgruppe Strauß, unpublished) und in Anlehnung an die *Heat-Box* von Putz und Heisenberg entwickelt worden war (Putz und Heisenberg 2002).

3.2 Idiothetische Orientierung beim Wildtyp *Canton Spezial*

Wustmann und Heisenberg konnten 1996 mit Hilfe der *Heat Box* zeigen, dass sich *Drosophila* in einer geschlossenen Box nach jener Hälfte orientieren konnte, welche nicht mittels eines Hitzereizes bestraft wurde (Wustmann et al. 1996). Die Vermutung lag nahe, dass die Fliege, ähnlich der Wüstenameise, das Mittel der Pfadintegration zur idiothetischen Orientierung ohne visuelle Orientierungspunkte verwendet. Zur Untersuchung dieser Orientierungsform im *IODA* bei *Drosophila melanogaster* wurde der Wildtyp *Canton Spezial* (CS) gewählt, da jener eine rasche Reaktionszeit im *Schnellen Phototaxis* Paradigma aufweist (Benzer 1967), Überdies zeigte dieser Wildtyp ein ausgezeichnetes Orientierungsvermögen in der *Heat Box* (Wustmann et al. 1996).

Zu Beginn wurde der Versuchsdurchlauf in einen dreiminütigen Vortest ohne Bestrafung, eine achtminütige Trainingsphase, in welcher jeweils der Aufenthalt auf einer Seite bestraft wurde und eine anschließende, dreiminütige Testphase ohne Bestrafung eingeteilt. Es wurden ausschließlich männliche Tiere getestet, da weibliche Tiere während des Trainings eine verminderte Aktivität aufwiesen und somit die für den Versuch notwendige Anzahl von Mittellinienüberquerungen (> zwei) während des Vortests nicht erreichten.

Die erste Gruppe wildtypischer Fliegen wurde unter künstlichem Licht getestet, welches das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts abdeckt. Nach der achtminütigen Trainingsphase

zeigten die Tiere in den letzten beiden Testminuten eine höchst signifikante Seitenpräferenz für die zuvor unbestrafte Seite ($p=1,15e^{-05}$; $t=5,4086$; $n=27$). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den letzten beiden Trainings- und Testminuten ($p=0,267$; $t=1,1343$). Wird der Versuch unter Rotlichtbedingungen durchgeführt, ist *Drosophila* ebenfalls in der Lage, die bestrafte Seite in den letzten beiden Trainings- ($p= 2,26e^{-04}$; $W=300$; $n=25$) und Testminuten ($p= 5,20e^{-05}$; $t= 4,9118$) zu vermeiden, wobei jedoch die Aufenthaltsdauer im unbestraften Arm in den letzten beiden Testminuten gegenüber den letzten beiden Trainingsminuten signifikant kürzer ist ($p= 3,07e^{-03}$; $V= 254$) (Abbildung 17).

Nachfolgend wurde untersucht, ob eine auf vier Minuten verkürzte Trainingsphase für die Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses ausreichend ist. Unter Tageslichtbedingungen zeigte *Drosophila* eine höchst signifikante Vermeidung der bestrafte Seite in den letzten beiden Minuten des Trainings ($p= 2,11e^{-07}$; $t= 7,3991$; $n=23$), sowie auch in den beiden letzten beiden Testminuten ($p= 1,12e^{-06}$; $t= 6,6406$). Es besteht kein Unterschied zwischen der Aufenthaltsdauer in den letzten beiden Minuten des Trainings und des Tests ($p= 0,5672$; $t= 0,5809$). Wird der verkürzte Versuchsdurchlauf unter Rotlichtbedingungen durchgeführt, so ist die Fliege ebenfalls in der Lage, sowohl während der letzten beiden Trainingsminuten ($p= 2,20e^{-16}$; $t= 13,543$; $n= 44$), als auch in den letzten beiden Testminuten ($p= 3,40e^{-06}$; $t=5,3308$) die unbestrafte Seite zu bevorzugen, wobei die sich Aufenthaltsdauer in der unbestraften zwischen Trainings- und Testphase unterscheiden ($p= 2,55e^{-04}$; $t= 3,9875$) (Abbildung 17).

Um eine Orientierung nach dem Erdmagnetfeld auszuschließen, wurde der Versuchsablauf wie folgt modifiziert. Nach der vierminütigen Trainingsphase wurde das Trainingsröhrchen auf dem Mikroschaker um 90° horizontal gedreht. Danach wurde mit der Testphase fortgefahren. Trotz veränderter Ausrichtung (90° zur ursprünglichen Erdmagnetfeldausrichtung) des Versuchsröhrchens, zeigten die Tiere in den letzten beiden Testminuten eine höchst signifikant längere Aufenthaltsdauer in der zuvor unbestraften Seite ($p= 2,49e^{-07}$; $t=7,7877$; $n=20$), zwischen Trainings- und Testphase ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p=0,1392$; $t=1,5434$). Wird der Fliege aber nach dem Training die Möglichkeit der Vektoraddition genommen, indem nach der Trainingsphase das Röhrchen manuell zwei- bis dreimal horizontal gedreht wird, sodass die Fliege auf den Rücken fällt und einige Male um die eigene Achse rotiert wird. Sie zeigt sie in der anschließenden Testphase keine Vermeidung der zuvor bestrafte Seite ($p= 0,08049$; $t=-1,8284$; $n=24$). Trainings- und Testphase unterscheiden sich höchst signifikant voneinander ($p=1,11e^{-06}$; $t=6,5594$) (Abbildung 17).

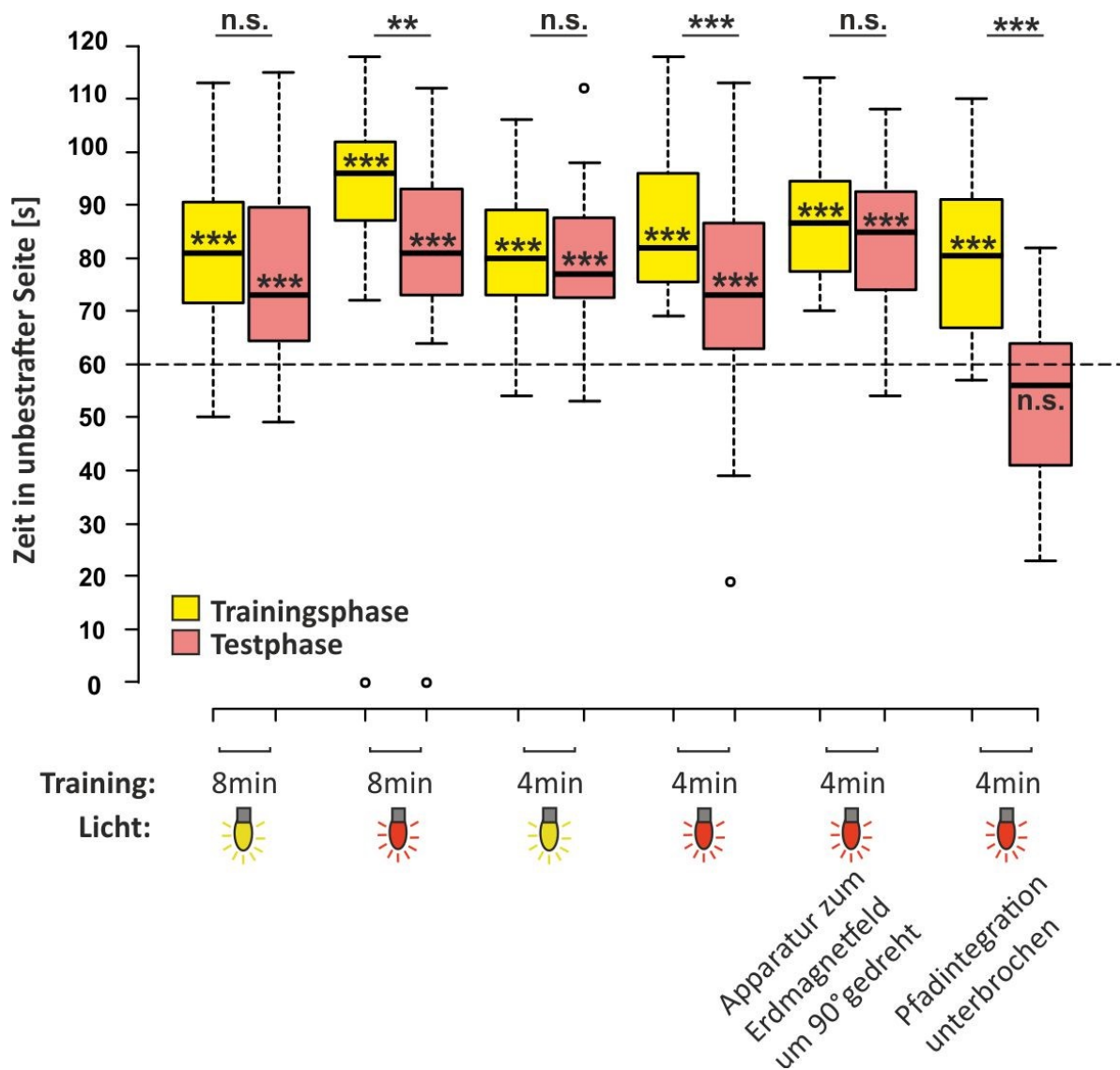










Abbildung 17: Idiothetische Orientierung im *IODA* von Wildtyp *Canton Spezial*. Die Orientierung, wie auch das Orientierungsgedächtnis bei CS im *IODA* ist unabhängig von sichtbarem Licht und dem Erdmagnetfeld. Jedoch ist es der Fliege nicht mehr möglich, sich im Paradigma zu orientieren, sobald die Pfadintegration nach dem Training unterbrochen wird. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere. n= siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: Statistische Werte des Wildtyps *Canton Spezial* im *IODA* unter verschiedenen Versuchsbedingungen aus Abbildung 17. n= Anzahl der getesteten Tiere; p= Signifikanzniveau; t- Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten);  Tageslicht;  Rotlicht.

| Genotyp CS | | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|---|---|-----------------------------|--------|-----|------------------------|---------|---|-----------------------------------|--------|-----|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| 8 min Training n= 27 |  | 1,23e ⁻⁰⁷ | 7,1893 | | 1,15e ⁻⁰⁵ | 5,4086 | | 0,267 | 1,1343 | |
| 8 min Training n= 25 |  | 2,26e ⁻⁰⁴ | | 300 | 5,20e ⁻⁰⁵ | 4,9118 | | 3,07e ⁻⁰³ | | 254 |
| 4 min Training n= 23 |  | 2,11e ⁻⁰⁷ | 7,3991 | | 1,12e ⁻⁰⁶ | 6,6406 | | 0,5672 | 0,5809 | |
| 4 min Training n= 44 |  | 2,20e ⁻¹⁶ | 13,543 | | 3,40e ⁻⁰⁶ | 5,3308 | | 2,55e ⁻⁰⁴ | 3,9875 | |
| Magnetfeld 90° gedreht n= 20 |  | 4,20e ⁻⁰⁹ | 10,414 | | 2,49e ⁻⁰⁷ | 7,7877 | | 0,1392 | 1,5434 | |
| Pfad- integration unterbrochen n= 24 |  | 5,03e ⁻⁰⁷ | 6,8904 | | 0,08049 | -1,8284 | | 1,11e ⁻⁰⁶ | 6,5594 | |

3.3 Idiothetische Orientierung im *IODA* bei klassischen Lernmutanten, blinden Fliegen und Mutanten der inneren Uhr

Zur Untersuchung der Bedeutung von Genprodukten, welche im Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis stehen, wurden die Mutanten *rutabaga*¹ (*rut*¹), *dunce*¹ (*dnc*¹), *ignorant*^{58/1} (*ign*^{58/1}), *amnesiac*¹ (*amn*¹), *radish*¹ (*rad*¹), *ellipsoid-body-open*⁶⁷⁸ (*ebo*⁶⁷⁸), sowie ein blinder Fliegenstamm *no receptor potential A* (*norPA*^{P24}) verwendet und Tiere, welche für jeweils eine Komponente der inneren Uhr mutant sind: *cryptochrom*⁰¹ (*cry*⁰¹), sowie *period*⁰¹ (*per*⁰¹).

rutabaga (*rut*) codiert für eine Ca²⁺ /Calmodulin-abhängige *Adenylyzyklase* (AC), welche cAMP aus Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) herstellt. Tiere, welche mutant für die AC sind, besitzen einen reduzierten cAMP-Spiegel (Davis 2005). Im *IODA* zeigen *rut*¹ Tiere eine Vermeidung der bestrafte Seite in der Trainingsphase (p= 1,60e⁻⁰⁴; W= 262,5; n= 23), jedoch gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Aufenthaltsdauer in der bestrafte und unbestrafte Seite in den letzten beiden Testminuten (p= 0,7033; t=-0,3858). Auch unterscheidet sich die Aufenthaltsdauer in der unbestrafte Seite in den letzten beiden Testminuten höchst signifikant von den letzten beiden Trainingsminuten (p= 5,87e⁻⁰⁴; V= 251,5) (Abbildung 18).

Fliegen des Stammes *dnc*¹ sind defizient für das Enzym *Phosphodiesterase* (PDA), welches von *dunce* codiert wird und cAMP in 5'-AMP spaltet (Davis 2005). Die Tiere zeigen im *IODA* eine Vermeidung der bestrafte Seite in der Trainingsphase (p= 3,09e⁻⁰⁶; t= 6,288; n= 22), aber nicht in den letzten beiden Minuten der Testphase (p=0,4486; t= 0,77215). Die Aufenthaltsdauer in der unbestrafte Seite unterscheidet sich in den letzten beiden Minuten des Trainings hoch signifikant von den letzten beiden Testminuten (p= 1,37e⁻⁰³; t= 3,687) (Abbildung 18).

Bei dem Stamm *ign*^{58/1} wurde vor der Verhaltensanalyse durch eine einmalige *Cantonisierung* der genetische Hintergrund ausgetauscht, nur das Chromosom mit dem mutanten *ign*^{58/1} Allel bleibt erhalten, die restlichen Chromosome sind dadurch wildtypischer Natur (de Belle and Heisenberg 1996). Bevor die männlichen Tiere der F1-Generation im *IODA* getestet wurden, ist der *ign*-Phänotyp im *Detour*-Paradigma überprüft worden. Nach Neuser et al. zeigen *ign*^{58/1} einen Verlust des Orientierungsvermögens im *Detour*-Paradigma nach der Ablenkung (Neuser et al. 2008). Die F1-Generation der cantonisierten *ign*^{58/1} Fliegen zeigten im *Detour* keine Orientierung zu der zuvor gezeigten Landmarke ($p=0,7539$; $s=4$; $n=10$; $N=10$; s = Anzahl positiver Entscheidungen). Nachdem somit sichergestellt war, dass die Tiere einen mutanten Phänotyp aufwiesen, wurden sie im *IODA* getestet. Die Tiere zeigten eine signifikant längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Minuten des Trainings ($p=1,38e^{-06}$; $t=6,5479$; $n=23$), sowie in den letzten beiden Testminuten ($p=2,31e^{-03}$; $t=3,4457$), wobei die Aufenthaltsdauer in den letzten beiden Minuten des Trainings kürzer ist als in den letzten beiden Minuten des Trainings ($p=0,02429$; $t=2,4188$) (Abbildung 18).

Die Mutante *radish* besitzt ein defizientes Anästhesie-resistentes Gedächtnis, eine Form des Langzeitgedächtnisses (Folkers et al. 2006). Im *IODA* zeigen *rad*¹ Fliegen eine Orientierung in die unbestrafte Seite in den letzten beiden Minuten des Trainings ($p=2,36e^{-04}$; $t=4,3483$, $n=24$), sowie auch in den letzten beiden Minuten des Tests ($p=0,04516$; $t=-2,1184$), jedoch ist die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den beiden Testminuten signifikant kürzer verglichen mit den letzten beiden Minuten des Trainings ($p=1,24e^{-04}$; $t=4,6057$) (Abbildung 18).

Das *amnesiac* Neuropeptid wird hauptsächlich in den dorsal gepaarten medialen Neuronen (DPN) des Pilzkörpers exprimiert und erhöht als Suppressor der Phosphodiesterase den cAMP Spiegel der Zelle (Waddell und Quinn 2001) *amn*¹ Fliegen zeigen Beeinträchtigungen im olfaktorischen, assoziativen Lernen (Waddell und Quinn 2001; Quinn et al. 1979). Im *IODA* besitzen *amn*¹ Tiere unter Licht des sichtbaren Spektrums ein idiothetisches Orientierungsvermögen sowohl in der Trainingsphase ($p=9,13e^{-04}$; $W=247,5$; $n=23$), als auch eine längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Minuten des Tests ($p=0,01652$; $t=2,5953$). Dennoch ist die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Testminuten signifikant kürzer als in den letzten beiden Minuten des Trainings ($p=0,02839$; $V=194,5$) (Abbildung 18).

Unter Rotlichtbedingungen können sich die Tiere in der Trainingsphase zwar orientieren ($p=8,63e^{-05}$; $t=4,7125$; $n=25$), besitzen aber kein idiothetisches Orientierungsvermögen im anschließenden Test ($p=0,2443$; $t=1,1936$). Die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite im Test unterscheidet sich höchst signifikant von jener des Trainings ($p=4,34e^{-04}$; $t=4,0768$).

Das Gen *ellipsoid body open* (*ebo*) codiert für *Exportin6*, welches für den Transport von Aktin aus dem Nucleus zuständig ist. Tiere, die mutant für dieses Protein sind, zeigen einen Verlust des visuellen Arbeitsgedächtnisses. Thran et al. et al. konnten 2015 zeigen, dass ein Verlust der Funktionalität von *ebo* zu einer Inhibition von *Drosophila Serum Response Factor* (dSRF) und *Drosophila Myocardin-related transcription factor* (dMRTF) führt. Ohne die transkriptionelle Kontrolle dieser beiden Proteine findet keine Expression der von *Cbs* codierten, H₂S synthetisierenden *Cystathionin-β-Synthase* statt. Das diffusible Gas H₂S sorgt für eine Erhöhung des cGMP-Spiegels in der Zelle und nachfolgend für die Aktivierung der nachgeschalteten Proteine *for* PKG und die *ign* RSKII (Thran 2013).

Im *IODA* wurden hemizygoten Tiere der Linie *ebo*⁶⁷⁸ getestet. Es war nicht möglich, einen kompletten Versuchsdurchlauf durchzuführen, da die Tiere unter Rotlichtbedingungen ein so stark reduziertes Laufverhalten zeigten, dass keine Konditionierung erfolgen konnte. Folgend wurde der Versuch mit Fliegen durchgeführt, die sich im *ebo*⁶⁷⁸-mutanten Hintergrund befanden, aber zusätzlich ein UAS-*ebo* Transgen trugen. Im Falle eines mutanten Phänotyps dieser Linie hätten nachfolgend Rettungsexperimente mit Hilfe dieser Effektorlinie durchgeführt werden können. In den letzten beiden Minuten des Trainings zeigten die Tiere keine längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ($p=0,3982$; $t=-0,8609$, $n=24$). Auch im anschließenden Test wurde keine Bevorzugung der unbestraften Seite beobachtet ($p=0,5546$; $t=0,59968$). Es zeigte sich kein Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite zwischen Trainings- und Testphase ($p=0,733$; $t=0,34529$). Da die Tiere in der Trainingsphase nicht in der Lage waren, die bestrafte Seite zu vermeiden, konnte folgend auch kein idiothetisches Orientierungsgedächtnis ausgebildet werden. (Abbildung 18).

Das photosensitive Protein Cryptochrom (CRY) steht seit einiger Zeit im Fokus der Diskussionen im Zusammenhang mit der Magnetotaxis. CRY soll dabei nach Photoextinktion durch Beeinflussung über externe magnetische Felder die relative Lage des Organismus im magnetischen Feld codieren (siehe Kapitel 1.5 Neue Aufgaben für Cryptochrom). Da aber im nachgestellten Versuch von Gegear mit wildtypischen Fliegen, jedoch ohne angelegtes Magnetfeld (siehe Kapitel 3.1 Gibt es eine Magnetfeldorientierung bei *Drosophila*?), die Vermutung aufkam, wildtypische Fliegen orientieren sich eher idiothetisch, statt nach magnetischen Feldern, stand die Frage nach der Rolle von CRY in der idiothetischen Orientierung im Raum, da *cry*-mutante Tiere in Gegears Experimenten einen Verlust der „Magnetotaxis“ aufwiesen. Ob CRY in die nicht-visuelle Orientierung eingebunden ist, sollte mit der Mutante *cry*⁰¹ untersucht werden.

Fliegen des Stamms *cry*⁰¹ zeigten im *IODA* in der Trainingsphase eine Fähigkeit zur idiothetischen Orientierung ($p=1,89e^{-04}$; $t=4,4374$, $n=24$), aber in der anschließenden Testphase keine längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ($p=0,3927$; $t=0,87114$). Die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Minuten des Tests unterscheidet sich signifikant von der in der Trainingsphase ($p=1,28e^{-03}$; $t=3,666$) (Abbildung 19).

Um zu überprüfen, ob der Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses durch die Mutation von *cry* verursacht wird und nicht durch die ebenfalls durch die *cry*-Mutation defekte innere Uhr, wurde eine weitere mutante Uhrenkomponente untersucht. Hierfür fand die Mutante *period*⁰¹ (*per*⁰¹) Verwendung. PER ist ein Element der transkriptionalen Rückkopplungsschleife der circadianen Uhr (Ahmad und Cashmore 1993) und steht bis jetzt in keinem Zusammenhang mit der idiothetischen Orientierung.

Im *IODA* zeigten *per*-mutante Fliegen eine höchst signifikant längere Aufenthaltsdauer in den letzten beiden Minuten des Trainings ($p=1,85e^{-04}$; $t=4,6241$; $n=20$), sowie eine hoch signifikant längere Aufenthaltsdauer in den letzten beiden Minuten des Tests ($p=5,23e^{-03}$; $t=3,1536$). Die Aufenthaltsdauer zwischen Trainings- und Testphase unterscheidet sich nicht signifikant ($p=0,1848$; $t=1,3761$) (Abbildung 19). Offenbar ist eine defekte circadiane Rhythmik nicht für den Verlust der idiothetischen Orientierung verantwortlich. CRY ist demnach nicht nur in die innere Uhr involviert, sondern besitzt auch eine entscheidende, akut lichtunabhängige Aufgabe in der idiothetischen Orientierung.

Um den Einfluss des visuellen Systems auf die idiothetische Orientierung, bzw. das idiothetische Orientierungsgedächtnis zu untersuchen, wurde der blinde Fliegenstamm *no receptor potential A* (*norpA^{P24}*) gewählt. *norpA* codiert für das Protein *Phospholipase-C* (PLC), welches exklusiv in die Phototransduktionskaskade des visuellen Systems involviert ist. Eine Mutation von *norpA* blockiert die lichtinduzierte Phosphorylierung von drei augenspezifischen Proteinen, eines davon ist das R1-6 Opsin (Matsumoto et al. 1982). Eine Expression von *norpA* wurde aber auch in den optischen Loben und dem Zentralkomplex nachgewiesen (Bloomquist et al. 1988).

Wurden *norpA^{P24}* Tiere im *IODA* getestet, zeigten sie einen intermediären Phänotyp. Sie zeigten zwar eine Vermeidung der vibrierten Seite in der Trainingsphase ($p=6,62e^{-05}$; $W=269,5$, $n=24$), aber kein idiothetisches Orientierungsgedächtnis in der anschließenden Testphase ($p=0,08969$; $t=1,7717$). Jedoch besteht kein signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite zwischen Trainings- und Testphase ($p=0,06528$; $V=215$) (Abbildung 19). Es ist wahrscheinlicher, dass nicht das defekte visuelle System für den Verlust des Orientierungsgedächtnisses verantwortlich ist, sondern dass *norpA* direkt (Ni et al. 2017; Szular et al. 2012; Emery et al. 2000) oder über den gemeinsamen Bindungspartner *inactivation no afterpotential* (*inaD*) (van Huizen et al. 1998), evnetuell im visuellen System (Shieh und Niemeyer 1995), mit *cry* interagiert und das Fehlen von *norpA* das Orientierungsgedächtnis negativ beeinflusst, da *cry*-mutante Tiere einen Verlust des Orientierungsgedächtnisses aufweisen (s.o.).

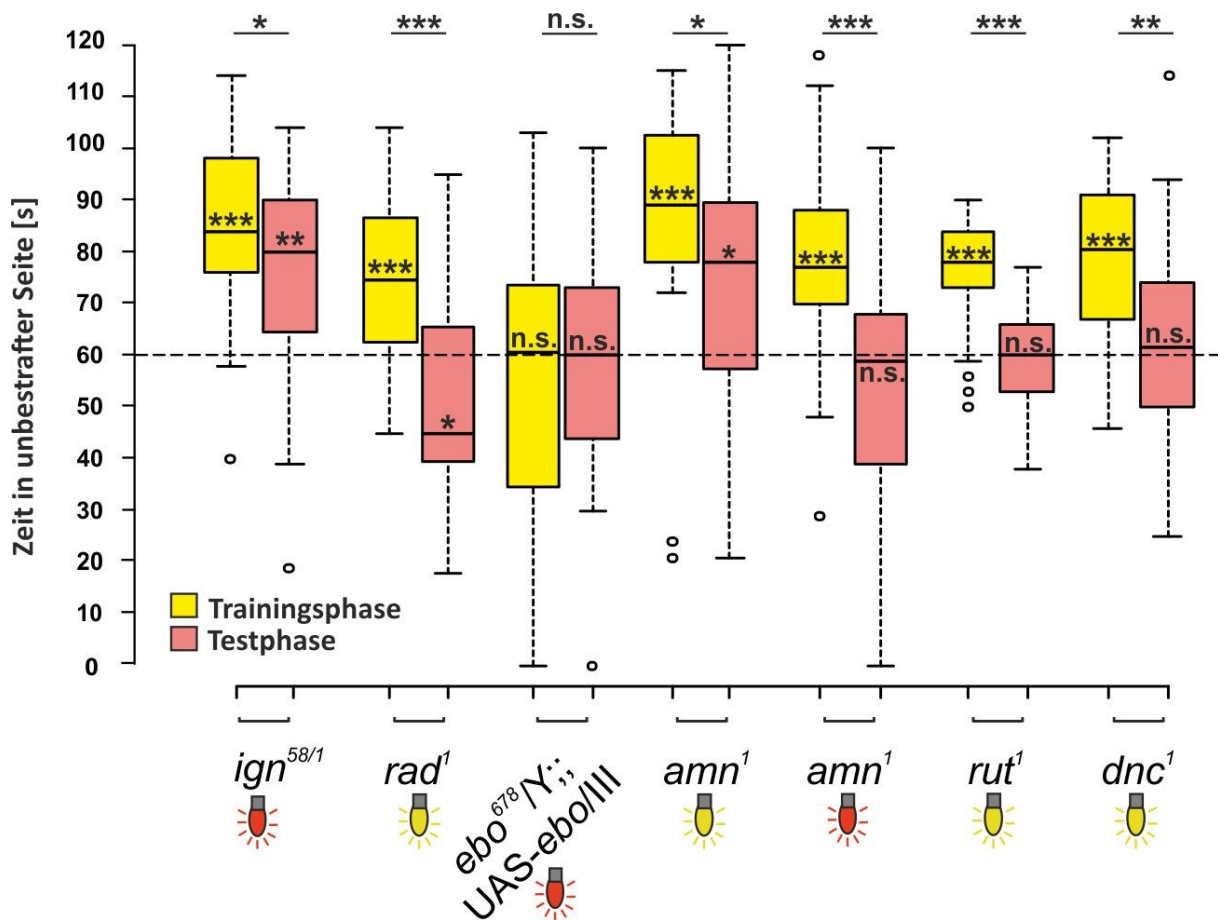


Abbildung 18: Idiothetische Orientierung im *IODA* bei klassischen Lernmutanten. Die Mutanten *dnc*¹, *rut*¹ und *ebo*⁶⁷⁸ bilden im *IODA* kein Orientierungsgedächtnis aus. *amn*¹ kann dieses Gedächtnis zwar noch im sichtbaren Licht ausbilden, verliert diese Fähigkeit aber unter Rotlichtbedingungen. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestrafter Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. Gelbe Lampen = Versuchsdurchführung unter für *Drosophila* sichtbarem Licht, Rote Lampen = Versuchsdurchführung unter für *Drosophila* nicht sichtbarem Licht. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere. n= siehe Tabelle 8.

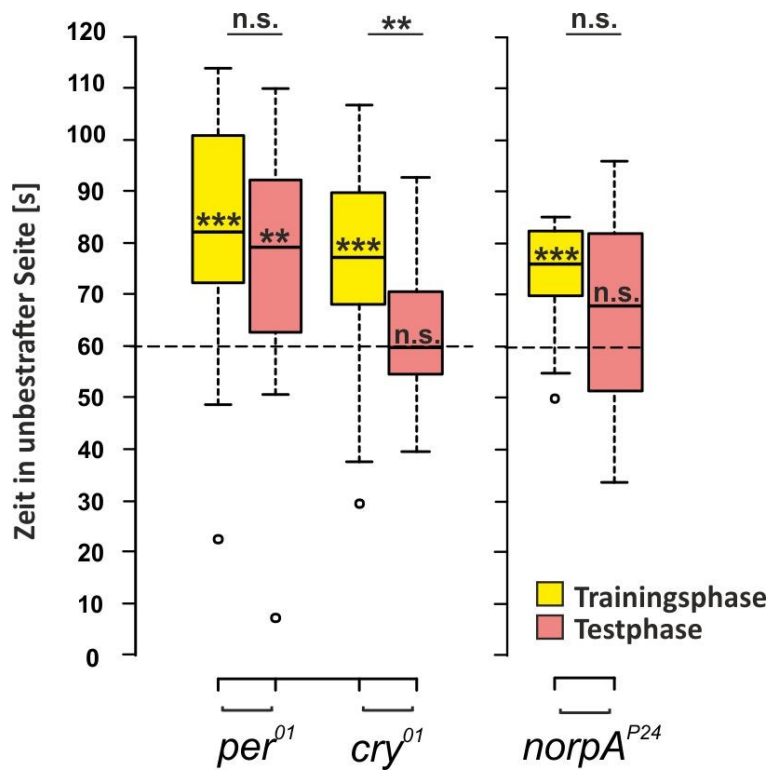














Abbildung 19: Idiothetische Orientierung im *IODA* bei Mutanten der inneren Uhr sowie blinden Fliegen. Für die Ausbildung des Orientierungsgedächtnisses ist keine funktionierende circadiane Rhythmik notwendig, jedoch zeigen *cry*-mutante Fliegen einen Verlust des Orientierungsgedächtnisses. Auch der blinde Fliegenstamm *norpA*^{P24} besitzt kein Orientierungsgedächtnis. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. Versuchsdurchführung unter für *Drosophila* nicht sichtbarem Licht. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *: $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Statistische Werte verschiedener mutanter Stämme im IODA unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Aus Abbildung 18 und Abbildung 19. n= Anzahl der getesteten Tiere; p= Signifikanzniveau; t-Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten);  Tageslicht;  Rotlicht.

| Genotyp | | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|--|---|--------------------------|---------|-------|----------------------|---------|---|--------------------------------|---------|-------|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| <i>ign</i> ^{58/1} (1x cant.) n= 23 |  | 1,38e ⁻⁰⁶ | 6,5479 | | 2,31e ⁻⁰³ | 3,4457 | | 0,02429 | 2,4188 | |
| <i>rad</i> ¹ n= 24 |  | 2,36e ⁻⁰⁴ | 4,3483 | | 0,04516 | -2,1184 | | 1,24e ⁻⁰⁴ | 4,6057 | |
| <i>ebo</i> ^{678/Y;;UAS- ebo/III} n= 24 |  | 0,3982 | -0,8609 | | 0,5546 | 0,59968 | | 0,733 | 0,34529 | |
| <i>amn</i> ¹ n= 23 |  | 9,13e ⁻⁰⁴ | | 247,5 | 0,01652 | 2,5953 | | 0,02839 | | 194,5 |
| <i>amn</i> ¹ n= 25 |  | 8,63e ⁻⁰⁵ | 4,7125 | | 0,2443 | 1,1936 | | 4,34e ⁻⁰⁴ | 4,0768 | |
| <i>norpA</i> ^{P24} n= 24 |  | 6,62e ⁻⁰⁵ | | 269,5 | 0,08969 | 1,7717 | | 0,06528 | | 215 |
| <i>per</i> ⁰¹ n= 20 |  | 1,85e ⁻⁰⁴ | 4,6241 | | 5,23e ⁻⁰³ | 3,1536 | | 0,1848 | 1,3761 | |
| <i>cry</i> ⁰¹ n= 24 |  | 1,89e ⁻⁰⁴ | 4,4374 | | 0,3927 | 0,87114 | | 1,28e ⁻⁰³ | 3,666 | |
| <i>dnc</i> ¹ n= 22 |  | 3,09e ⁻⁰⁶ | 6,2886 | | 0,4486 | 0,77215 | | 1,37e ⁻⁰³ | 3,687 | |
| <i>rut</i> ¹ n= 23 |  | 1,60e ⁻⁰⁴ | | 262,5 | 0,7033 | -0,3858 | | 5,87e ⁻⁰⁴ | | 251,5 |

3.4 Idiothetische Orientierung nach Stilllegung der chemisch-synaptischen Transmission einzelner Ringneuronsysteme

Mittels Expression von Tetaustoxin (TNT) in den einzelnen Ringneuronentypen wurde die chemisch-synaptische Transmission in dem entsprechenden System unterbunden. Die Expression von Tetanustoxin in Neuronen führt zur Unterbindung der Exozytose der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt (Sweeney et al. 1995). Mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems kann TNT gezielt in den einzelnen Ringsystemen (R1-4) exprimiert werden. Eine Expression von TNT in den Ringsystemen R1, R3 und R4 führt zu einem Verlust des visuellen Orientierungsgedächtnisses im *Detour*-Paradigma (Neuser 2012). Exprimiert man TNT mit Hilfe des R2-Treibers EB1-GAL4, tritt im *Detour*-Paradigma eine so starke Immobilität der Fliegen auf, dass ein Verhaltensversuch unmöglich wird (Neuser 2012).

3.4.1 Silencing von R1

Über den Treiber R31A12-GAL4 wird die Expression von TNT auf R1 beschränkt (Omoto et al. 2018). (Expressionsmuster siehe Abbildung 42). Während die Kontrollgruppe +/Y;;R31A12-GAL4/III eine wildtypische Bevorzugung der unbestraften Seite in der Trainingsphase (p= 1,81,e⁻⁰⁶; t= 7,091; n= 18), sowie in der Testphase (p=1,08e⁻⁰³; W= 146) zeigte (Abbildung 20), führte die Expression von TNT bei w/Y;UAS-TNT/II;R31A12-

GAL4/III zu einer stark reduzierten Lokomotorik. Es war nicht möglich die Tiere im *IODA* zu testen. Zu beachten ist, dass auch die Kontrollgruppe eine geringere, jedoch ausreichende Aktivität aufwies.

3.4.1.1 Silencing von R1 plus

Der Treiber 198Y-GAL4 wurde als R1 selektiver Treiber publiziert (Renn et al. 1999). Das konnte aufgrund des fehlenden GFP-Signals in der durchgeführten immunhistologischen Untersuchung jedoch nicht überprüft werden. (Expressionsmuster siehe Abbildung 43). Auch scheint 198Y-GAL4 in der histologischen Untersuchung von Renn im Jahre 1999 nicht ausschließlich auf R1 beschränkt gewesen zu sein. In ihrer Arbeit sind in den Expressionsmustern von 198Y-GAL4 schwache GFP-Signale in den Bulbi des Ellipsoidkörpers zu erkennen, was gegen die Beschränkung auf R1 spricht. Das Ringsystem 1 zeigt keine Expression in den Bulbi (Omoto et al. 2018). Daher kann angenommen werden, dass 198Y-GAL4 neben R1 noch weitere Ringssysteme (hier R1 plus genannt) zumindest teilweise anspricht. Die Expression von TNT unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 führte zu einem Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses im *IODA*. Die Tiere zeigten keine längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Testminuten ($p=0,5864$; $t=0,55214$; $n=23$), jedoch zeigten sie in der Trainingsphase, dass sie die unbestrafte Seite bevorzugen ($p=9,17e^{-05}$; $t=4,7717$). Die Tiere hielten sich signifikant länger während der Trainingsphase, verglichen mit der Testphase, in der unbestraften Seite auf ($p=2,38e^{-03}$; $t=3,432$). Die Kontrollgruppe $+/Y$; 198Y-GAL4/IV zeigte wildtypisches Verhalten, eine längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite sowohl in der Trainingsphase ($p=4,68e^{-03}$; $t=3,2035$, $n=20$), als auch in der anschließenden Testphase ($p=0,031$; $t=2,3297$). Die Aufenthaltsdauern in der Trainings- und Testphase unterschied sich nicht signifikant voneinander ($p=0,2179$; $t=1,2743$) (Abbildung 20).

3.4.2 Silencing von R2

Die Expression von TNT unter der Kontrolle der R2 spezifischen Treibers EB1-GAL4 (Omoto et al. 2018) (Expressionsmuster siehe Abbildung 44), führte zu einer so starken Reduktion der Lokomotion der Tiere, dass es nicht möglich war, den Genotyp w/Y ; UAS-TNT/EB1-GAL4 im *IODA* zu testen. Dieser Phänotyp wurde schon 2012 von Neuser im *Detour*-Paradigma beobachtet (Neuser 2012). Die Treiberkontrolle $+/Y$; EB1-GAL4/II hingegen verhielt sich im *IODA* wildtypisch (Abbildung 20).

3.4.2.1 Silencing von R2 plus/minus

Die Ergebnisse der Doppelfärbung von als R2 spezifisch postulierten Treiber R19C08-GAL4 zeigen, dass jener neben dem Ringsystem R2 in einem überlappenden Bereich des Treibers R28D01-GAL4 exprimiert (Abbildung 45 und Abbildung 65). Somit wird auch R19C08-GAL4 in die Kategorie R2 plus eingeordnet. Im *IODA* zeigten sich bei Tieren des Genotyps w/Y ; UAS-TNT/II; R19C08-GAL4/III eine mit dem Genotyp w/Y ; UAS-TNT/EB1-GAL4 vergleichbare Inaktivität. Auch bei dieser Versuchsgruppe zeigte sich eine so starke Inaktivität, dass es nicht möglich gewesen war, die Tiere im *IODA* zu testen.

Der Treiberstamm VT49921-GAL4 ist als R2 spezifischer Treiber postuliert (Lin et al. 2013), es wurden aber in der immunhistologischen Untersuchung zu wenige R2-spezifische Zellkörper nach GFP-Expression unter der Kontrolle dieses Treibers erkannt (Expressionsmuster siehe Abbildung 46). Daher wird er als R2 minus behandelt. Im *IODA* weisen Tiere des Genotyps *w/Y;UAS-TNT/II;VT49921-GAL4/III* einen intermediären Phänotyp auf. Zwar bevorzugen sie in den letzten beiden Trainingsminuten die unbestrafte Seite ($p=4,94e^{-04}$; $t=4,1925$; $n=20$), jedoch unterscheidet sich die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite im anschließenden Test nicht signifikant vom Zufallsniveau ($p=0,0606$; $t=1,9949$). Dennoch besteht kein signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite zwischen Trainings- und Testphase ($p=0,1368$; $t=0,1368$). Die Kontrollgruppe *+Y;;VT49921-GAL4/III* hält sich sowohl im Training ($p=4,24e^{-05}$; $W=253$; $n=22$), als auch in der Testphase ($p=9,42e^{-07}$; $t=6,8299$) signifikant länger in der unbestraften Seite auf. Jedoch besteht zwischen den Aufenthaltsdauern in Trainings- und Testphase ein signifikanter Unterschied ($p=1,70e^{-02}$; $V=200,5$) (Abbildung 20).

3.4.3 Silencing von R3d&p

Der Treiber 189Y-GAL4 exprimiert ausschließlich in den Subklassen R3d und R3p des dritten Ringsystems (Omoto et al. 2018) (Expressionsmuster siehe Abbildung 47 und Abbildung 66). Obwohl die Kontrollgruppe *+Y;189Y-GAL4/II* im *IODA* einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses in der Testphase zeigt ($p=0,2877$; $t=1,0885$; $n=24$), zeigt die experimentelle Gruppe unter Vollichtbedingungen ein intaktes Orientierungsgedächtnis ($p=3,20e^{-03}$; $t=3,3272$; $n=22$). Beide Gruppen zeigen eine Bevorzugung der unbestraften Seite in der Trainingsphase (Kontrollgruppe: $p=9,91e^{-05}$; $t=4,6968$; experimentelle Gruppe: $p=1,93e^{-04}$; $t=4,5076$). Während sich die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite von Test- und Trainingsphase bei der experimentellen Gruppe nicht signifikant voneinander unterscheidet ($p=0,137$; $t=1,5464$), hält sich die Kontrollgruppe in der Testphase, verglichen mit der Trainingsphase, kürzer in der unbestraften Seite auf ($p=3,22e^{-03}$; $t=3,2883$) (Abbildung 20). Unter Rotlichtbedingungen war die experimentelle Gruppe nicht testbar, da sie zu wenig Aktivität zeigte, sodass ein Versuchsdurchlauf unmöglich war.

3.4.4 Silencing von R4 minus

Die Expression von TNT unter der Kontrolle des R4 spezifischen Treibers *ftz-ng-GAL4* (*fushi-tarazu*, ein Segmentierungsgen der frühen Embryonalentwicklung (Krause et al. 1988; Lin und Goodman 1994)) führt zur Letalität der F1-Generation. Dies wurde auch schon in der Dissertation von Flethe 2018 beobachtet (Flethe 2018). Allerdings kann angenommen werden, dass *ftz-ng-GAL4* nicht das gesamte Ringneuronensystem R4 anspricht, da nach Expression von GFP unter der Kontrolle dieses Treibers nicht alle R4-zugehörigen Zellkörper angefärbt wurden (Expressionsmuster siehe Abbildung 51). Eventuell wird nur in einem Teil dieses Ringsystems exprimiert, der Treiber *ftz-ng-GAL4* daher als „R4 minus“ bezeichnet. Da das vierte Ringsystem in die Subklassen R4m und R4d unterteilt werden kann, sollten TNT nachfolgend in den beiden einzelnen Subsystemen exprimiert werden.

3.4.4.1 Silencing von R4m und R4d

Auch die Nachkommen der Verpaarung von $w/w;UAS-TNT$ mit der R4m spezifischen Treiberlinie $w/Y;VT025526-GAL4$ (Lin et al. 2013), waren letal. Die F1-Generation verstarb zwei bis drei Tage nach dem pupalen Schlupf. Lediglich die experimentelle Gruppe $w/Y;UAS-TNT/II;V043679-GAL4/III$, in welcher TNT in R4d exprimiert wird (Lin et al. 2013), zeigte sich lebensfähig. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass eine Expression von GFP unter der Kontrolle dieses Treibers zu keinem Signal in der immunhistochemischen Untersuchung führte (Expressionsmuster siehe Abbildung 53). Ob $VT043679-GAL4$ noch R4d spezifisch exprimiert, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Im *IODA* zeigt diese experimentelle Gruppe einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Die Tiere halten sich im Test nicht signifikant länger in der unbestraften Seite auf ($p= 0,3708$; $t= -0,91454$; $n= 22$), wohl aber in der vorangegangenen Trainingsphase ($p= 1,31e^{-05}$; $t= 5,6507$). Die Aufenthaltsdauer in der Testphase unterscheidet sich höchst signifikant von der Trainingsphase ($p= 4,51e^{-05}$; $t= 5,1206$) (Abbildung 20).

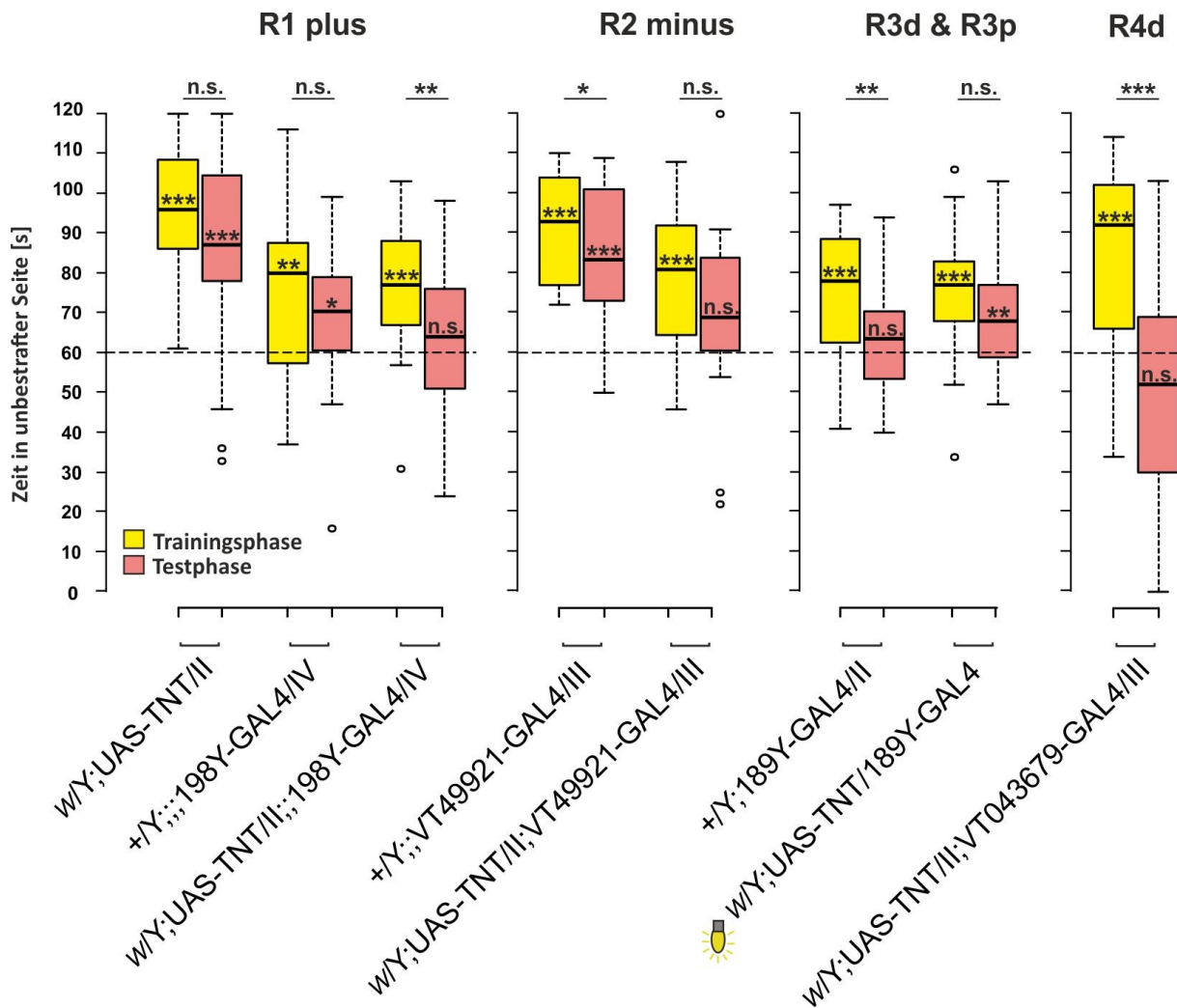


Abbildung 20: Idiothetische Orientierung im IODA nach Silencing einzelner Ringsysteme des EK. Eine Expression von TNT führt in allen Ringsystemen zu einem Verlust des Orientierungsgedächtnisses. Unter der Kontrolle von 198Y-Gal4 zeigen die Tiere unter Rotlichtbedingungen eine so stark eingeschränkte Lokomotion, dass ein Versuchsdurchlauf nicht möglich war. Unter Licht des vollen Spektrums (gelbe Lampe) ist ein intaktes Orientierungsgedächtnis zu beobachten. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestrafter Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. Versuchsdurchführung unter für *Drosophila* nicht sichtbarem Licht. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *; $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen, außer gelbe Lampe = Tageslichtbedingung. n= siehe Tabelle 9.

Tabelle 9: Statistische Werte nach Silencing einzelner Ringe des EK mit *Tetanustoxin* (TNT). Aus Abbildung 20 im *IODA*. n= Anzahl getesteter Tiere; p= Signifikanzniveau; t-Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten); ☀ Tageslicht; sonst Rotlicht.

| Genotyp | Ring | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|---|----------|--------------------------|--------|-----|----------------------|---------|---|--------------------------------|--------|-------|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| w/Y;UAS-TNT/II n= 23 | | 4,20e ⁻⁰⁹ | 9,3302 | | 1,33e ⁻⁰⁴ | 4,6182 | | 0,1203 | 1,6162 | |
| +Y;;;198Y-GAL4/IV n= 20 | R1 plus | 4,68e ⁻⁰³ | 3,2035 | | 0,031 | 2,3297 | | 0,2179 | 1,2743 | |
| w/Y;UAS-TNT/II;;198Y-GAL4/IV n=23 | | 9,17e ⁻⁰⁵ | 4,7717 | | 0,5864 | 0,55214 | | 2,38e ⁻⁰³ | 3,432 | |
| +Y;;VT49921-GAL4/III n= 22 | R2 minus | 4,24e ⁻⁰⁵ | | 253 | 9,42e ⁻⁰⁷ | 6,8299 | | 1,70e ⁻⁰² | | 200,5 |
| w/Y;UAS-TNT/II;VT49921-GAL4/III n= 20 | | 4,94e ⁻⁰⁴ | 4,1925 | | 0,0606 | 1,9949 | | 0,1368 | 0,1368 | |
| +Y;189Y-GAL4/II n= 24 | R3d, R3p | 9,91e ⁻⁰⁵ | 4,6968 | | 0,2877 | 1,0885 | | 3,22e ⁻⁰³ | 3,2883 | |
| w/Y;UAS-TNT/;189Y-GAL4 n= 22 ☀ | | 1,93e ⁻⁰⁴ | 4,5076 | | 3,20e ⁻⁰³ | 3,3272 | | 0,137 | 1,5464 | |
| w/Y;UAS-TNT/II;VT043679-GAL4/III n= 22 | R4d | 1,31e ⁻⁰⁵ | 5,6507 | | 0,3708 | 0,91454 | | 4,51e ⁻⁰⁵ | 5,1206 | |

3.5 Knock-Down und Rettungsexperimente von *dunce* (*dnc*) oder *rutabaga* (*rut*) im Ellipsoidkörper bei der idiothetischen Orientierung

Die von *dnc* codierte *Phosphodiesterase* (PDE) sorgt für einen cAMP-Abbau in der Zelle und ist somit der Gegenspieler der von *rut* codierten *Adenylylzyklase* (AC), welche cAMP aus ATP generiert. cAMP als wichtiger, sekundärer Botenstoff ist essentiell für die Informationsweiterleitung in der Nervenzelle. Mutationen in *rut* oder *dnc* Gen führen zu einem Verlust der olfaktorischen Konditionierung (Tully und Quinn 1985; Armstrong et al. 1998; Tang und Juusola 2012), sowie des visuellen Arbeitsgedächtnisses (Kuntz et al. 2017) und eines Kurzzeitintegrators (Flethe 2018).

Auch im *IODA* zeigten *rut*¹ und *dnc*¹ mutante Fliegen einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses (siehe Kapitel 3.3). Daher ist von einer Notwendigkeit von cAMP für die Etablierung dieser Gedächtnisform auszugehen. Der sekundäre Botenstoff cGMP scheint hierfür jedoch keine Rolle zu spielen, da Fliegen, welche eine Mutation in der Downstream-Komponente *ign* (*ign*^{58/1}) haben, ein intaktes idiothetisches Orientierungsgedächtnis aufwiesen (siehe Kap.3.3). Daher wurde im Folgenden der Ellipsoidkörper bezüglich der Notwendigkeit von *rut* und *dnc* auf diese Gedächtnisform kartiert.

Zur Analyse der Ringsysteme des Ellipsoidkörpers, in welchen *dnc* und *rut* eine Rolle in der Ausbildung dieses nicht-visuellen Orientierungsgedächtnisses spielen, wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Zum einen können *dnc* oder *rut* als cDNA (complementary DNA) im jeweils mutanten genetischen Hintergrund gezielt in den einzelnen Ringsystemen exprimiert werden (Rettungsexperiment), zum anderen können die Genprodukte wiederum mittels RNA-Interferenz in einzelnen Ringsystemen herunterreguliert werden (Knock-Down Experiment). In der anschließenden Verhaltensanalyse im *IODA* kann daraufhin der Einfluss der beiden Genprodukte in den Ringsystemen analysiert werden und Rückschlüsse auf die Zuständigkeiten von *dnc* und *rut* in den Subsystemen des Ellipsoidkörpers gezogen werden.

3.5.1 *dnc* in den Ringsystemen des Ellipsoidkörpers

Um zu untersuchen, in welchen Ringsystemen *dnc* für die Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses benötigt wird, wurden Tiere des Stamms *dnc¹/dnc¹;UAS-dnc/CyO* mit Männchen des gewünschten Treiberstamms gekreuzt. Die männlichen Nachkommen sind hemizygot mutant für *dnc¹*, jedoch wird die *dnc*-cDNA im Muster des verwendeten Treiberstamms exprimiert. In einem unabhängigen Experiment wird *dnc* mittels Kombination einer *dnc* RNA Interferenzlinie mit der gewünschten Treiberlinie in den einzelnen Ringsystemen herunterreguliert. Hierbei ist zu beachten, dass mittels dieses Verfahrens nicht alle Genprodukte degradiert werden können; somit ist dieses Verfahren nur als Ergänzung zu den aussagekräftigeren Rettungsexperimenten zu sehen. Es wurden sowohl für die Rettungs- wie auch für die Knock-Down Versuche männliche Tiere der F1-Generation ohne Balancer verwendet. Um auszuschließen, dass auch ohne GAL4 eine ausreichende Menge Genprodukt exprimiert wird (Leckexpression), welche zur Wiederherstellung des wildtypischen Phänotyps ausreichend sein können, wurden Tiere des Stamms *dnc¹/dnc¹;UAS-dnc/CyO* mit CS Männchen gekreuzt. Die *dnc¹/Y;UAS-dnc/II* Tiere der F1-Generation wurden anschließend im *IODA* getestet. Es zeigte sich, dass die Tiere ein *dnc¹*-phänotypisches Orientierungsgedächtnis aufwiesen. Zwar konnten sie im Training die bestrafte Seite höchst signifikant vermeiden ($p=2,76e^{-04}$; $W=239$; $n=22$), hielten sich im anschließenden Test aber nicht signifikant länger in der unbestraften Seite auf ($p=0,599$; $t=-0,53395$). Die Aufenthaltszeiten in der unbestraften Seite von Test- und Trainingsphase unterscheiden sich höchst signifikant ($p=2,43e^{-04}$; $V=240$) (Abbildung 21).

Auch die Effektorlinie *UAS-dnc^{RNAi}* wurde auf eine, das Verhalten beeinflussende, Leckexpression untersucht. Weibchen der Effektorlinie *w/w;;UAS-dnc^{RNAi}/TM3,Sb* wurden mit CS Männchen gekreuzt und Tiere des Genotyps *w/Y;;UAS-dnc^{RNAi}/III* der F1-Generation im *IODA* getestet. Die Fliegen zeigten eine höchst signifikante Bevorzugung der unbestraften Seite sowohl in den letzten beiden Trainingsminuten ($p=2,47e^{-10}$; $t=10,99$; $n=23$), als auch in den letzten beiden Testminuten ($p=2,37e^{-11}$; $t=12,326$). Zwischen Trainings- und Testphase besteht kein signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ($p=0,8471$; $t=-0,19505$). Somit kann ein durch Leckexpression verursachter Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses in den folgenden Knock-Down Experimenten ausgeschlossen werden (Abbildung 22).

3.5.1.1 *dnc* im Ringsystem R1

Eine ausschließlich in R1 exprimierende Treiberlinie ist R31A12-GAL4 (Omoto et al. 2018) (Expressionsmuster siehe Abbildung 42). Eine Expression von *dnc*-cDNA, unter der Kontrolle dieser Treiberlinie im *dnc*-mutanten Hintergrund, führte zu keiner Rettung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Die Tiere konnten in der Trainingsphase die unbestrafte Seite bevorzugen ($p= 1,70e^{-03}$; $W= 158$; $n= 18$) dennoch halten sie sich in den letzten beiden Trainingsminuten nicht signifikant länger dort auf ($p= 0,3399$; $t= -0,98196$). Auch die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ist in der Trainingsphase höchst signifikant länger als in der Testphase ($p= 6,52e^{-04}$; $W= 149$). Die Treiberkontrolle $+/Y;;R31A12-GAL4/III$ hingegen zeigte ein idiothetisches Orientierungsgedächtnis. Die Tiere konnten sowohl im Training ($p= 1,81e^{-06}$; $t= 7,091$; $n= 18$), als auch in den letzten beiden Testminuten ($p= 1,08e^{-03}$; $W= 146$) die unbestrafte Seite signifikant bevorzugen. Zwischen Trainings- und Testphase gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ($p= 0,5381$; $V= 63$) (Abbildung 21).

Rettungsversuch

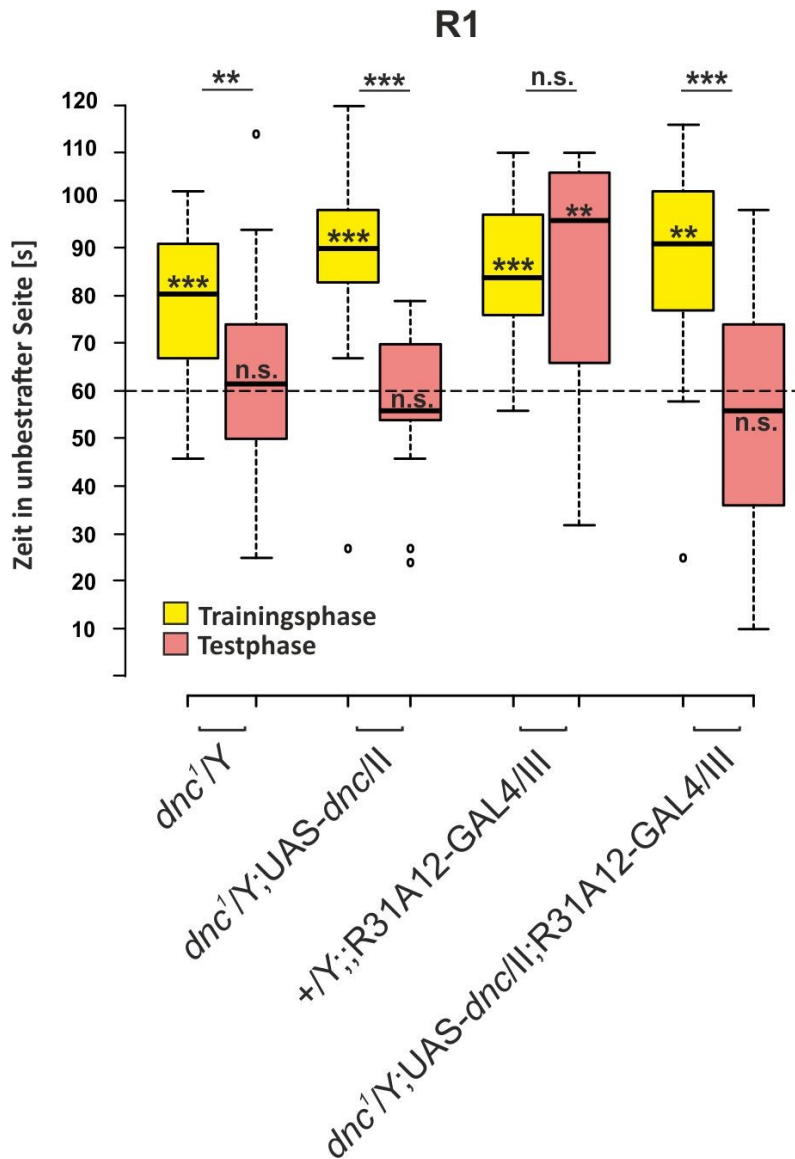


Abbildung 21: Idiopathische Orientierung im *IODA* nach Rettung von *dnc¹* in R1. Eine Expression von *dnc*-cDNA in R1 im *dnc¹*-mutanten Hintergrund führt nicht zu einer Rettung des Orientierungsgedächtnisses. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestrahten Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 10.

3.5.1.2 *dnc* im Ringsystem R1 plus

Neben dem Ringsystem R1 exprimiert der Treiber 198Y-GAL4 offenbar auch in anderen Ringsystemen (Renn et al. 1999). Wird *dnc*-cDNA im *dnc¹*-mutanten Hintergrund unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 exprimiert, so fand eine Rettung des idiothetischen Gedächtnisses statt. Die Tiere hielten sich höchst signifikant länger in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten ($p=1,07e^{-09}$; $t=11,022$), wie auch in den letzten beiden Testminuten ($p=6,58e^{-09}$; $t=9,8625$) auf. Zu beachten ist, dass nach Expression von GFP unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 kein GFP-Signale im Zentralkomplex zu erkennen ist (siehe Abbildung 43), obwohl eine Auswirkung auf das Verhalten hier im Rettungsexperiment beobachtet werden konnte (Abbildung 22). Die immunhistologische Untersuchung wurde jedoch erst einige Monate nach den Verhaltensexperimenten durchgeführt.

Wird die *dnc*-mRNA mittels RNA-Interferenz in R1 plus degradiert, besaßen die experimentellen Tiere des Genotyps *w/Y;;UAS-dnc^{RNAi}/III;198Y-GAL4/IV* immer noch ein idiothetisches Gedächtnis. Sie bevorzugten in der Trainingsphase ($p=3,12e^{-04}$; $W=257$; $n=20$), genauso wie in der Testphase ($p=5,42e^{-05}$; $t=4,9885$) die unbestrafte Seite höchst signifikant. Zwischen Trainings- und Testphase gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ($p=0,3894$; $V=153,5$) (Abbildung 22). Zwar steht damit das Ergebnis des Knock-Down Experimentes im Widerspruch zu jenem des Rettungsexperiments, jedoch könnte diese Diskrepanz der Tatsache geschuldet sein, dass bei einer RNA-Interferenz nicht immer alle Genprodukte degradiert werden und eine Restaktivität zur Aufrechterhaltung des Phänotyps führen kann.

Ähnlich wie 198Y-GAL4 zeigte auch die als R1-spezifischer Treiber publizierte Linie VT039763-GAL4 Expression in den Bulbi (www.flylight.com). Daher wurde auch dieser der Kategorie R1 plus zugeordnet. Auch mit diesem Treiber war eine Rettung des Phänotyps möglich, sobald die *dnc*-cDNA im mutanten Hintergrund exprimiert wurde. Die Tiere zeigten nach erfolgreicher Trainingsphase ($p=1,27e^{-06}$; $t=7,1046$; $n=19$) im anschließenden Test eine Bevorzugung der unbestraften Seite ($p=5,84e^{-06}$; $t=6,3247$). Trainings- und Testphase unterscheiden sich nicht signifikant ($p=0,1383$; $t=1,5512$). Auch die Treiberkontrollgruppe zeigte im Test ein intaktes Orientierungsgedächtnis ($p=9,48e^{-05}$; $W=210$; $n=20$) (Abbildung 22).

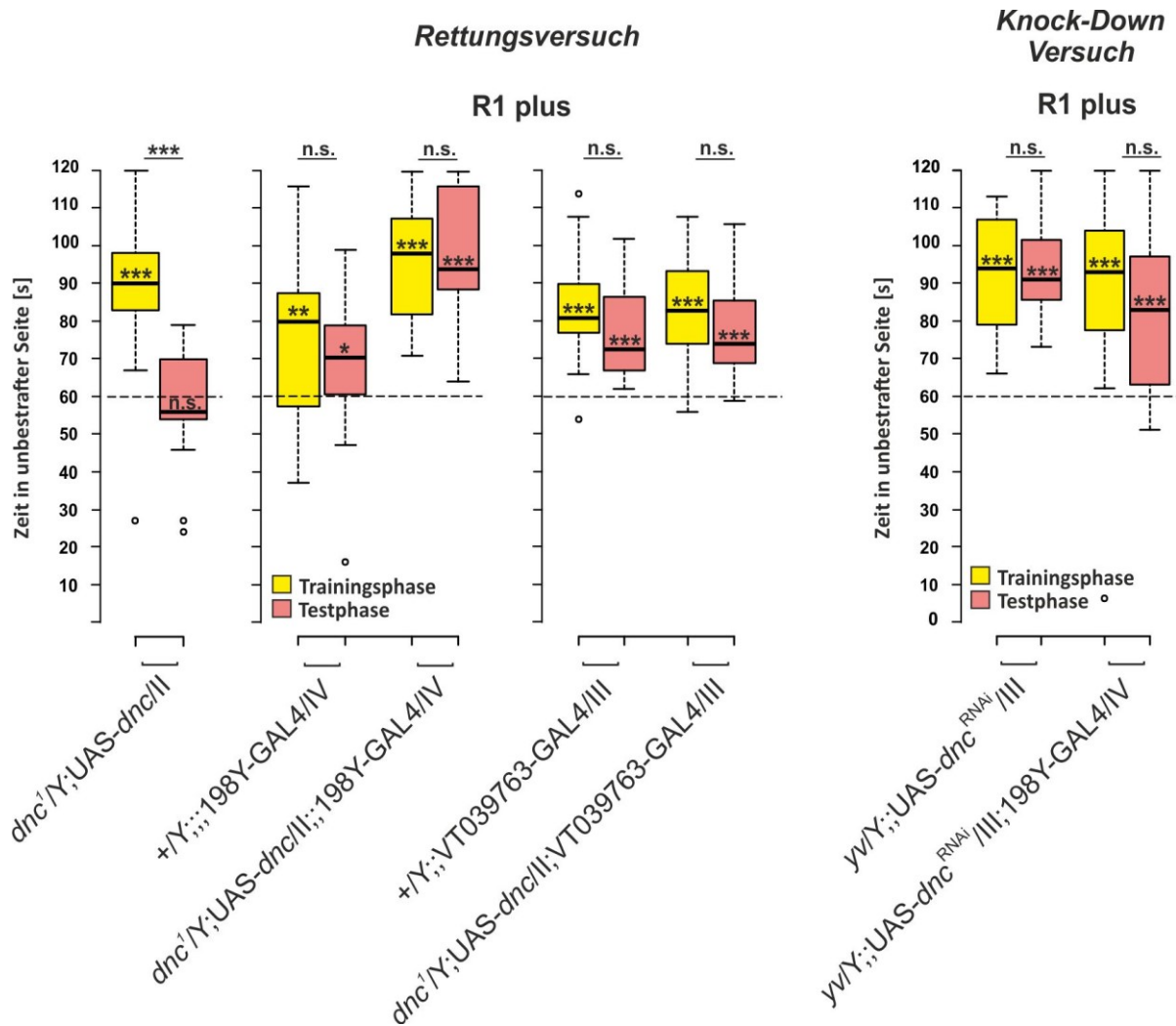


Abbildung 22: Idiopathische Orientierung im *IODA* nach Rettung oder Knock-Down von *dnc*¹ in R1 plus. Eine Expression von *dnc*-cDNA im mutanten Hintergrund unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 oder VT039763-GAL4 führt zur Rettung des Orientierungsgedächtnisses. Ein Knock-Down von *dnc* über 198Y-GAL4 beeinträchtigt das Orientierungsgedächtnis jedoch nicht. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestrafter Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 10 und Tabelle 11.

3.5.1.3 *dnc* im Ringsystem R2

Der Treiber EB1-GAL4 exprimiert ausschließlich in Ringneuronen des R2 Ringsystems (Omoto et al. 2018) (Abbildung 44). Bei *dnc*-defizienten Tieren, bei welchen *dnc*-cDNA unter der Kontrolle von EB1-GAL4 in R2 exprimiert wird, fand keine Rettung des idiothetischen Gedächtnisses des *dnc*¹ Hintergrunds statt. Die Fliegen zeigten zwar eine Vermeidung der bestrafte Seite in den letzten beiden Trainingsminuten ($p= 4,56e^{-09}$; $t= 9,519$; $n= 22$), jedoch hielten sie sich in den letzten beiden Testminuten nicht signifikant länger in der unbestraften Seite auf ($p= 0,3461$; $t= 0,96393$). Die Aufenthaltsdauer in jener Seite war in der Trainingsphase höchst signifikant länger, verglichen mit der Testphase ($p= 6,84e^{-06}$; $t= 5,9355$) (Abbildung 23).

Die Ergebnisse des Rettungsexperiments mit EB1-GAL4 stützen jene des Knock-Down Versuchs von *dnc* mit EB1-GAL4. Wird *dnc*-cDNA unter der Kontrolle dieses Treibers in R2 herunterreguliert, zeigten die Tiere keinen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Sie bevorzugten sowohl in der Trainingsphase ($p= 1,93e^{-11}$; $t= 12,457$; $n= 23$), als auch in den letzten beiden Testminuten ($p= 4,57e^{-16}$; $t= 6,0277$) höchst signifikant die unbestrafte Seite (Abbildung 23). Die Ergebnisse des Rettungs- und Knock-Down Experimentes für dieses Ringsystem lassen den Schluss zu, dass das *dnc* Genprodukt PDE nicht in R2 benötigt wird.

3.5.1.4 *dnc* im Ringsystem R2 plus

Unter der Kontrolle von R19C08-GAL4 als R2 plus Treiber konnte die Expression von *dnc*-cDNA im mutanten Hintergrund das idiothetische Gedächtnis nicht wiederherstellen. Die experimentelle Gruppe *dnc*¹/Y;;UAS-*dnc*/R19C08-GAL4 zeigte zwar eine längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten ($p= 3,58e^{-03}$; $W= 183,5$; $n= 20$), jedoch eine Zufallsverteilung in den letzten beiden Testminuten ($p= 0,6707$; $t= 0,43186$). Trainings- und Testphase unterscheiden sich hoch signifikant voneinander ($p= 6,78e^{-03}$; $V= 178$). Die Gruppe der Treiberkontrolle konnte sich in der Testphase jedoch sicher orientieren ($p= 4,23e^{-05}$; $t= 5,2849$; $n= 20$) (Abbildung 23).

3.5.1.5 *dnc* im Ringsystem R3m und R3dp

Ein für das Subringsystem R3m spezifischer Treiber ist R28D01-GAL4 (Omoto et al. 2018). Frühere Arbeiten ordneten diesen den R1-restriktiven Treibern (Ofstad et al. 2011) zu, was jedoch auch aufgrund des Expressionsmusters in den Bulbi (Expressionsmuster siehe Abbildung 48, 64 und Abbildung 66) zu verwerfen ist. Eine Expression von *dnc*-cDNA im mutanten Hintergrund unter der Kontrolle von R28D01-GAL4 führte zu einer Wiederherstellung des idiothetischen Gedächtnisses. Die Fliegen bevorzugten sowohl im Training ($p=2,81e^{-06}$; $t=6,8523$; $n=18$), als auch in den letzten beiden Testminuten ($p=1,04e^{-04}$; $t=5,0246$) die unbestrafte Seite, wobei die Aufenthaltsdauer dort in der Testphase kürzer ist, verglichen mit der Trainingsphase ($p=0,01308$; $t=2,7709$) (Abbildung 24).

Der Treiber 189Y-GAL4 wurde in früheren Arbeiten ebenfalls als globaler R3 Treiber postuliert, jedoch hat ihn Omoto et al., 2018 aufgrund des Expressionsmusters der R3 Subklassen R3d und R3p zugeordnet (Omoto et al. 2018) (Expressionsmuster siehe Abbildung 47 und Abbildung 66). Wird *dnc*-cDNA im mutanten Hintergrund in Muster von 189Y-GAL4 exprimiert, so wurde das idiothetische Gedächtnis im *IODA* gerettet. Die Tiere bevorzugten in der Trainingsphase die unbestrafte Seite ($p=4,79e^{-10}$; $t=10,82$; $n=22$) und hielten sich auch in den letzten beiden Trainingsminuten höchst signifikant länger in jener Seite auf ($p=1,62e^{-06}$; $t=6,5811$). Zwischen Trainings- und Testphase besteht kein signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer ($p=0,325$; $t=1,0079$) (Abbildung 24).

Wird die *dnc*-mRNA mittels RNA-Interferenz über 189Y-GAL4 degradiert, zeigten die Tiere jedoch ein noch vorhandenes idiothetisches Orientierungsvermögen. Sie konnten in den letzten beiden Trainingsminuten ($p=7,19e^{-08}$; $t=7,905$; $n=23$), wie auch in den letzten beiden Minuten des Tests die unbestrafte Seite bevorzugen ($p=1,70e^{-03}$; $t=3,5725$). Es besteht kein Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite zwischen Trainings- und Testphase ($p=0,07565$; $t=1,8645$) (Abbildung 24). Jedoch besteht eine Diskrepanz in den Resultaten des Rettungs- und Knock-Down Experiments. Möglicherweise ist auch in diesem Interferenzexperiment noch eine Restaktivität durch nicht degradiertes Genprodukt von *dnc* für die Fähigkeit zur idiothetischen Orientierung ausreichend.

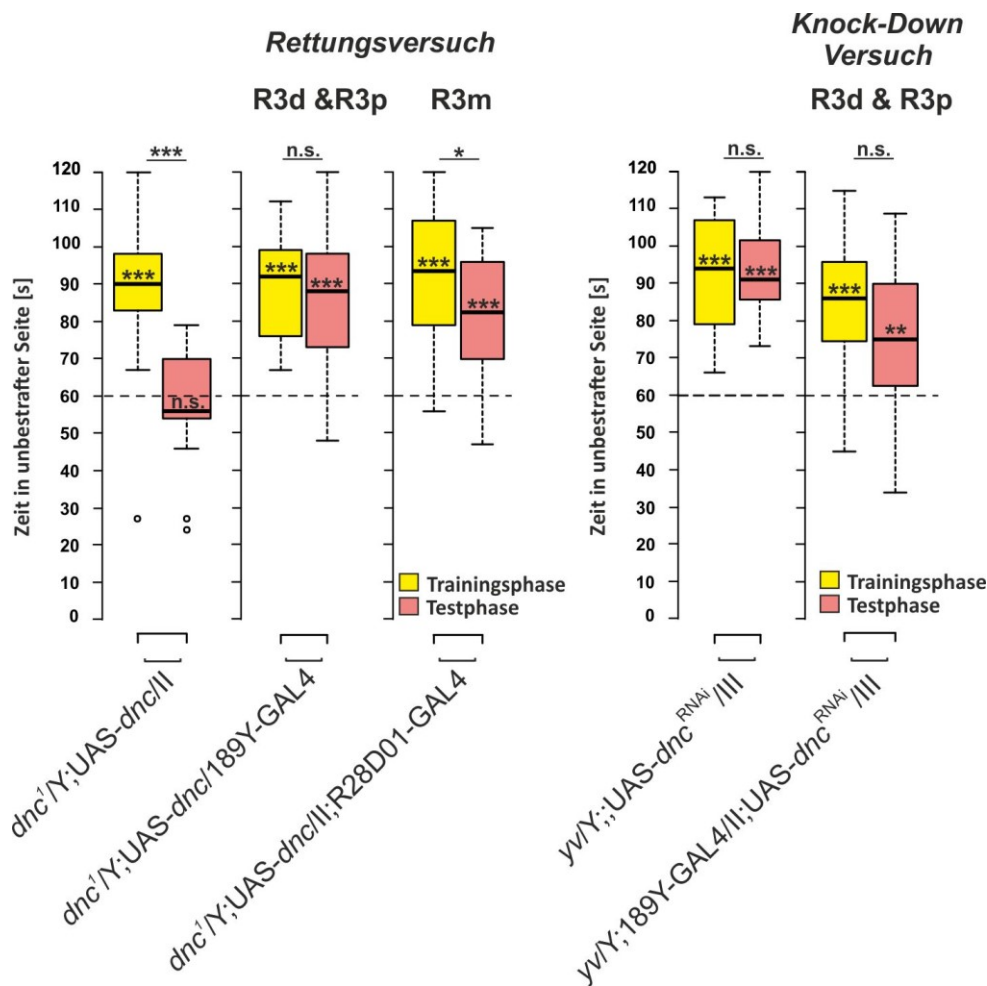


Abbildung 24: Idiothetische Orientierung im *IODA* nach Rettung oder Knock-Down von *dnc*^I in R3d & R3p, sowie R3m. Eine Expression von *dnc*-cDNA in, R3d & R3p oder R3m im mutanten Hintergrund rettet das Orientierungsgedächtnis, während ein Knock-Down in R3d & R3p das Orientierungsgedächtnis nicht negativ beeinflusst. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauern in der unbestrafter Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * : $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 10 und Tabelle 11. Treiberkontrolle siehe Abbildung 20.

3.5.1.6 *dnc* im Ringsystem R3 plus/minus

Die GAL4 Linie VT42759-GAL4 wird als in R3 exprimierender Treiber beschrieben (Lin et al. 2013), wobei eine Expression in anderen Ringsystemen nicht ausgeschlossen werden kann, bzw. in zu wenigen R3 spezifizierenden Zellkörpern GFP-Expression unter der Kontrolle dieses Treibers zu beobachten war (Expressionsmuster siehe Abbildung 50), sodass dieser Treiber in die Kategorie R3 minus eingeordnet wurde. Im Rettungsexperiment rettet eine Expression von *dnc* im mutanten Hintergrund das Orientierungsgedächtnis in der Testphase in R3 minus ($p=1,20e^{-05}$; $t=5,8658$; $n=20$) (Abbildung 25).

Ein Knockdown von *dnc*-mRNA im Ringsystem R3 plus über den Treiber R54B05-GAL4 hat keinen Einfluss auf das Orientierungsgedächtnis in der Testphase ($p=1,28e^{-04}$; $W=208$; $n=20$)

(Abbildung 24). Die Expression von GFP unter der Kontrolle von R54B05-GAL4 zeigt kein GFP-Signal im Zentralkomplex, wodurch es ebenfalls fraglich ist, ob dieser Treiber noch Aktivität besitzt oder ob alle Subsysteme des R3-Ringsystems, oder darüber hinaus noch weitere Ringsysteme, angesprochen werden (Expressionsmuster siehe Abbildung 49 und Abbildung 67). Eventuell sind aber auch hier nicht alle Genprodukte degradiert worden, wodurch das Orientierungsverhalten durch Restaktivität jener Genprodukte im Knock-Down Experiment aufrechterhalten werden konnte.

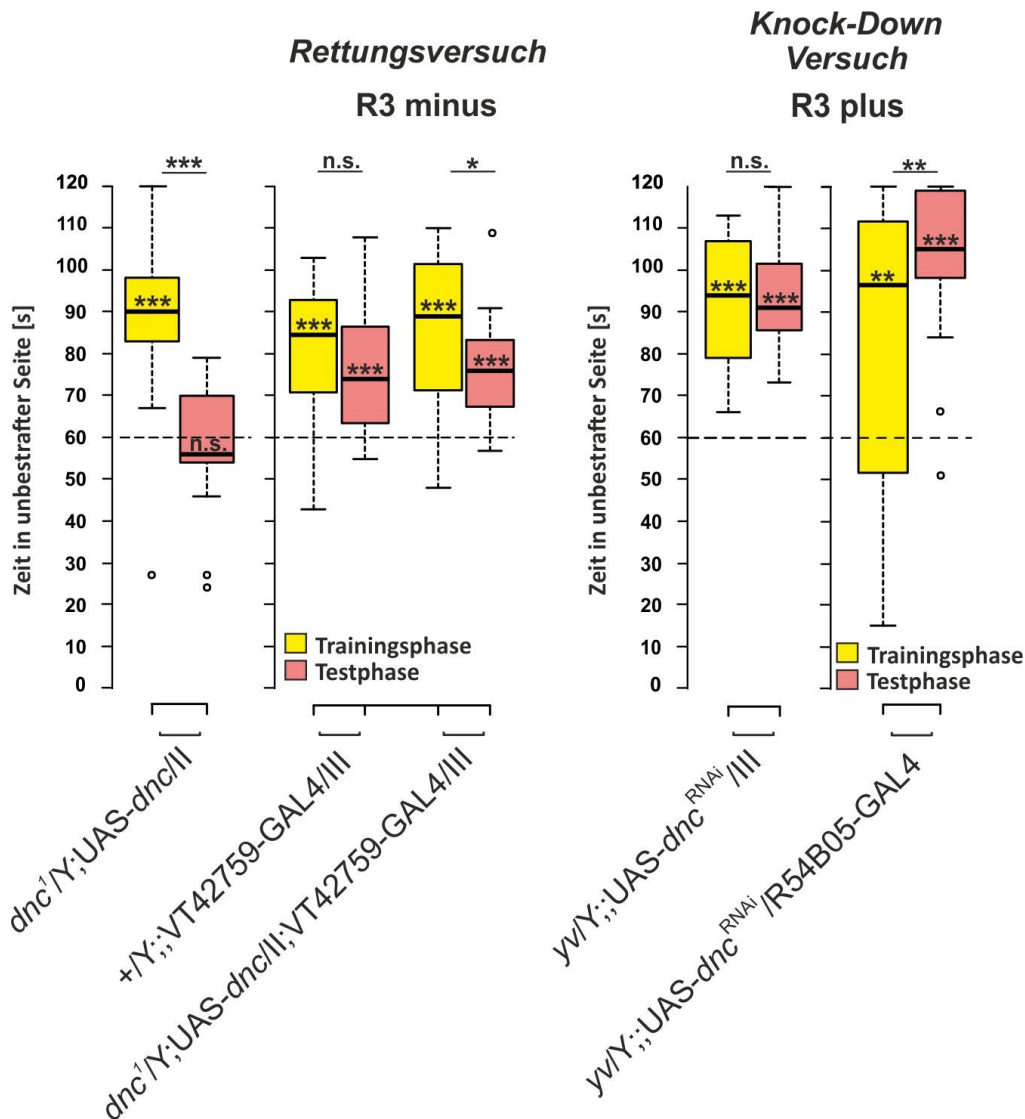


Abbildung 25: Idiopathische Orientierung im IODA nach Rettung von *dnc¹* oder Knock-Down von *dnc* in R3plus/minus. Eine Expression von *dnc*-cDNA in R3 minus führt zu einer Wiederherstellung des Orientierungsgedächtnisses. Jedoch resultiert ein Knock-Down von *dnc* in R3 plus nicht zu einem Verlust dieser Gedächtnisform. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestrafter Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *: $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 10 und Tabelle 11.

3.5.1.7 *dnc* im Ringsystem R4 minus

Der Treiber *ftz-ng-GAL4* ist spezifisch für das Ringsystem R4 und inkludiert die Subklassen R4d und R4m (mündliche Mitteilung B. Poeck,). Ob dieser Treiber auch noch in anderen Systemen exprimiert, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es ist aber anzunehmen, dass nicht alle Neurone des Ringsystems R4 adressiert werden, da in der immunhistologischen Analyse des Expressionsmusters nicht die postulierte Anzahl Zellkörper (Omoto et al. 2018) zu erkennen ist (Expressionsmuster siehe Abbildung 51). *dnc^l*-mutante Tiere, bei welchen unter der Kontrolle von *ftz-ng-GAL4* *dnc*-cDNA in R4 minus exprimiert wurde, zeigten keine Wiederherstellung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. In den letzten beiden Trainingsminuten hielten sie sich nicht signifikant länger in der unbestraften Seite auf ($p = 6,05e^{-12}$; $t = 12,426$; $n = 25$). Auch die Aufenthaltsdauer in jener Seite war in den anschließenden letzten beiden Testminuten nicht signifikant länger ($p = 0,7948$; $W = 135$) (Abbildung 26).

Auch ein Knock-Down von *dnc* in R4 minus über *ftz-ng-GAL4* hatte keinen Einfluss auf das idiothetische Gedächtnis. Sowohl in der Trainingsphase ($p = 2,44e^{-08}$; $t = 8,8337$; $n = 21$), als auch in den letzten beiden Testminuten hielten sich die Tiere höchst signifikant länger in der unbestraften Seite auf ($p = 1,02e^{-05}$; $t = 5,8468$). Die Aufenthaltszeiten in der unbestraften Seite von Trainings- und Testphase unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,05253$; $t = 2,0612$). Die Treiberkontrolle zeigte keinen Einfluss auf das Orientierungsgedächtnis in der Testphase ($p = 5,84e^{-03}$; $t = 3,0258$; $n = 25$) (Abbildung 26).

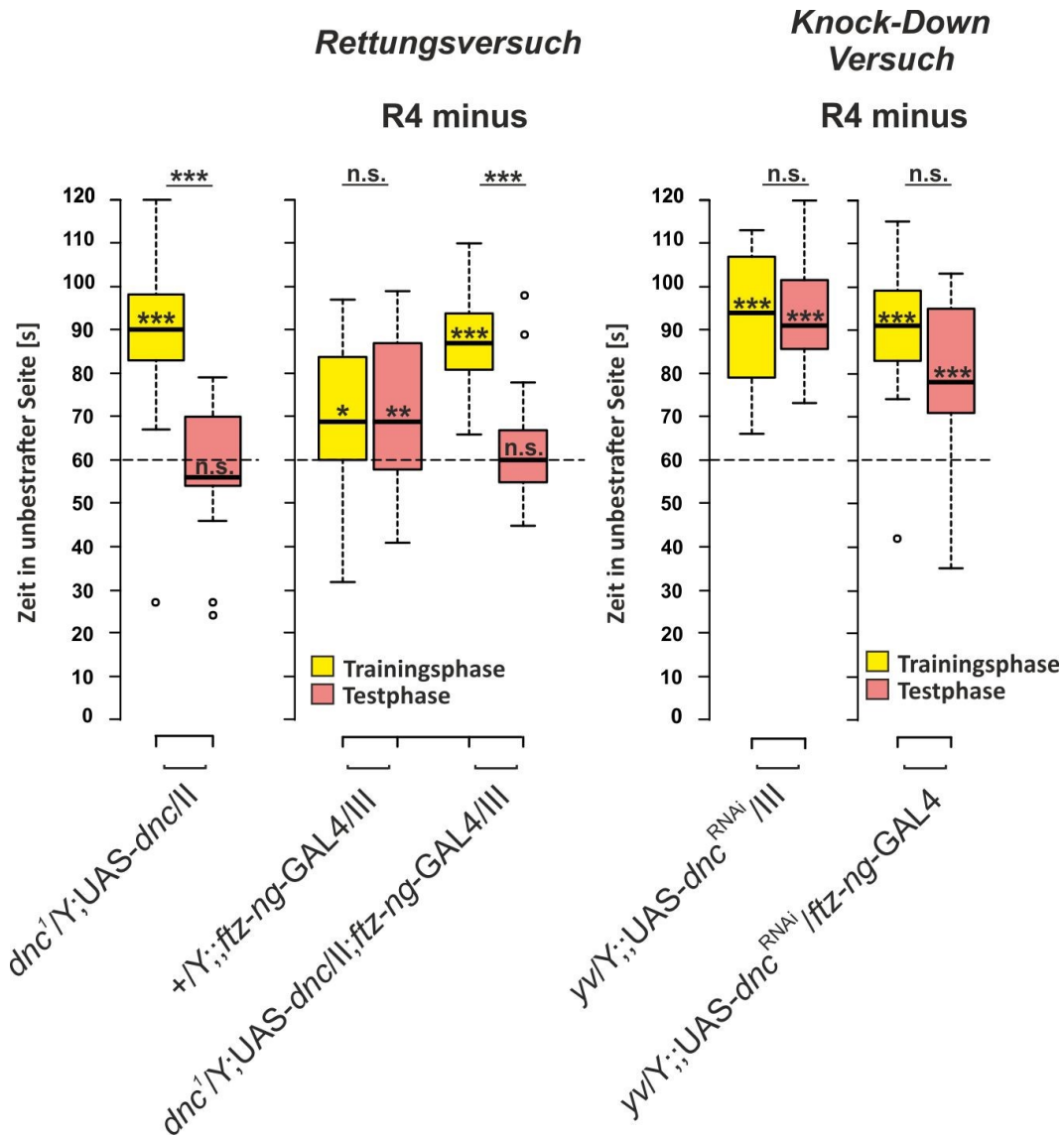


Abbildung 26: Idiothetische Orientierung im IODA nach Rettung von dnc^1 oder Knock-Down von dnc in R4 minus. Weder führt eine Expression von dnc -cDNA in R4 minus im mutanten Hintergrund zu einer Wiederherstellung des Orientierungsgedächtnisses, noch führt ein Knock-Down von dnc in jenem Ringsystem zu einem Verlust dieser Gedächtnisform. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestrafter Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *: $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 10 und Tabelle 11.

Tabelle 10 (nächste Seite): Statistische Werte nach Rettungsversuchen von dnc^1 in den verschiedenen Ringen des EK im IODA. Aus Abbildung 21 bis Abbildung 26. n= Anzahl getesteter Tiere; p= Signifikanzniveau; t-Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten); getestet wurde unter Rotlichtbedingungen.

| Genotyp | Ring | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|--|-------------|-----------------------------|--------|-----------|------------------------|---------|-----|-----------------------------------|----------|-----|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> /II n= 22 | | 2,76e ⁻⁰⁴ | | 239 | 0,599 | -0,5339 | | 2,43e ⁻⁰⁴ | | 240 |
| +Y;;R31A12- GAL4/III n= 18 | R1 | 1,81e ⁻⁰⁶ | 7,091 | | 1,08e ⁻⁰³ | | 146 | 0,5381 | | 63 |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> /II;R31A12- GAL4/III n= 18 | | 1,70e ⁻⁰³ | | 158 | 0,3399 | -0,9819 | | 6,52e ⁻⁰⁴ | | 149 |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> /II;198Y- GAL4/IV n= 20 | R1 plus | 1,07e ⁻⁰⁹ | 11,022 | | 6,58e ⁻⁰⁹ | 9,8625 | | 0,3894 | -0,88084 | |
| +Y;;VT039763- GAL4/III n= 20 | | 2,19e ⁻⁰⁷ | 7,8575 | | 9,48e ⁻⁰⁵ | | 210 | 0,1646 | | 130 |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> /II;VT039763- GAL4/III n= 19 | | 1,27e ⁻⁰⁶ | 7,1046 | | 5,84e ⁻⁰⁶ | 6,3247 | | 0,1383 | 1,5512 | |
| +Y;EB1-GAL4 n= 25 | R2 | 7,42e ⁻⁰⁴ | 3,8641 | | 8,71e ⁻⁰³ | 2,8562 | | 0,1704 | 1,4132 | |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> /EB1-GAL4 n= 22 | | 4,56e ⁻⁰⁹ | 9,519 | | 0,3461 | 0,9639 | | 6,84e ⁻⁰⁶ | 5,9355 | |
| +Y;;R19C08- GAL4/III n= 20 | R2 plus | 2,22e ⁻⁰⁹ | 10,545 | | 4,23e ⁻⁰⁵ | 5,2849 | | 0,12 | 1,6281 | |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> /II;R19C08- GAL4/III n= 20 | | 3,58e ⁻⁰³ | | 183, 5 | 0,6707 | 0,4318 | | 6,78e ⁻⁰³ | | 178 |
| +Y;;VT42759- GAL4/III n= 20 | R3 minus | 2,01e ⁻⁰⁶ | 6,7208 | | 1,25e ⁻⁰⁴ | 4,798 | | 0,08342 | 1,8272 | |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> /II;VT42759- GAL4/III n= 20 | | 7,08e ⁻⁰⁶ | 6,1127 | | 1,20e ⁻⁰⁵ | 5,8658 | | 0,02109 | 2,5144 | |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> ;189Y-GAL4 n= 22 | R3d, R3p | 4,79e ⁻¹⁰ | 10,82 | | 1,62e ⁻⁰⁶ | 6,5811 | | 0,325 | 1,0079 | |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> ;R28D01-GAL4 n= 18 | R3m | 2,81e ⁻⁰⁶ | 6,8523 | | 1,04e ⁻⁰⁴ | 5,0246 | | 0,01308 | 2,7709 | |
| +Y;;ftz-ng-GAL4/III n= 25 | R4 minus | 0,01266 | 2,6946 | | 5,84e ⁻⁰³ | 3,0258 | | 0,6484 | -0,46171 | |
| <i>dnc</i> ¹ /Y;UAS- <i>dnc</i> /II;ftz-ng- GAL4/III n= 25 | | 6,05e ⁻¹² | 12,426 | | 0,7948 | | 135 | 2,39e ⁻⁰⁵ | | 320 |

Tabelle 11: Statistische Werte nach Knock-Down von *dnc* mittels RNA-Interferenz in den verschiedenen Ringen des EK im *IODA*. Aus Abbildung 22 bis Abbildung 26. n= Anzahl getesteter Tiere; p= Signifikanzniveau; t-Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten); getestet wurde unter Rotlichtbedingungen.

| Genotyp | Ring | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|--|----------|--------------------------|--------|-----|----------------------|--------|-----|--------------------------------|----------|-------|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| <i>yv/Y;;UAS-dnc^{RNAi}/III</i> n= 23 | | 2,47e ⁻¹⁰ | 10,99 | | 2,37e ⁻¹¹ | 12,326 | | 0,8471 | -0,19505 | |
| <i>yv/Y;;UAS-dnc^{RNAi}/III;198Y-GAL4</i> n= 20 | R1 plus | 3,12e ⁻⁰⁴ | | 257 | 5,42e ⁻⁰⁵ | 4,9885 | | 0,3894 | | 153,5 |
| <i>yv/Y;EB1-GAL4/II;UAS-dnc^{RNAi}/III</i> n= 23 | R2 | 1,93e ⁻¹¹ | 12,457 | | 4,57e ⁻¹⁶ | 6,0277 | | 3,00e ⁻⁰⁴ | 4,2859 | |
| <i>yv/Y;189Y-GAL4/II;UAS-dnc^{RNAi}/III</i> n= 23 | R3d, R3p | 7,19e ⁻⁰⁸ | 7,905 | | 1,70e ⁻⁰³ | 3,5725 | | 0,07565 | 1,8645 | |
| <i>yv/Y;;UAS-dnc^{RNAi}/R54B05-GAL4</i> n= 20 | R3 plus | 6,03e ⁻⁰³ | | 179 | 1,28e ⁻⁰⁴ | | 208 | 3,99e ⁻⁰³ | | 23 |
| <i>yv/Y;;UAS-dnc^{RNAi}/ftz-ng-GAL4</i> n= 21 | R4 minus | 2,44e ⁻⁰⁸ | 8,8337 | | 1,02e ⁻⁰⁵ | 5,8468 | | 0,05253 | 2,0612 | |

3.5.2 *rut* in den Ringsystemen des Ellipsoidkörpers

Analog zu den Rettungs- und Knock-Down Experimenten zu *dnc*, wurde die Notwendigkeit des *rut*-Genproduktes in den einzelnen Ringsystemen des Ellipsoidkörpers untersucht. Für die Rettungsexperimente wurden Tiere des Stammes *rut¹/rut¹::UAS-rut/TM3,Sb* mit Männchen der GAL4-Linie gekreuzt, welche das Treiberkonstrukt für das gewünschte Ringsystem trägt. Für das RNA-Interferenzprojekt wurden Männchen der gewünschten Treiberlinie mit Weibchen gekreuzt, die das *UAS-rut^{RNAi}* Konstrukt tragen. Für die Experimente wurden männliche Fliegen der F1-Generation ohne Balancer verwendet.

Um eine das Verhalten beeinflussende Leckexpression auszuschließen, wurden, wie auch für die Experimente mit *dnc*, Weibchen der Effektorlinien mit CS Männchen gekreuzt und die F1-Generation im *IODA* getestet. Diese Kontrollgruppe *rut¹/Y;;UAS-rut/III*, zeigte eine Vermeidung der unbestraften Seite im Training ($p= 5,07e^{-06}$; $t= 5,9799$; $n= 23$) und unerwarteterweise eine signifikante Vermeidung der unbestraften Seite in der Testphase ($p= 0,013$; $t= -3,008$). Es wurde darüber hinaus auch eine Kontrollgruppe getestet, welche homozygot für das Effektorkonstrukt *UAS-rut* war. Auch sie zeigten eine signifikante Vermeidung der unbestraften Seite in der Testphase ($p= 0,042$; $t= -2,1618$, $n= 23$) und zwischen

den Testphasen der beiden Kontrollgruppen besteht kein signifikanter Unterschied ($p= 0,7819$; $t= -0,27855$) (Abbildung 27).

Für die Überprüfung der Leckexpression der Effektorline für die RNA-Interferenzexperimente wurden Fliegen des Genotyps $w/Y;;UAS-rut^{RNAi}/III$ getestet. Sie hielten sich in den letzten beiden Trainingsminuten ($p= 6,17e^{-13}$; $t= 14,831$; $n= 23$), wie auch in den letzten beiden Testminuten ($p= 6,71e^{-07}$; $t= 6,8697$) signifikant länger in der unbestraften Seite auf (Abbildung 27). Demnach ist auszuschließen, dass eine eventuelle Leckexpression einen Einfluss auf das Verhalten hat.

3.5.2.1 *rut* im Ringsystem R1

Wird *rut*-cDNA im mutanten Hintergrund im Muster von R31A12-GAL4 exprimiert, so konnten die Tiere zwar noch im Training die unbestrafte Seite bevorzugen ($p= 6,22e^{-07}$; $t= 7,6907$; $n= 18$), jedoch zeigten sie keine Präferenz für eine Seite in den letzten beiden Testminuten ($p= 0,6268$; $t= -0,49522$). Sie hielten sich in den beiden letzten Trainingsminuten signifikant länger in der unbestraften Seite auf, verglichen mit den letzten Testminuten ($p= 5,46e^{-05}$; $t= 5,3357$) (Abbildung 27).

Rettungsversuch

R1

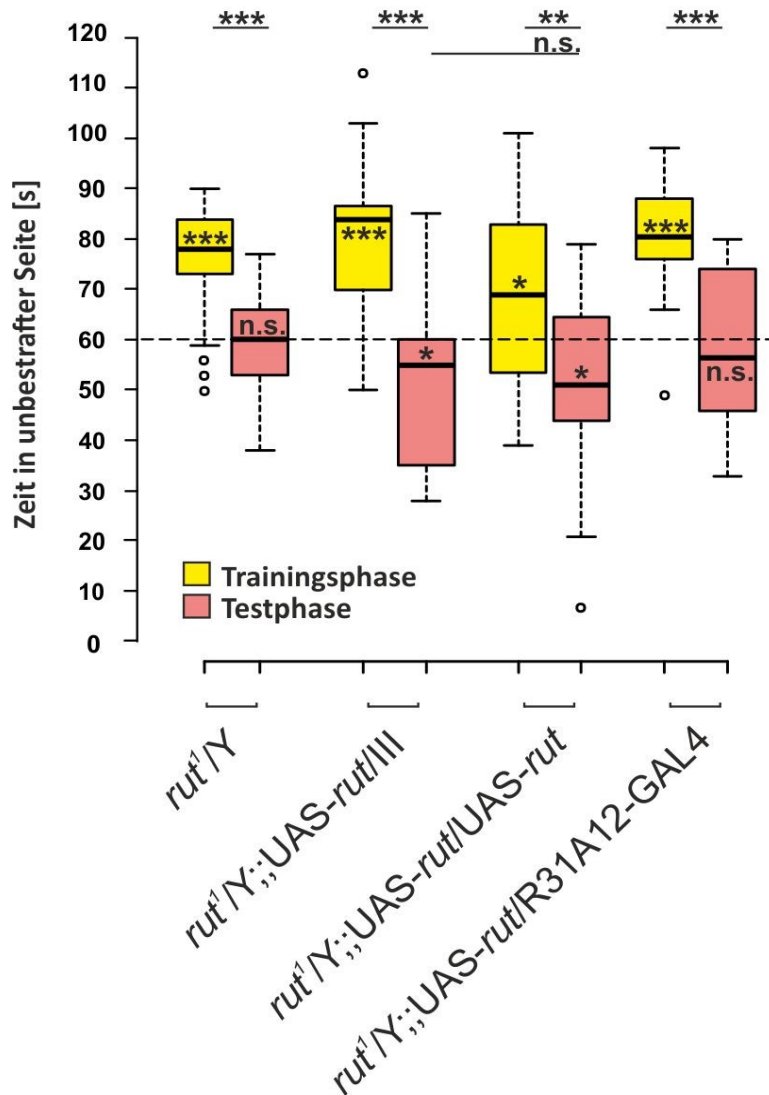


Abbildung 27: Idiopathische Orientierung im *IODA* nach Rettung von *rut* in R1 im *rut¹*-mutanten Hintergrund. Eine Expression von *rut*-cDNA in R1 führt zu keiner Rettung des Orientierungsgedächtnisses. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *: $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. $n =$ siehe Tabelle 12. Treiberkontrolle siehe Abbildung 21.

3.5.2.2 *rut* im Ringsystem R1 plus

Die Expression von *rut*-cDNA unter der Kontrolle der R1 plus Treiber 198Y-GAL4, bzw. VT039763-GAL4 im *rut*^l-mutanten Hintergrund, führte zu einer Wiederherstellung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Tiere des Genotyps *rut*^l/Y;;UAS-*rut*/III;198Y-GAL4/IV bevorzugten sowohl in der Trainingsphase ($p=6,87e^{-05}$; $t=4,764$; $n=26$), als auch in den letzten beiden Testminuten ($p=1,17e^{-05}$; $t=5,4511$) höchst signifikant die unbestrafte Seite. Zwischen Trainings- und Testphase zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer ($p=0,7395$; $t=0,33625$) (Abbildung 27). Ähnliche Resultate lieferte auch die Expression von *rut*-cDNA unter der Kontrolle des zweiten R1 plus-Treibers VT039763-GAL4. Die Fliegen des Genotyps *rut*^l/Y;;UAS-*rut*/VT039763-GAL4 hielten sich in den letzten beiden Trainingsminuten ($p=1,26e^{-09}$; $t=10,917$; $n=20$), wie auch in den letzten beiden Minuten des Tests ($p=3,85e^{-06}$; $t=6,4038$) höchst signifikant länger in der unbestraften Seite auf. Auch hier besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Trainings- und Testphase ($p=0,1627$; $t=1,4523$) (Abbildung 28).

Eine Degradierung von *rut*-mRNA im Ringsystem R1 plus führte, unter der Kontrolle von 198Y-GAL4, zu einem Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses, während sich unter VT039763-GAL4 kein Einfluss auf diese Orientierungsgedächtnisform zeigte. Die Expression von *rut*^{RNAi} unter 198Y-GAL4 führte bei den Tieren zu einer Beibehaltung der idiothetischen Orientierung in den letzten beiden Trainingsminuten ($p=1,02e^{-05}$; $t=5,6877$; $n=23$), jedoch bevorzugten sie in der anschließenden Testphase nicht mehr die unbestrafte Seite ($p=0,9478$; $t=0,066213$). Auch die Aufenthaltsdauern in der unbestraften Seite unterscheiden sich zwischen Trainings- und Testphase höchst signifikant ($p=3,76e^{-05}$; $t=5,14$) (Abbildung 28).

Unter der Kontrolle von VT039763-GAL4 präferierten die Tiere in den letzten beiden Trainingsminuten die unbestrafte Seite höchst signifikant ($p=4,74e^{-06}$; $t=6,304$; $n=20$), aber im Gegensatz zu UAS-*rut*^{RNAi} unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 hielten sich die Tiere auch signifikant länger in der unbestraften Seite in der Testphase auf ($p=5,87e^{-07}$; $t=7,3406$). Trainings- und Testphase unterscheiden sich nicht signifikant in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ($p=0,6063$; $V=0,52407$) (Abbildung 28). Der Unterschied der Knock-Down Ergebnissen mit den beiden R1 plus Treibern könnte einem Unterschied im Expressionsmuster geschuldet sein. *rut* könnte unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 in weiteren Strukturen herunterreguliert worden sein, welche für die Ausbildung des idiothetischen Gedächtnisses verantwortlich sind. Auch hier ist zu beachten, dass unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 keine Expression von GFP in der immunhistologischen Untersuchung zu erkennen ist (Expressionsmuster siehe Abbildung 43). Zu beachten ist, dass zwischen den Verhaltensexperimenten mit diesem Treiber und der anschließenden immunhistologischen Untersuchung einige Monate lagen.

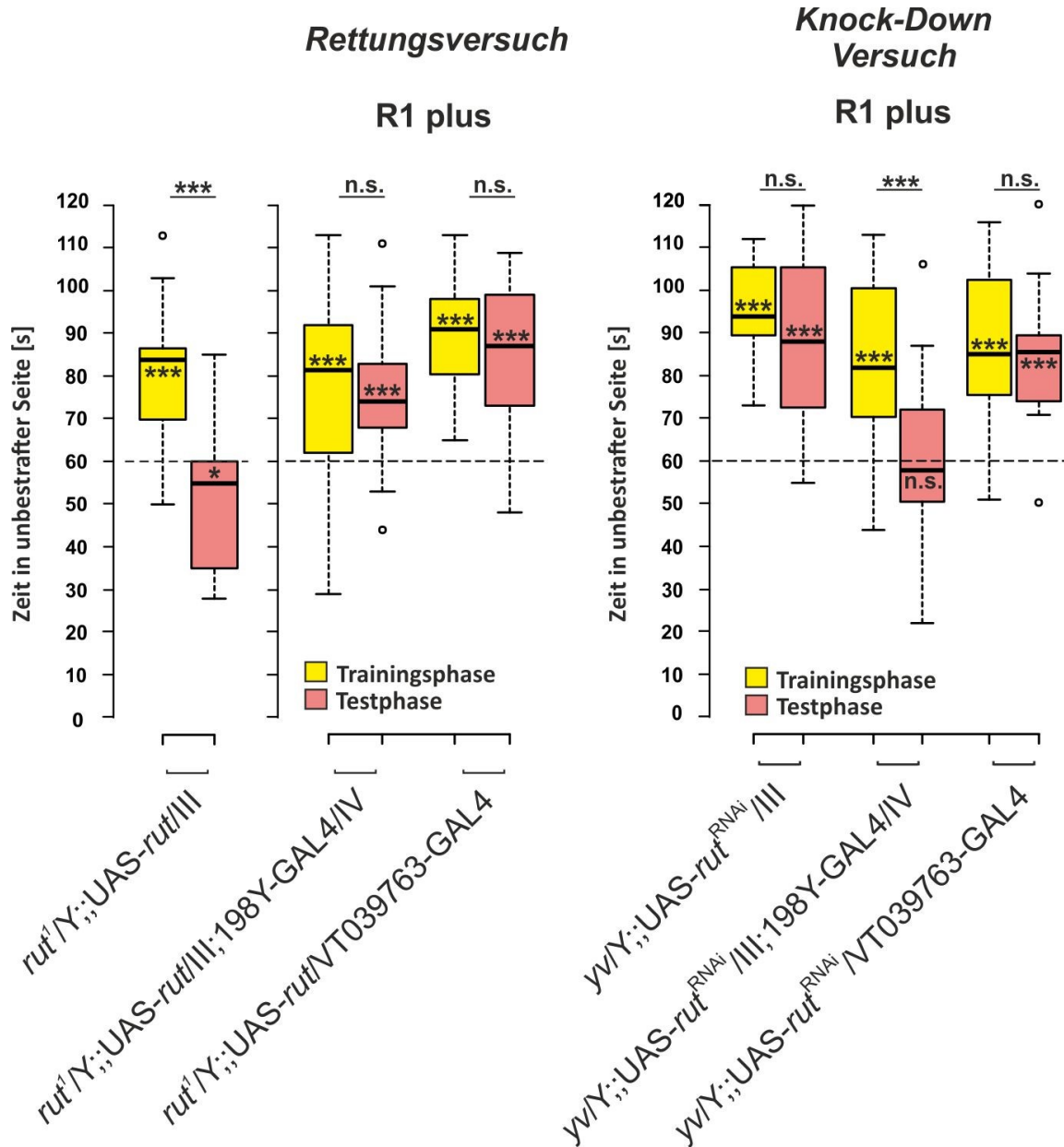


Abbildung 28: Idiopathetische Orientierung im *IODA* nach Rettung von *rut¹* oder Knock-Down von *rut* in R1 plus. Eine Expression von *rut*-cDNA führt sowohl mit dem Treiber 198Y-GAL4, wie auch mit VT039763-GAL4 zu einer Rettung des Orientierungsgedächtnisses im mutanten Hintergrund. Jedoch führt eine Degradierung der *rut*-mRNA nur über 198Y-GAL4 zu einem Verlust des Orientierungsgedächtnisses. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 12 und Tabelle 13. Treiberkontrollen siehe Abbildung 22.

3.5.2.3 *rut* im Ringsystem R2

Unter der Kontrolle des R2 spezifischen Treibers EB1-GAL4 war eine Rettung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses möglich. Wird *rut*-cDNA im mutanten Hintergrund in R2 unter der Kontrolle von EB1-GAL4 exprimiert, so bevorzugten die Tiere in den letzten beiden Trainingsminuten die unbestrafte Seite ($p= 3,17e^{-08}$; $W= 1008$; $n= 45$). Auch in den letzten beiden Minuten des Tests hielten sie sich signifikant länger dort auf ($p= 2,21e^{-05}$; $t= 4,7569$), wobei sich die Aufenthaltsdauer zwischen Trainingsphase und Testphase hoch signifikant unterscheiden ($p= 1,90e^{-03}$; $V= 761,5$) (Abbildung 29). Auch der Knock-Down von *rut*-mRNA im Ringsystem R2 unter der Kontrolle von EB1-GAL4 hat einen Einfluss auf das Orientierungsgedächtnis. Nach Degradierung des *rut*-Genproduktes verlieren die Tiere ihr Orientierungsgedächtnis in der Testphase ($p= 2,77e^{-04}$; $W= 258$; $n= 24$), während die Orientierungsfähigkeit in der Trainingsphase erhalten bleibt ($p= 0,7866$; $t= -0,2740$) (Abbildung 29).

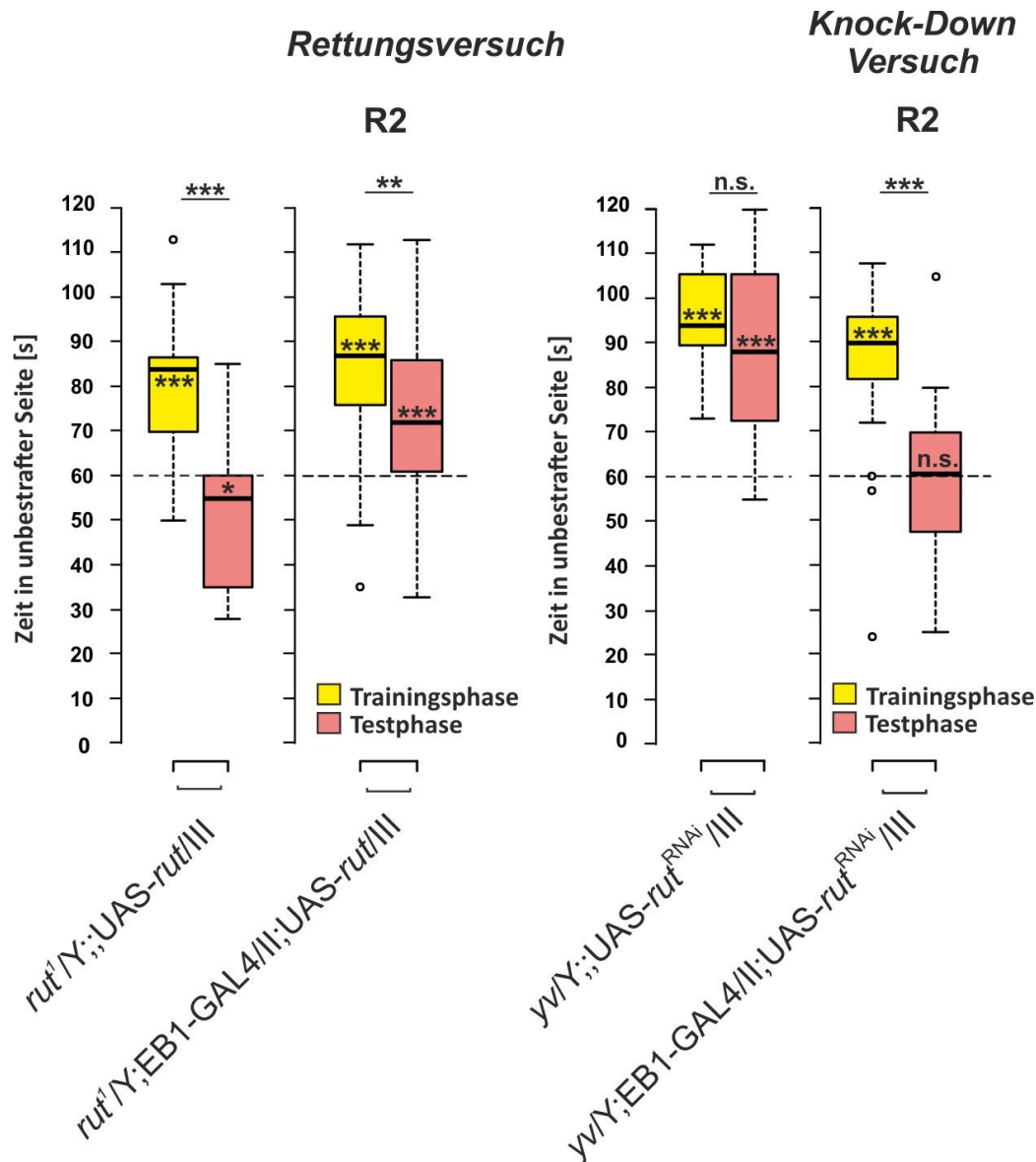


Abbildung 29: Idiothetische Orientierung im *IODA* nach Rettung von *rut*¹ oder Knock-Down von *rut* in R2. Eine Expression von *rut*-cDNA in R2 führt zu einer Rettung des Orientierungsgedächtnisses im mutanten Hintergrund. Ein Knock-Down von *rut* in R2 zerstört das Orientierungsgedächtnis. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *: $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 12 und Tabelle 13. Treiberkontrolle siehe Abbildung 23.

3.5.2.4 *rut* im Ringsystem R2 plus/minus

Im Rettungsexperiment mit dem R2 plus Treiber R19C08-GAL4, konnte das idiothetische Orientierungsgedächtnis nach Expression von *rut*-cDNA im mutanten Hintergrund ebenfalls wiederhergestellt werden. Die Tiere zeigten sowohl im Trainingsphase ($p = 1,27e^{-10}$; $t = 12,514$; $n = 20$), wie auch in der Testphase ($p = 7,39e^{-04}$; $t = 4,0159$) eine höchst signifikante Bevorzugung der unbestraften Seite, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen den

Aufenthaltszeiten von Trainings- und Testphase besteht ($p= 0,01721$; $t= 2,6102$) (Abbildung 30). Im Gegensatz hierzu fand bei Verwendung des R2 minus Treibers VT49921-GAL4 keine Rettung statt. Zwar bevorzugten die Tiere im Training die unbestrafte Seite höchst signifikant ($p= 2,59e^{-10}$; $t= 10,585$; $n= 24$), jedoch war in den letzten beiden Testminuten keine längere Aufenthaltsdauer in jener Seite zu beobachten ($p= 0,2512$; $t= -1,177$). Die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ist in der Trainingsphase höchst signifikant länger, verglichen mit der Testphase ($p= 4,25e^{-10}$; $t= 10,315$) (Abbildung 30).

Überraschenderweise führte aber die Expression von rut^{RNAi} unter der Kontrolle von VT49921-GAL4 zu einem Verlust des idiothetischen Gedächtnisses. Im Training bevorzugten die $w/Y;;VT49921-GAL4/UAS-rut^{RNAi}$ Tiere die unbestrafte Seite höchst signifikant ($p= 4,27e^{-05}$; $W= 253$; $n= 22$), doch in den letzten beiden Testminuten war keine Seitenpräferenz mehr zu erkennen ($p= 0,4716$; $t=-0,73317$). Die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ist im Training höchst signifikant länger, verglichen mit der Testphase ($p= 1,88e^{-04}$; $V= 242$) (Abbildung 30).

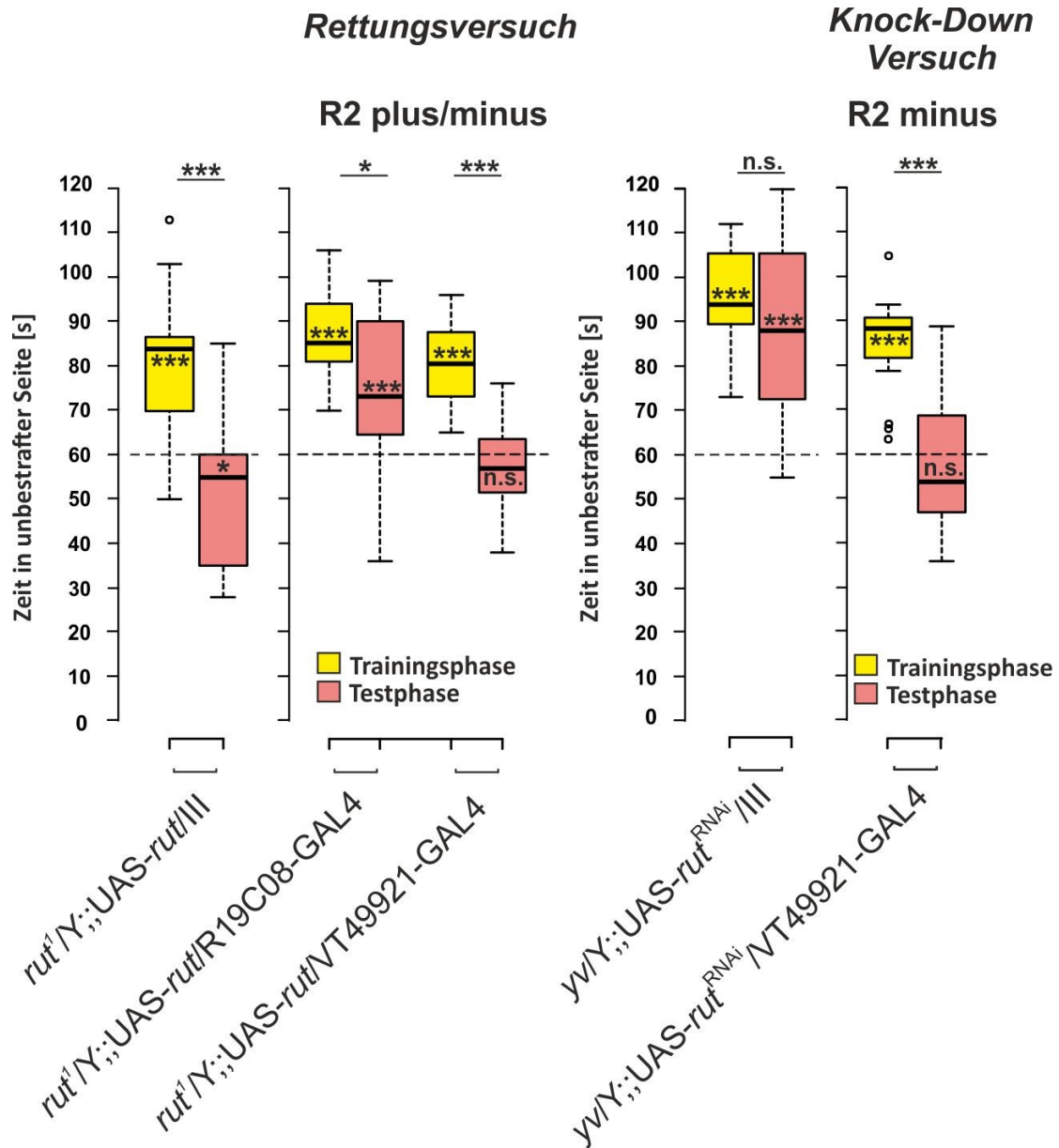


Abbildung 30: Idiothetische Orientierung im *IODA* nach Rettung von *rut¹* oder Knockdown von *rut* in R2 plus. Eine Expression von *rut*-cDNA in R2 plus mit R19C08-GAL4 im mutanten Hintergrund führt zu einer Rettung des Orientierungsgedächtnisses, jedoch nicht mit VT49921-GAL4. Ein Knock-Down von *rut* in R2 plus mit VT49921-GAL4 zerstört das Orientierungsgedächtnis. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestrafter Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 12 und Tabelle 13. Treiberkontrollen siehe Abbildung 23.

3.5.2.5 *rut* im Ringsystem R3m und R3dp

Die Expression von *rut*-cDNA im mutanten Hintergrund unter der Kontrolle des R3m spezifischen Treibers R28D01-GAL4 (Omoto et al. 2018) führte zu einer Wiederherstellung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Eine Bevorzugung der unbestraften Seite fand sowohl in den letzten beiden Trainings- ($p= 2,09e^{-04}$; $W= 171$; $n= 18$), als auch in den Testminuten ($p= 6,87e^{-05}$, $t= 5,2243$) statt, Test- und Trainingsphase unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p= 0,7761$; $V= 74$) (Abbildung 31).

In den Ringsystemen R3d und R3p scheint *rut* keine Rolle zu spielen. Im Rettungsexperiment von *rut^l* unter der Kontrolle des für diese Ringsysteme spezifischen Treibers 189Y-GAL4 im mutanten Hintergrund, ließ sich keine erfolgreiche Rettung des Orientierungsgedächtnisses erkennen. Die Tiere des Genotyps *rut^l/Y;189Y-GAL4/II;UAS-rut/III* zeigten zwar eine Orientierung in die unbestrafte Seite in der Trainingsphase ($p= 2,59e^{-03}$; $W= 237,5$; $n= 23$), jedoch war in den letzten beiden Minuten des Tests keine Seitenpräferenz zu erkennen ($p= 0,6913$; $t= 0,40238$). Auch war die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in der Trainingsphase signifikant länger, verglichen mit der Testphase ($p= 7,42e^{-03}$; $V= 226,5$) (Abbildung 31). Auch ein Knock-Down von *rut* in den Subsystemen R3d und R3p mit 189Y-GAL4 hatte keinen signifikanten Einfluss auf das idiothetische Orientierungsgedächtnis. Die Tiere konnten sowohl in den letzten beiden Trainings- ($p= 4,57e^{-11}$; $t= 11,913$; $n= 23$), als auch Testminuten ($p= 1,60e^{-09}$; $t= 9,8464$) die unbestrafte Seite höchst signifikant bevorzugen, ein signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer besteht nicht zwischen Trainings- und Testphase ($p= 0,9483$; $t= 0,065546$) (Abbildung 31).

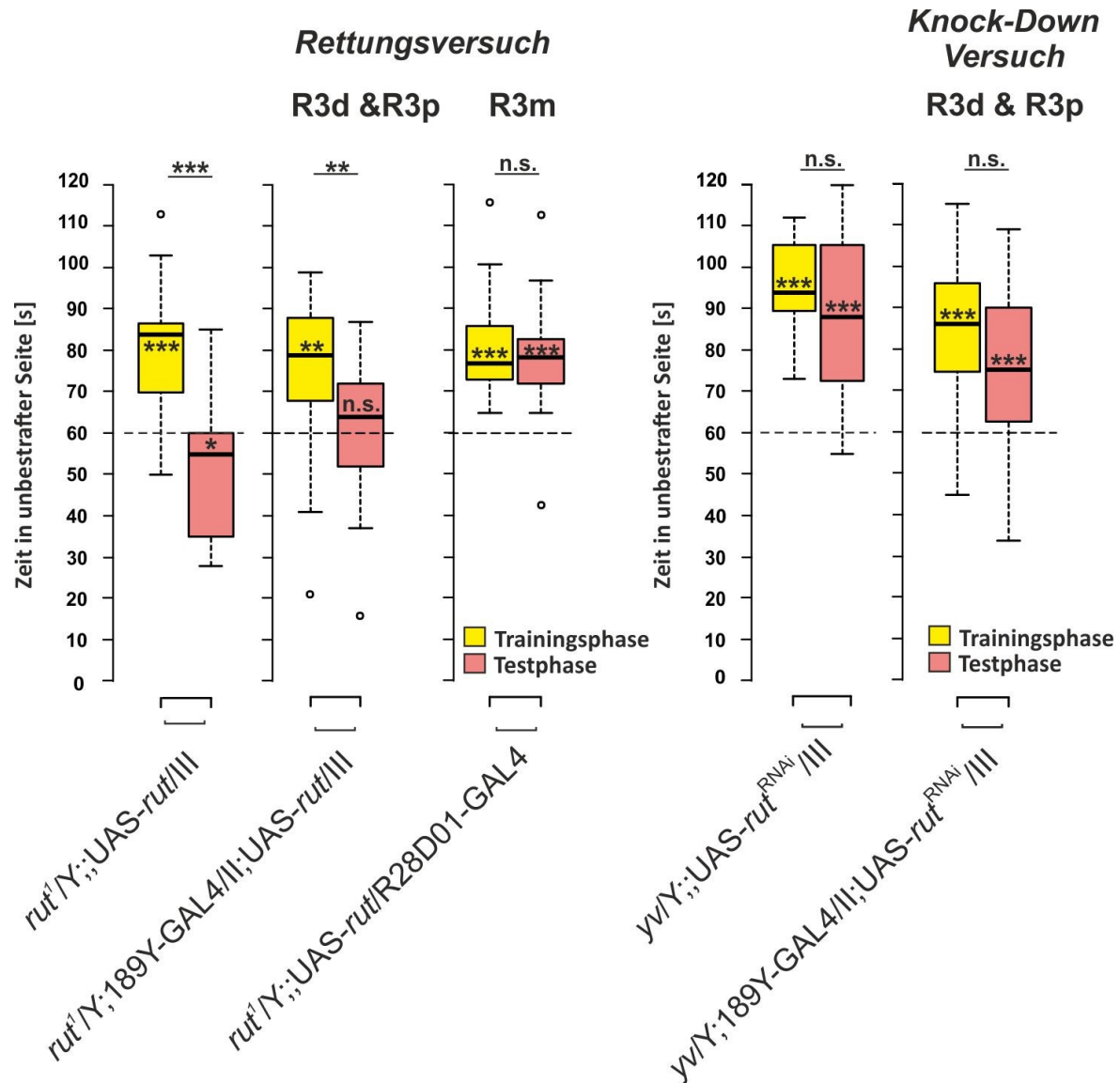


Abbildung 31: Idiothetische Orientierung im *IODA* nach Rettung von *rut*¹ oder Knockdown von *rut* in R3m und R3d & R3p. Eine Expression von *rut*-cDNA in R3d & R3p, wie auch in R3m im mutanten Hintergrund, führt zu einer Rettung des Orientierungsgedächtnisses (A). Ein Knock-Down von *rut* in R3d & R3p mit 189Y-GAL4 zerstört das Orientierungsgedächtnis jedoch nicht (B). Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 12 und Tabelle 13. Treiberkontrolle siehe Abbildung 20.

3.5.2.6 *rut* im Ringsystem R3 plus/minus

Mit den beiden Treibern VT42759-GAL4 für R3 minus und R54B05-GAL4 für R3 plus, konnte das idiothetische Orientierungsgedächtnis im Rettungsexperiment nicht wiederhergestellt werden. Tiere des Genotyps $rut^1/Y;;VT42759-GAL4/UAS-rut$ zeigten zwar eine höchst signifikant längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten ($p = 2,38e^{-08}$; $t = 9,0929$; $n = 20$), jedoch nicht in den letzten Testminuten ($p = 0,07254$; $t = 1,9013$), auch war die Aufenthaltsdauer in jener Seite in der Trainingsphase

verglichen mit der Testphase signifikant länger ($p= 2,18e^{-03}$; $t= 3,5422$). Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die Tiere *rut^l/Y;;R54B05-GAL4/UAS-rut*. In der Trainingsphase wurde zwar die unbestrafte Seite höchst signifikant bevorzugt ($p= 2,72e^{-10}$; $t= 11,165$; $n= 22$), jedoch nicht mehr in den letzten beiden Testminuten ($p= 0,2229$; $t= -1,256$), welche sich in der Aufenthaltsdauer auch höchst signifikant von den Trainingsminuten unterscheiden ($p= 1,87e^{-08}$; $t= 8,7601$) (Abbildung 32).

Auch konnte mit dem Treiber R54B05-GAL4, ähnlich wie mit dem R2 minus Treiber VT49921-GAL4, zwar keine erfolgreiche Rettung durchgeführt werden, jedoch war ein Knock-Down von *rut*-mRNA möglich. Die Tiere präferierten zwar in den letzten beiden Trainingsminuten noch die unbestrafte Seite höchst signifikant ($p= 5,74e^{-04}$; $W= 233$; $n= 22$), das war in den letzten beiden Testminuten aber nicht mehr der Fall ($p= 0,2908$; $t= 1,0836$). Der Unterschied in der Aufenthaltsdauer zwischen Trainings- und Testphase ist signifikant unterschiedlich ($p=1,33e^{-03}$; $V= 226$). Zu beachten ist auch hier, das R54B05-GAL4 keine GFP-Signal in der immunhistologischen Untersuchung zeigt (Abbildung 49 und Abbildung 67). Zwischen den Verhaltensexperimenten mit diesem Treiber und der anschließenden immunhistologischen Untersuchung lagen jedoch einige Monate.

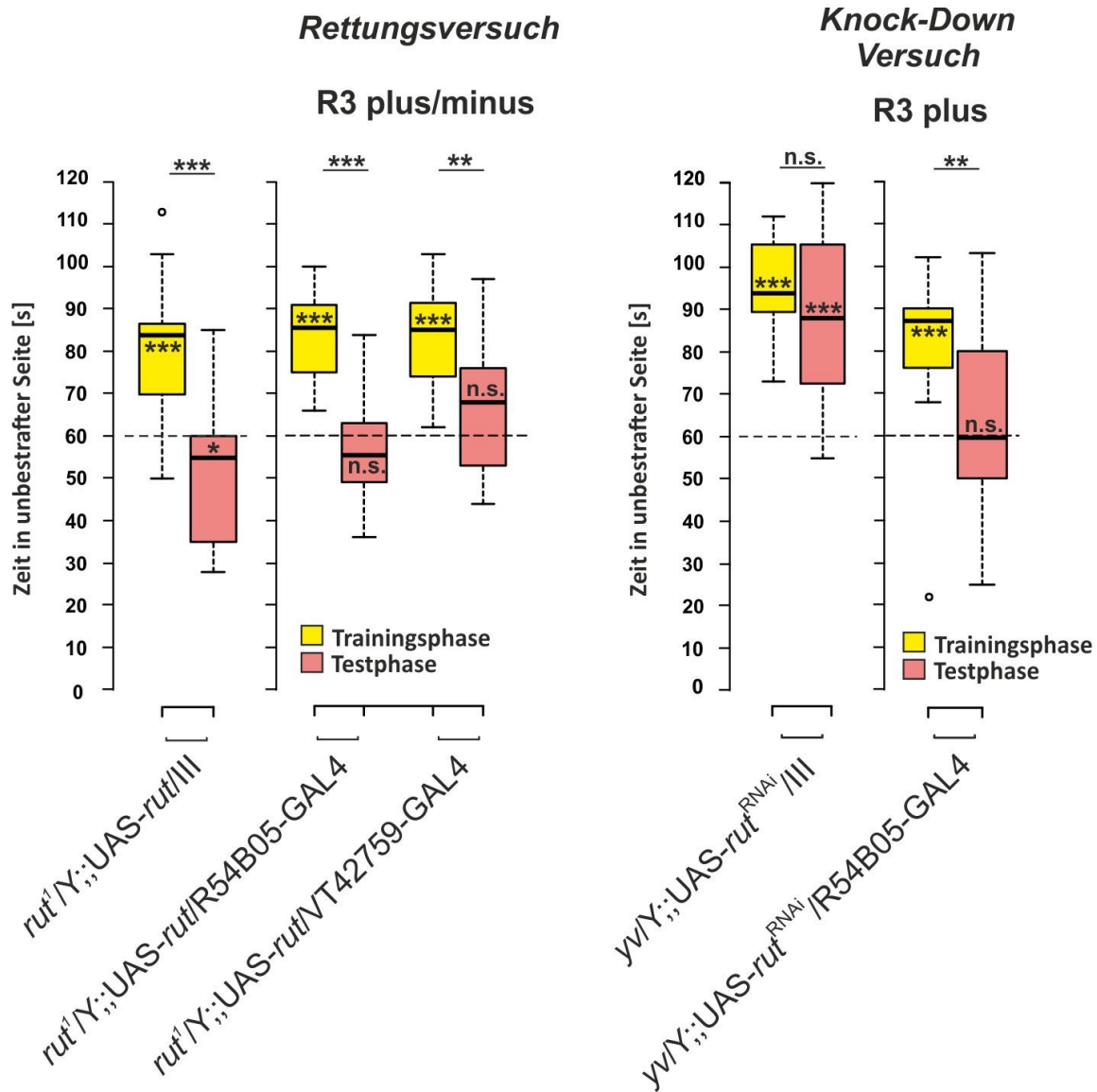


Abbildung 32: Idiothetische Orientierung im *IODA* nach Rettung von *rut^l* oder Knockdown von *rut* in R3 plus/minus. Eine Expression von *rut*-cDNA in R3 minus mit VT42759-GAL4 im mutanten Hintergrund, führt zu einer Rettung des Orientierungsgedächtnisses, jedoch nicht in R3 plus mit R54B05-GAL4. Ein Knock-Down von *rut* mit R54B05GAL4 zerstört jedoch das Orientierungsgedächtnis. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *: $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 12 und Tabelle 13. Treiberkontrollen siehe Abbildung 25.

3.5.2.7 *rut* im Ringsystem R4 minus

Im Ringsystem R4 minus wird *rut*, ebenso wie *dnc*, nicht für die idiothetische Orientierung benötigt. Mit dem R4 plus Treiber *ftz-ng-GAL4* führte die Expression von *rut*-cDNA im mutanten Hintergrund nicht zu einer erfolgreichen *rut* Wiederherstellung des idiothetischen Gedächtnisses. Im Rettungsexperiment bevorzugten $rut^l/Y::ftz-ng-GAL4/UAS-rut$ Tiere zwar

in der Trainingsphase die unbestrafte Seite höchst signifikant ($p= 3,76e^{-04}$; $t= 4,1624$; $n= 24$), jedoch nicht in der Testphase ($p= 0,3263$, $t= 1,0029$). Auch der Unterschied in der Aufenthaltsdauer zwischen Trainings- und Testphase ist signifikant ($p= 0,04045$; $t= 2,1715$) (Abbildung 33).

Im Knock-Down Experiment mit *ftz-ng-GAL4* war ebenfalls kein Effekt auf das idiothetische Orientierungsgedächtnis zu beobachten. Sowohl in den letzten beiden Trainings- ($p= 2,48e^{-11}$; $t= 12,299$; $n= 23$), wie auch Testminuten ($p= 9,38e^{-09}$; $t= 8,9134$) war eine höchst signifikante Präferenz für die unbestrafte Seite zu beobachten. Zwischen Training und Test bestand kein signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ($p= 0,114$; $t= 1,6483$) (Abbildung 33)

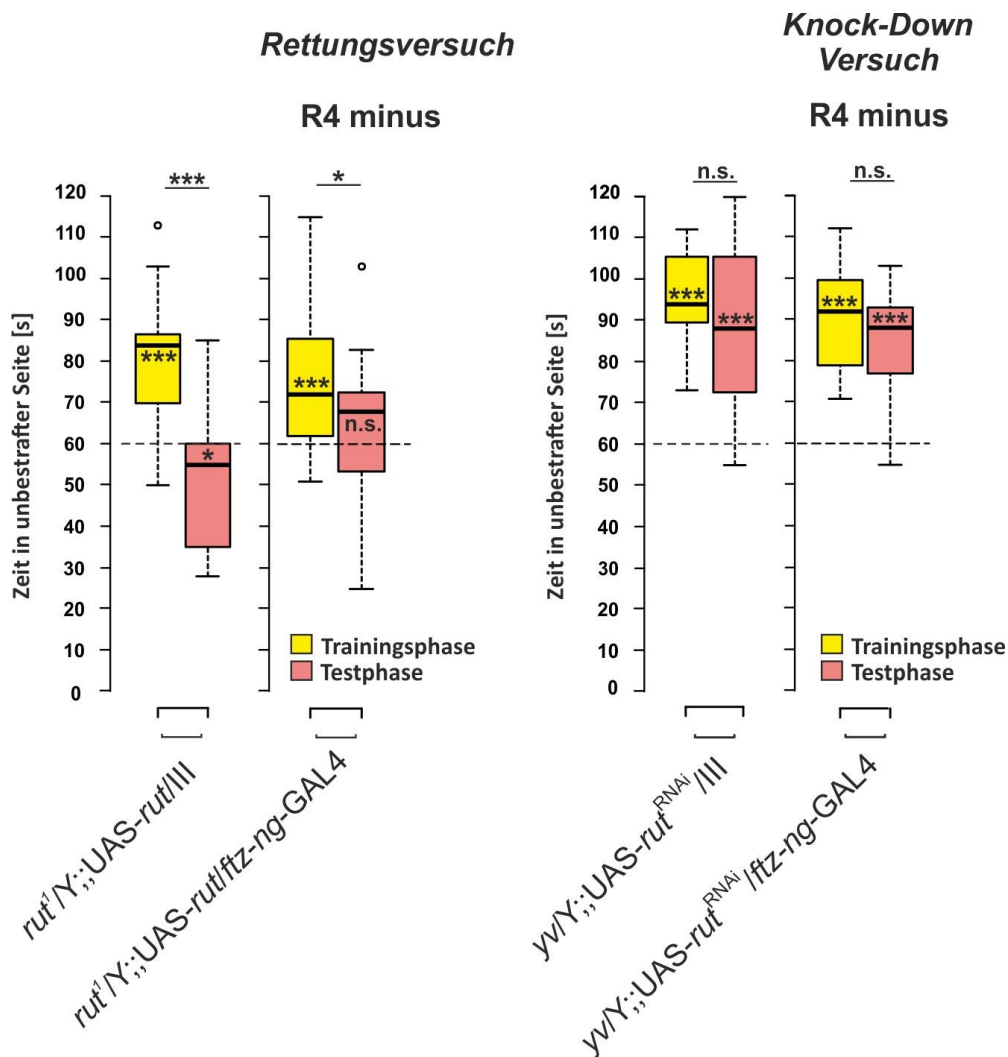


Abbildung 33: Idiopathetic Orientierung im IODA nach Rettung von *rut*¹ oder Knockdown von *rut* in R4 minus. Eine Expression von *rut*-cDNA in R4 minus im mutanten Hintergrund, führt zu keiner Rettung des Orientierungsgedächtnisses. Ein Knock-Down von *rut* in R4 minus zerstört das Orientierungsgedächtnis nicht. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. $n=$ siehe Tabelle 12 und Tabelle 13. Treiberkontrolle siehe Abbildung 25.

Tabelle 12: Statistische Werte nach Rettungsversuchen von *rut^l* in den verschiedenen Ringen des EK im IODA. Aus Abbildung 27 bis Abbildung 33. n= Anzahl getesteter Tiere; p= Signifikanzniveau; t-Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten); getestet wurde unter Rotlichtbedingungen.

| Genotyp | Ring | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|---|------------|--------------------------|--------|-------|----------------------|---------|---|--------------------------------|--------|-------|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/III</i> n= 23 | | 5,07e ⁻⁰⁶ | 5,9799 | | 6,58e ⁻⁰³ | -3,008 | | 7,99e ⁻⁰⁷ | 6,7916 | |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/UAS-<i>rut</i></i> n= 23 | | 0,02778 | 2,3563 | | 0,04178 | -2,1618 | | 2,65e ⁻⁰³ | 3,387 | |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/R31A12-GAL4</i> n= 18 | R1 | 6,22e ⁻⁰⁷ | 7,6907 | | 0,6268 | -0,4952 | | 5,46e ⁻⁰⁵ | 5,3357 | |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/III;;198Y-GAL4/IV</i> n= 26 | R1 plus | 6,87e ⁻⁰⁵ | 4,764 | | 1,17e ⁻⁰⁵ | 5,4511 | | 0,7395 | 0,3363 | |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/VT039763-GAL4</i> n=20 | | 1,26e ⁻⁰⁹ | 10,917 | | 3,85e ⁻⁰⁶ | 6,4038 | | 0,1627 | 1,4523 | |
| <i>rut^l/Y;EB1-GAL4/II;UAS-<i>rut</i>/III</i> n= 45 | R2 | 3,17e ⁻⁰⁸ | | 1008 | 2,21e ⁻⁰⁵ | 4,7569 | | 1,90e ⁻⁰³ | | 761,5 |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/R19C08-GAL4</i> n= 20 | R2 plus | 1,27e ⁻¹⁰ | 12,514 | | 7,39e ⁻⁰⁴ | 4,0159 | | 0,01721 | 2,6102 | |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/VT49921-GAL4</i> n= 24 | R2 minus | 2,59e ⁻¹⁰ | 10,585 | | 0,2512 | -1,177 | | 4,25e ⁻¹⁰ | 10,315 | |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/VT42759-GAL4</i> n= 20 | R3 minus | 2,72e ⁻¹⁰ | 11,165 | | 0,2229 | -1,256 | | 1,87e ⁻⁰⁸ | 8,7601 | |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/R54B05-GAL4</i> n= 22 | R3 plus | 2,38e ⁻⁰⁸ | 9,0929 | | 0,07254 | 1,9013 | | 2,18e ⁻⁰³ | 3,5422 | |
| <i>rut^l/Y; 189Y-GAL4/II;UAS-<i>rut</i>/III</i> n= 23 | R3d R3p | 2,59e ⁻⁰³ | | 237,5 | 0,6913 | 0,40238 | | 7,42e ⁻⁰³ | | 226,5 |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/R28D01-GAL4</i> n= 18 | R3m | 2,09e ⁻⁰⁴ | | 171 | 6,87e ⁻⁰⁵ | 5,2243 | | 0,7761 | | 74 |
| <i>rut^l/Y;;UAS-<i>rut</i>/ftz-ng-GAL4</i> n=24 | R4 | 3,76e ⁻⁰⁴ | 4,1624 | | 0,3263 | 1,0029 | | 0,04045 | 2,1715 | |

Tabelle 13: Statistische Werte nach Knock-Down von *rut* mittels RNA-Interferenz in den verschiedenen Ringen des EK im *IODA*. Aus Abbildung 28 bis Abbildung 33. n= Anzahl getesteter Tiere; p= Signifikanzniveau; t-Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten); getestet wurde unter Rotlichtbedingungen.

| Genotyp | Ring | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|---|----------|--------------------------|--------|-----|----------------------|---------|---|--------------------------------|--------|-------|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| <i>yw/Y;;UAS-rut^{RNAi}/III</i> n=23 | | 6,17e ⁻¹³ | 14,831 | | 6,71e ⁻⁰⁷ | 6,8697 | | 0,1354 | 1,5499 | |
| <i>yw/Y;;UAS-rut^{RNAi}/III;198Y-GAL4/IV</i> n= 23 | R1 plus | 1,02e ⁻⁰⁵ | 5,6877 | | 0,9478 | 0,0662 | | 3,76e ⁻⁰⁵ | 5,14 | |
| <i>yw/Y;;UAS-rut^{RNAi}/VT039763-GAL4</i> n= 20 | | 4,74e ⁻⁰⁶ | 6,304 | | 5,87e ⁻⁰⁷ | 7,3406 | | 0,6063 | 0,5241 | |
| <i>yw/Y;EB1-GAL4/II;UAS-rut^{RNAi}/III</i> n= 24 | R2 | 2,77e ⁻⁰⁴ | | 258 | 0,7866 | -0,2740 | | 1,81e ⁻⁰⁴ | | 281,5 |
| <i>yw/Y;;UAS-rut^{RNAi}/VT49921-GAL4</i> n= 22 | R2 minus | 4,27e ⁻⁰⁵ | | 253 | 0,4716 | -0,7332 | | 1,88e ⁻⁰⁴ | | 242 |
| <i>yw/Y;189Y-GAL4/II;UAS-rut^{RNAi}/III</i> n= 23 | R3d R3p | 4,57e ⁻¹¹ | 11,913 | | 1,60e ⁻⁰⁹ | 9,8464 | | 0,9483 | 0,0656 | |
| <i>yw/Y;;UAS-rut/R54B05-GAL4</i> n= 22 | R3 plus | 5,74e ⁻⁰⁴ | | 233 | 0,2908 | 1,0836 | | 1,33e ⁻⁰³ | | 226 |
| <i>yw/Y;;UAS-rut^{RNAi}/ftz-ng-GAL4</i> n=23 | R4 | 2,48e ⁻¹¹ | 12,299 | | 9,38e ⁻⁰⁹ | 8,9134 | | 0,1135 | 1,6483 | |

3.6 Die Rolle von *cry* im Ellipsoidkörper bei der idiothetischen Orientierung

Auf Grundlage der Arbeit von Gegeer et al. zur Magnetotaxis, ergab sich die Frage, ob *Cryptochrom* (CRY) für die Ausbildung eines idiotetischen Orientierungsgedächtnisses notwendig ist. Es ist bekannt, dass CRY eine Schlüsselrolle in der Regulation der circadianen Rhythmik spielt, indem es nach Lichtaktivierung TIMELESS (TIM) bindet und somit die Bindung von TIM an PERIOD (PER) (Ceriani 1999; Busza et al. 2004; Dissel et al. 2004) verhindert. Fliegen, welche mutant für CRY sind, können kein idiothetisches Orientierungsgedächtnis ausbilden (Abbildung 34 und Abbildung 35). Da Yoshii et al., CRY in einem Subtyp des EK nachweisen konnten, möglicherweise R4d, kam diese Struktur als möglicher Ort des von CRY medierten idiothetischen Orientierungsgedächtnisses in Frage (Yoshii et al. 2008; Young und Armstrong 2010; Yoshii et al. 2009).

Nachdem *cry*-cDNA in R4 minus des EK im *cry*⁰¹-mutanten Hintergrund unter der Kontrolle von *ftz-ng-GAL4* exprimiert wurde, waren die Tiere wieder in der Lage, sich sowohl in der Trainingsphase ($p= 1,63e^{-08}$; $t= 8,8316$; $n= 22$), wie auch in der Testphase ($p= 3,50e^{-04}$; $t= 4,2589$) zu orientieren. Zwischen Trainings- und Testphase bestand kein signifikanter Unterschied ($p= 0,2741$; $t= 1,1231$) (Abbildung 34). Die Fliegengruppe, welche nur den Treiber im *cry*⁰¹-mutanten Hintergrund besaß, zeigte kein idiothetisches Orientierungsgedächtnis. Sie konnten zwar in der Trainingsphase die bestrafte Seite vermeiden ($p= 1,76e^{-07}$; $t= 7,6261$; $n= 22$), bevorzugten aber in der Testphase keine der beiden Seiten ($p= 0,3407$; $W= 79$) (Abbildung 34). Damit scheint Cryptochrom im Ring R4 minus eine entscheidende Rolle für das idiothetische Orientierungsgedächtnis im Dunkeln zu spielen. Auch die Effektorkontrolle im homozygot mutanten Hintergrund zeigt kein Orientierungsgedächtnis in der Testphase ($p= 0,08895$; $t= -1,7836$; $n= 22$).

Ein Knock-Down von *cry*-mRNA mittels RNA-Interferenz über den Treiber *ftz-ng-GAL4* führt zu einem Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses in der Testphase ($p=0,2766$; $W= 92,5$; $n= 22$), die Orientierungsfähigkeit in der Trainingsphase bleibt erhalten ($p= 2,94e^{-04}$; $W= 238,5$). Tiere, die nur das *cry*-RNA-Interferenzkonstrukt ohne Treiber tragen, bevorzugten sowohl in der Trainingsphase ($p= 5,90e^{-05}$; $t= 5,2985$; $n= 18$), wie auch in der Testphase ($p= 9,34e^{-05}$; $t= 5,0767$) die unbestrafte Seite. Damit ist ein Verlust der idiothetischen Orientierung aufgrund von Leckexpression ausgeschlossen (Abbildung 35).

R4 kann weiter in R4m und R4d unterteilt werden, welche über die Treiber VT043679-GAL4 für R4d und VT025526-GAL4 für R4m adressiert werden können. Ein Knock-Down von Cryptochrom in R4m mittels RNA-Interferenz besitzt keine Auswirkungen auf das idiothetische Orientierungsgedächtnis. Die Fliegen können sich sowohl in der Trainingsphase ($p= 4,68e^{-04}$; $t= 4,137$; $n= 22$), wie auch in der Testphase ($p= 2,28e^{-06}$; $t= 6,4252$) hin zur unbestraften Seite orientieren. Zwischen der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Trainings- und Testphase ($p= 0,3654$; $t= -0,92509$). Wird Cryptochrom im Subtyp R4d herunterreguliert, so verlieren die Tiere ihr idiothetisches Orientierungsgedächtnis in der Testphase ($p= 0,4952$; $t= -0,69612$; $n= 19$) jedoch bleibt die Orientierung hin zur unbestraften Seite in der Trainingsphase erhalten ($p= 3,44e^{-05}$; $t= 5,4638$). Zwischen Trainings- und Testphase besteht ein hoch signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ($p= 1,61e^{-03}$; $t= 3,7081$) (Abbildung 35).

Um die Ergebnisse der Knock-Down Experimente von *cry* in R4m und R4d zu bestätigen, wurden ebenfalls Rettungsexperimente von *cry* in diesen beiden Subtypen durchgeführt. Da sich die Treiber für R4d und R4m, ebenso wie *ftz-ng-GAL4* für R4 auf demselben Chromosom wie die *cry*⁰¹-Mutation befindet und, im Gegensatz zu *ftz-ng-GAL4*, noch keine rekombinante Linie für R4d, bzw. R4m mit *cry*⁰¹ erhältlich ist, mussten sowohl das *cry*⁰¹, wie auch der jeweilige Treiber mit Hilfe von homologer Rekombination auf dasselbe Chromosom rekombiniert werden (siehe Anhang). Nachdem in keiner der rekombinanten Linien des R4d spezifischen Treibers VT043679-GAL4 mit *cry*⁰¹ in der immunhistochemischen Analyse ein über den Treiber vermitteltes GFP Signal detektiert werden konnte (siehe Abbildung 53), war kein Rettungsexperiment von Cryptochrom in diesem Ringsubtyp möglich. In einer rekombinanten Linie des R4m spezifischen Treibers VT025526-GAL4 mit *cry*⁰¹ konnte ein GFP vermitteltes Signal im äußeren Ring des EK, vermutlich R4m, gezeigt werden (Expressionsmuster siehe Abbildung 54). Nach Verpaarung von Männchen dieser Linie mit

Weibchen des Genotyps $w/w;;cry^{01}/cry^{01}$ zeigten die Männchen der F1-Generation ohne Balancer einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses in der Testphase im *IODA* ($p= 0,4074$; $V= 152,5$; $n= 23$), wobei die Orientierung in der Trainingsphase intakt ist ($p= 1,22e^{-03}$; $t= 3,7111$). Somit ist davon auszugehen, dass die rekombinante Linie sowohl den Treiber VT025526-GAL4, wie auch die cry^{01} Mutation auf einem dritten Chromosom trägt. Damit tragen männliche Tiere dieser rekombinanten Linie den Genotyp $w/Y;;VT025526-GAL4 cry^{01}/TM3, Sb,$ bzw. $w/Y;;VT025526-GAL4 cry^{01}/VT025526-GAL4 cry^{01}$. Für das Rettungsexperiment wurden demnach Tiere des Genotyps $w/Y;UAS-cry/II;VT025526-GAL4 cry^{01}/cry^{01}$ im *IODA* getestet. Sowohl in der Trainingsphase zeigten die Tiere eine Bevorzugung der unbestraften Seite ($p= 0,0314$; $t= 2,2993$; $n= 23$), als auch in der anschließenden Testphase ($p= 4,48e^{-03}$; $t= 3,1655$). Zwischen Trainings- und Testphase besteht kein signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite ($p= 0,6288$; $t= -0,49029$) (Abbildung 34). Die Ergebnisse des Rettungsexperiments für cry in R4m widersprechen zwar den Ergebnissen des Knock-Down-Experimentes für cry in diesem Subtyp, jedoch ist es wahrscheinlich, dass eine Restaktivität einer weniger, nicht durch die RNA-Interferenz degradierten Genprodukte, für die Aufrechterhaltung des Orientierungsgedächtnisses ausreichend sind. Mittels der RNA-Interferenztechnik kann nicht garantiert werden, dass alle mRNAs des Zielgens erfasst werden.

Als Negativkontrolle wurde ein Rettungsexperiment durchgeführt, in welchem cry ektopisch in einem Ring exprimiert wird, in welchen das Protein nicht nachgewiesen worden ist. Mit Hilfe des Treibers 189Y-GAL soll cry in den Subtypen R3d und R3p des dritten Rings zur Verfügung gestellt werden (zu der Zeit der Experimente wurde 189Y-GAL4 jedoch zu den globalen R3 Treibern gezählt). Die Kontrollgruppe, welche den Treiber 189Y-GAL4 im für cry^{01} homozygot mutanten Hintergrund besaß, zeigte keine Bevorzugung der unbestraften Seite in der Trainingsphase ($p= 0,0667$; $t= 1,9211$; $n=25$) wie auch in der Testphase ($p= 0,8291$; $t= -0,21816$). Auch die Gruppe des Rettungsexperiments mit dem Genotyp $w/Y;UAS-cry/189Y-GAL4;cry^{01}/cry^{01}$ zeigte keine Orientierungsfähigkeit in der Trainingsphase ($p= 0,0720$, $t= 1,8824$; $n= 25$). Jedoch zeigt sich eine Bevorzugung der unbestraften Seite im anschließenden Test bei jedoch einem grenzwertig signifikanten p-Wert ($p= 0,0405$; $W= 239$). Zwischen der Trainings- und Testphase besteht kein signifikanter Unterschied ($p= 0,2258$; $V= 117$) (Abbildung 34). Es ist anzunehmen, dass ohne eine Orientierungsfähigkeit in der Trainingsphase auch kein Orientierungsgedächtnis in der Testphase ausgebildet werden konnte, womit keine Rettung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses über Expression von cry in R3d und R3p stattgefunden hat. Somit scheint CRY eine entscheidende Rolle in R4, bzw. dessen Subtyp für das idiothetische Orientierungsgedächtnis zu spielen.

Rettungsversuch

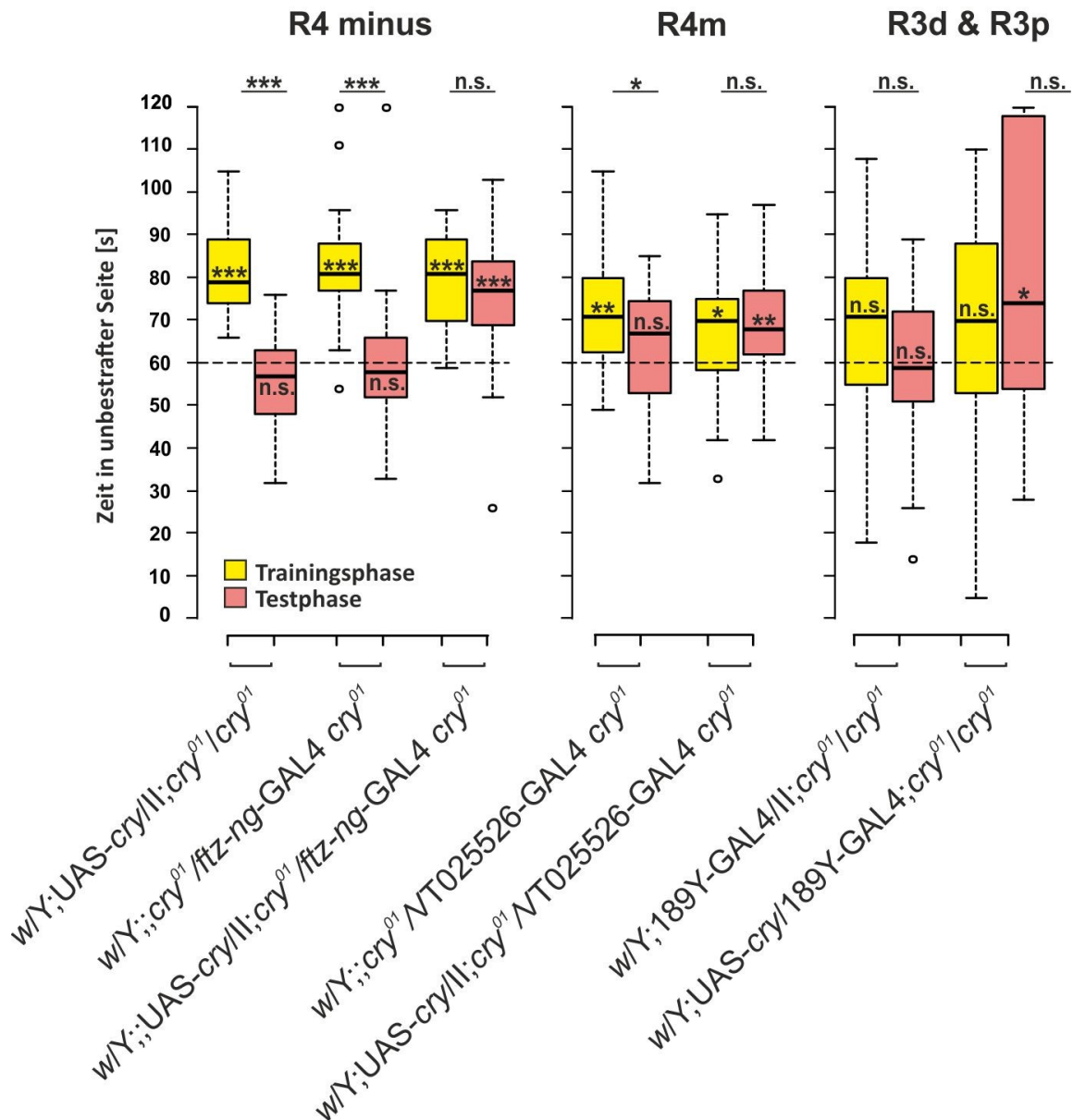


Abbildung 34: Idiothetische Orientierung im *IODA* nach Rettung von *cry* in R4 minus, R4m und R3d & R3p im *cry*⁰¹ mutanten Hintergrund. Eine Expression von *cry*-cDNA in R4 minus, ebenso wie in R4m, führt zu einer Rettung des Orientierungsgedächtnisses. Die Resultate aus dem Rettungsexperiment in R3d & R3p sind mit Vorsicht zu interpretieren, da die Treiberkontrolle in den letzten beiden Minuten der Testphase keine Orientierungsfähigkeit zeigte. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestrafter Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *: $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 14.

Knock-Down Versuch

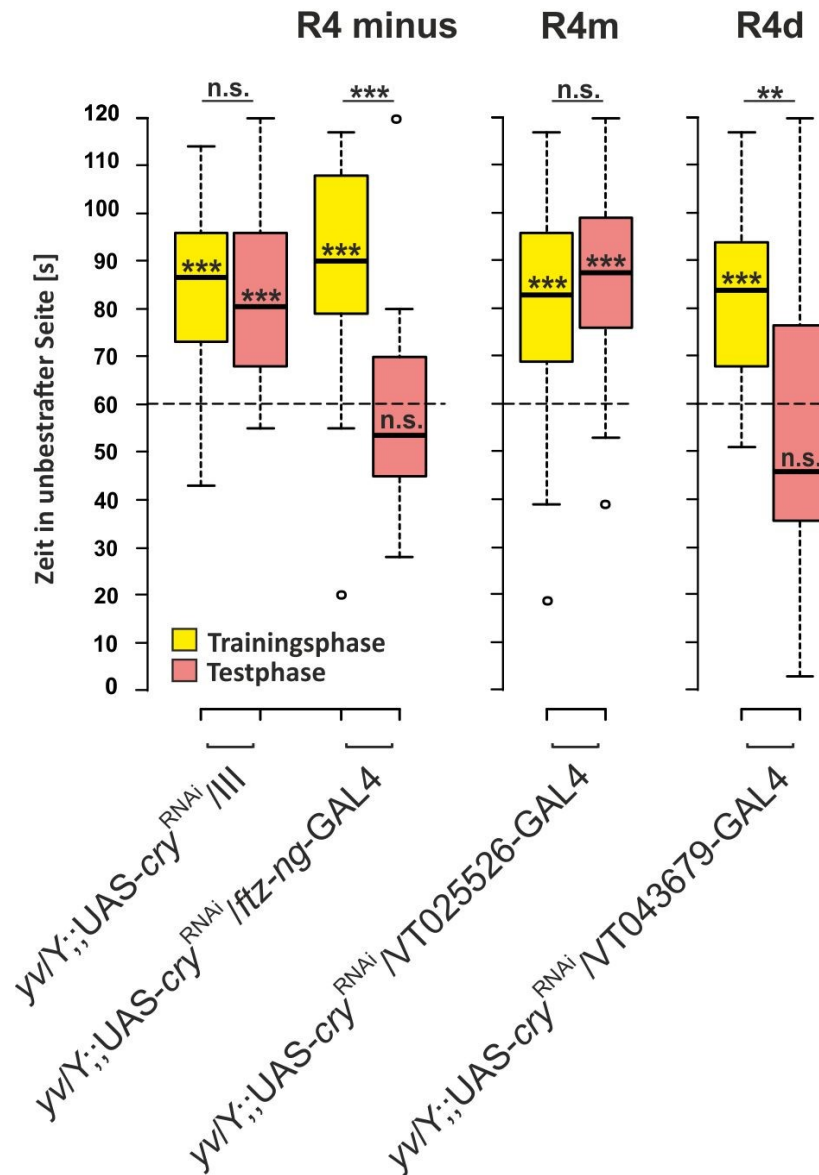


Abbildung 35: Idiothetische Orientierung im *IODA* nach Knockdown von *cry* in R4 minus, R4m und R4d. Ein Knock-Down von *cry* in R4 minus führt zu einem Verlust des Orientierungsgedächtnisses, ebenso wie in R4d. Ein Knock-Down in R4m hingegen zerstört das Gedächtnis nicht. Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestrafter Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau (Signifikanzsterne in der Box) von 60s, sowie untereinander (Signifikanzsterne über den Boxen) getestet. n.s.: nicht signifikant; * : $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 15.

Tabelle 14: Statistische Werte nach Rettungsversuchen von *cry* in den Ringen R4, R4m plus und R3d & R3p des EK von *cry*⁰¹ defekten Tieren im *IODA*. Aus Abbildung 34. n= Anzahl getesteter Tiere; p= Signifikanzniveau; t-Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten); getestet wurde unter Rotlichtbedingungen.

| Genotyp | Ring | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|--|----------|--------------------------|--------|---|----------------------|----------|-------|--------------------------------|----------|-----|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| <i>w/Y;UAS-cry/II;cry⁰¹/cry⁰¹</i> n= 22 | | 3,00e ⁻⁰⁹ | 9,7529 | | 0,08895 | -1,7836 | | 2,81e ⁻⁰⁷ | 7,4001 | |
| <i>w/Y;;ftz-ng-GAL4 cry⁰¹/cry⁰¹</i> n= 22 | R4 minus | 1,76e ⁻⁰⁷ | 7,6261 | | 0,3407 | | 79 | 6,38e ⁻⁰⁵ | | 231 |
| <i>w/Y;UAS-cry/II;ftz-ng-GAL4 cry⁰¹/cry⁰¹</i> n= 22 | | 1,63e ⁻⁰⁸ | 8,8316 | | 3,50e ⁻⁰⁴ | 4,2589 | | 0,2741 | 1,1231 | |
| <i>w/Y;;VT025526-GAL4 cry⁰¹/cry⁰¹</i> n= 23 | R4m | 1,22e ⁻⁰³ | 3,7111 | | 0,4074 | | 152,5 | 0,0273 | | 211 |
| <i>w/Y;UAS-cry/II;VT025526-GAL4 cry⁰¹/cry⁰¹</i> n= 23 | | 0,0314 | 2,2993 | | 4,48e ⁻⁰³ | 3,1655 | | 0,6288 | -0,49029 | |
| <i>w/Y;189Y-GAL4/II; cry⁰¹/cry⁰¹</i> n= 25 | R3d, R3p | 0,0667 | 1,9211 | | 0,8291 | -0,21816 | | 0,0769 | 1,8482 | |
| <i>w/Y;189Y-GAL4/UAS-cry; cry⁰¹/cry⁰¹</i> n= 25 | | 0,0720 | 1,8824 | | 0,0405 | | 239 | 0,2258 | | 117 |

Tabelle 15: Statistische Werte nach Knock-Down von *cry* mittels RNA-Interferenz in den Ringen R4, R4m und R4d des EK im *IODA*. Aus Abbildung 35. n= Anzahl getesteter Tiere; p= Signifikanzniveau; t-Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten); getestet wurde unter Rotlichtbedingungen.

| Genotyp | Ring | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|---|----------|--------------------------|--------|-------|----------------------|----------|------|--------------------------------|----------|-----|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| <i>w/Y;;UAS-cry^{RNAi}/III</i> n= 18 | | 5,90e ⁻⁰⁵ | 5,2985 | | 9,34e ⁻⁰⁵ | 5,0767 | | 1 | 0 | |
| <i>w/Y;;ftz-ng-GAL4/UAS-cry^{RNAi}</i> n= 22 | R4 minus | 2,94e ⁻⁰⁴ | | 238,5 | 0,2766 | | 92,5 | 6,51e ⁻⁰⁴ | | 232 |
| <i>w/Y;;VT025526-GAL4/UAS-cry^{RNAi}</i> n= 22 | R4m | 4,68e ⁻⁰⁴ | 4,137 | | 2,28e ⁻⁰⁶ | 6,4252 | | 0,3654 | -0,92509 | |
| <i>w/Y;;VT043679-GAL4/UAS-cry^{RNAi}</i> n= 19 | R4d | 3,44e ⁻⁰⁵ | 5,4638 | | 0,4952 | -0,69612 | | 1,61e ⁻⁰³ | 3,7081 | |

3.7 Die Rolle der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU auf verschiedene Formen der Orientierung, sowie der Orientierungsgedächtnisse.

Damit Informationen zwischen den einzelnen Komponenten des *Zentralkomplexes* ausgetauscht werden können, bedarf es der *kolumnären Neuronen*. Sie besitzen neuronale Eingänge in einem der Kompartimente, sowie Ausgängen in einem anderen. *P-EN* Neurone verbinden die *Protozerebralbrücke (PB)* mit dem *Ellipsoidkörper (EK)* und den paarigen *Noduli (N)*, während *E-PG* Neurone den *EK* mit der *PB* und der *Gall (G)* verbinden. Eine visuelle Positionsinformation über die Lage eines Objektes wird auf dem EK über einen erhöhten Kalzium-Einstrom codiert, welcher auch nach Verschwinden des Objektes aufgrund einer über die E-PG Neuronen vermittelte Erregungsschleife > 40 Sekunden erhalten bleibt (Seelig und Jayaraman 2013, 2015). Dreht sich die Fliege, so „verschieben“ die P-EN Neurone das Signal auf dem EK relativ zur Position der Fliege (siehe Abbildung 5). Ob die E-PG und P-EN Neurone in das visuelle Orientierungsgedächtnis, wie auch in die nicht-visuelle idiothetische Orientierung involviert sind, soll im Folgenden mit den klassischen visuellen Orientierungsparadigmen *Buridan*, *Persistenz*, und *Detour*-Paradigma und dem nicht-visuellen *IODA* untersucht werden. Überdies wurde auch die Beteiligung der AOTU an der visuellen und nicht-visuellen Orientierung überprüft. Bei Heuschrecken ist bekannt, dass die AOTU die Eigenbewegung des Tieres über den optischen Fluss an die PB und den EK weiterleiten (Homborg et al. 2003; El Jundi et al. 2014). Demnach sollten die AOTU eigentlich nur an visuellen Orientierungsformen beteiligt sein, jedoch zeigten TNT-Experimente mit P-EN Neurone adressierenden Treiberlinien einen veränderten Phänotyp im *Persistenz*-, *Detour*- und *IODA* Versuch, sobald die P-EN Treiberlinien auch die AOTU inkludieren (siehe nachfolgende Versuche) Kuntz konnte 2015 zeigen, dass in einem visuellen Orientierungsgedächtnis die Position einer Landmarke in einem Sektor oder Hemisektor des EKs, durch eine Anreicherung

des diffusiblen Gases Stickstoffmonoxid (NO) durch Aktivierung der Stickstoffmonoxid - Synthase (NOS) in jenem Bereich markiert und an die PB weitergeleitet wird (Kuntz 2015).

3.7.1 Visuelle Orientierung im *Buridan*- Paradigma bei Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und der AOTU

Als Vortest zur Überprüfung der visuellen Orientierungsfähigkeit der Fliegen wurde das *Buridan*- Paradigma angewendet. Fliegen des Stammes Wildtyp CS laufen die Landmarken im *Buridan*- Paradigma typischerweise in einem Schwankungswinkel von $22^{\circ} \pm 3^{\circ}$ an [14° bei Thran, 2013 (Thran 2013)]. Die eingenommen absoluten medianen Fehlerwinkel der Anläufe unterschieden sich bis auf zwei Gruppen weder in den Kontrollgruppen der Treiber-, bzw. Effektorlinie, noch den experimentellen Gruppen, in welchen die E-PG, bzw. P-EN oder die AOTU mittels TNT-Expression inaktiviert wurden, von den absoluten medianen Fehlerwinkeln der CS-Gruppe. Lediglich die Kontrollgruppe für den Treiber R26C04-GAL4 nahm einen signifikant geringeren absoluten medianen Fehlerwinkel, verglichen mit CS ein ($p= 2,00e^{-03}$; $t= 5,5258$; $n= 8$), d.h., die Kontrollgruppe lief die Landmarken exakter an als der Wildtyp. Dies könnte mit dem Heterosiseffekt zu erklären sein, welcher beschreibt, dass heterozygote Nachkommen zweier Inzuchtlinien eine gesteigerte Vitalität aufweisen (Frankel 1983). Die experimentelle Gruppe $w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III$, in welcher die P-EN Neurone über die Expression von TNT stillgelegt wurden, liefen die Landmarken in einem signifikant schlechteren absoluten medianen Fehlerwinkel, verglichen mit CS an ($p= 3,05e^{-02}$; $t= -3,859$; $n= 10$). Betrachtet man die Laufspuren dieser Gruppe, ist zu erkennen, dass die Landmarken jedoch erkannt wurden, da die Tiere durchaus zwischen den Landmarken oszillieren. Der Treiber R12D09-GAL4 adressiert nicht nur die P-EN Neurone, sondern auch einen Teil der AOTU. Diese Struktur ist Teil des anterioren, visuellen Pfades und erhält Eingänge von Neuronen der optischen Loben und steht in neuronaler Verbindung mit den Bulbi, der Eingangsdomäne der Ringneurone des Ellipsoidkörpers (Omoto et al. 2017). Die AOTUs sind dabei eine entscheidende Schaltstelle für die Weiterleitung topografischer Informationen (Timaus et al. 2017).

Der Treiber R49E09-GAL4 adressiert ebenfalls die AOTUs, jedoch keine E-PG oder P-EN Neurone und wurde gewählt, um zu überprüfen, ob ein Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses auch durch die alleinige Stilllegung der AOTUs möglich ist, denn die Expressionsmuster der P-EN-Treiber R12D09-GAL4, R13D05-GAL4 und R41G11-GAL4 schließen die AOTUs ebenfalls mit ein, wobei die AOTU-Expression von R12D09-GAL4 in den AOTUs von den genannten drei Treibern am stärksten ist (Expressionsmuster siehe Abbildung 60). R49E09-GAL4 exprimiert in den AOTUs in der intermedialen medianen (AOTUim) Domäne (Omoto et al. 2017), (Expressionsmuster siehe Abbildung 63), während die Expression von R12D09-GAL4 weiter proximal, also in der lateralen Domäne (AOTUl), und/oder der intermedialen lateralen Domäne (AOTUil) (Omoto et al. 2017) zu erkennen ist. Tiere der Gruppe $w/Y;UAS-TNT/II;R49E09-GAL4/III$ nahmen im Gegensatz zu Gruppe $w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III$ einen wildtypischen Fehlerwinkel im *Buridan Paradigma* ein (Abbildung 36). Es ist wahrscheinlich, dass der von R12D09-GAL4 adressierte Teil der AOTU notwendig für das korrekte Anlaufen von Landmarken ist, der von R49E09-GAL4 hingegen weniger. Zu beachten ist jedoch, dass die experimentellen Gruppen tendenziell einen schlechteren medianen Fehlerwinkel einnahmen, verglichen mit den Treiberkontrollen. Jedoch besteht selbst bei den nicht-Bonferroni (siehe Anhang) korrigierten Datensätzen von CS

und den experimentellen Gruppen kein signifikanter Unterschied in den Fehlerwinkeln (statistische Werte siehe Tabelle 16).

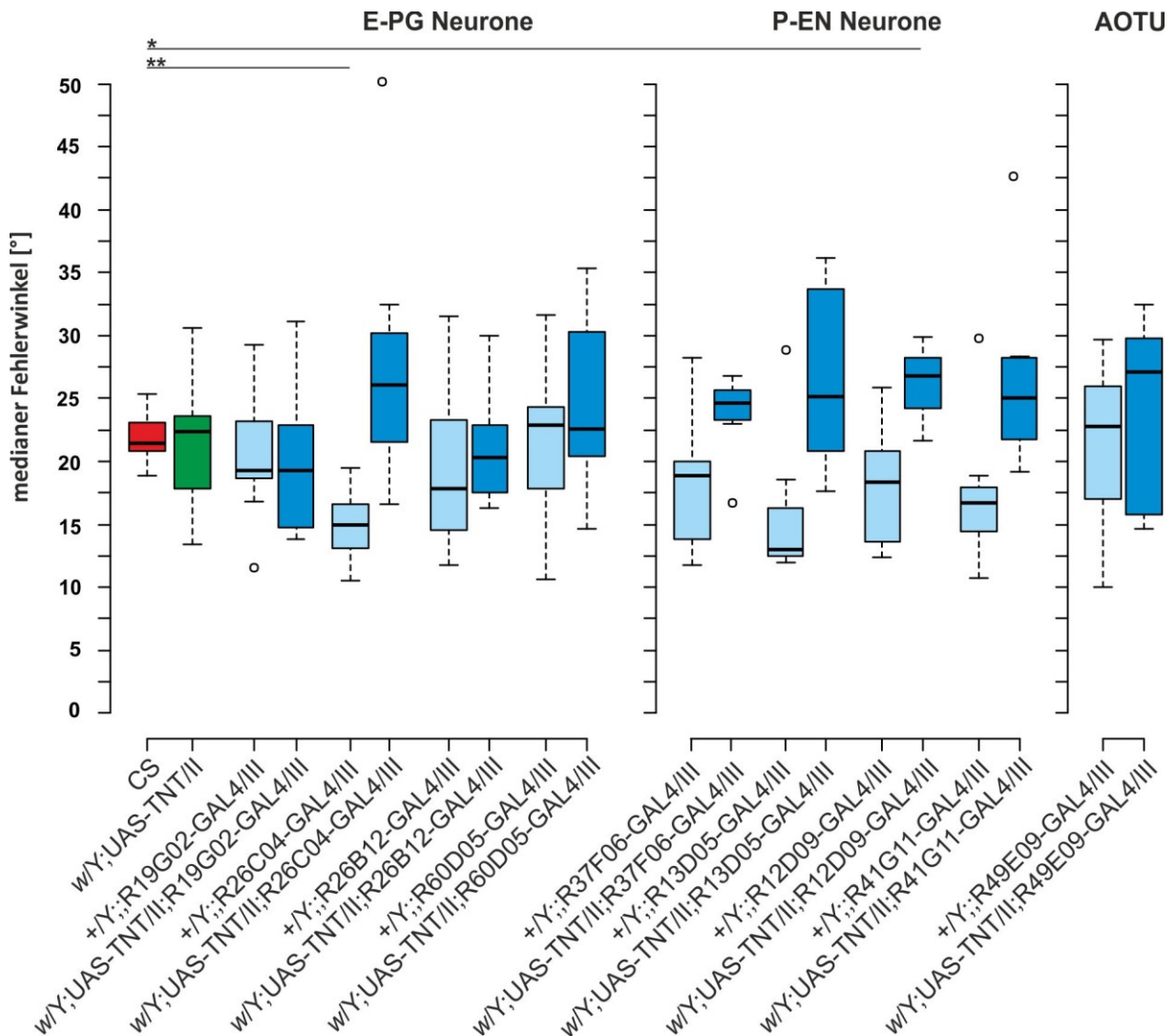


Abbildung 36: Medianer Fehlerwinkel im *Buridan*-Paradigma nach Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone, sowie der AOTU mit TNT. Die medianen Fehlerwinkel der einzelnen Gruppen wurden jeweils mit CS (grün) verglichen. Hellblau = Treiberkontrollen, dunkelblau = experimentelle Gruppen. Lediglich die absoluten medianen Fehlerwinkel der Treiberkontrolle +Y;;R26C04-GAL4/III und der experimentellen Gruppe w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III unterscheiden sich vom Wildtyp CS. Während +Y;;R26C04-GAL4/III einen geringeren Fehlerwinkel, verglichen mit CS einnimmt, läuft w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III die Landmarken signifikant ungenauer an. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Bonferroni korrigiert. n= siehe Tabelle 16.

Tabelle 16: Statistische Werte nach Inaktivierung der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU mit *Tetanustoxin* (TNT) für die Orientierungsfähigkeit im *Buridan*-Paradigma. Aus Abbildung 36. *Kleinerer medianer Fehlerwinkel als CS! n= Anzahl getesteter Tiere; p= Signifikanzniveau; t- Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten); p-Werte mit *Bonferroni* korrigiert.

| Genotyp | Neurone | gegen Wildtyp CS | | | |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------|---------|----|
| | | p | t | W | n |
| w/Y;UAS-TNT/II | Kontrolle | 1 | 0,33431 | | 11 |
| +Y;;R19G02-GAL4/III | E-PG | 1 | 0,75922 | | 9 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R19G02-GAL4/III | | 1 | 0,63267 | | 6 |
| +Y;;R26C04-GAL4/III | | 2,00e ^{-03*} | 5,5258 | | 8 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R26C04-GAL4/III | | 1 | -1,6299 | | 10 |
| +Y;;R26B12-GAL4/III | | 1 | 1,0491 | | 9 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R26B12-GAL4/III | | 1 | 0,53958 | | 8 |
| +Y;;R60D05-GAL4/III | | 1 | -0,039048 | | 9 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R60D05-GAL4/III | | 1 | -1,2794 | | 9 |
| +Y;;R13D05-GAL4/III | | P-EN | 0,49818 | | 42 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R13D05-GAL4/III | 1 | | -2,117 | | 10 |
| +Y;;R37F06-GAL4/III | 1 | | 1,5001 | | 9 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R37F06-GAL4/III | 1 | | -1,1692 | | 7 |
| +Y;;R12D09-GAL4/III | 0,52193 | | 2,4617 | | 10 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III | 3,05e ⁻⁰² | | -3,859 | | 10 |
| +Y;;R41G11-GAL4/III | 0,38969 | | | 48 | 8 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R41G11-GAL4/III | 1 | | -1,672 | | 8 |
| +Y;;R49E09-GAL4/III | AOTU | | 1 | 0,23476 | |
| w/Y;UAS-TNT/II;R49E09-GAL4/III | | 1 | | 28 | 10 |

3.7.2 Nachfixation von Landmarken im *Persistenz*-Paradigma bei Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und der AOTU

Wildtypische Fliegen können die Richtung hin zu einer verschwundenen Landmarke einhalten und weiter auf jene zulaufen. Diese „Nachfixation“ kann im *Persistenz*-Paradigma untersucht werden (Strauss und Pichler 1998). Der Wildtypstamm CS legte im *Persistenz*-Paradigma im Median eine vektorielle Strecke von 70mm in Richtung der verschwundenen Landmarke zurück. Die Effektor-Kontrollgruppe w/Y;UAS-TNT/II unterscheidet sich in ihrer vektoriellen Laufstrecke schwach signifikant vom Wildtyp CS (p= 0,04087; W= 4163,5; n= 10; N= 10), jedoch ist die Laufstrecke der Effektor-Kontrollgruppe länger als jene des Wildtyps (Abbildung 37). Dies könnte ebenfalls mit dem Heterosiseffekt erklärt werden. Entscheidend für das *Persistenz*-Paradigma ist aber, dass eine eventuelle Leckexpression des Effektor-Konstrukts keinen negativen Einfluss auf die vektorielle Laufstrecke besitzt. Das kann hiermit demnach ausgeschlossen werden.

Nach Inaktivierung der E-PG, bzw. P-EN Neurone oder der AOTU legten die Tiere im *Persistenz*-Paradigma eine höchst signifikant kürzere Strecke in Richtung der verschwundenen Landmarke, verglichen mit der Kontrollgruppe für die entsprechende Treiberlinie, zurück. Es war zu beobachten, dass die Tiere der experimentellen Gruppen nach Verschwinden der angelaufenen Landmarke häufiger stehen blieben oder früher einen Winkel >90° (gewertet als Laufabbruch) zur verschwundenen Landmarke einnahmen, was in einer geringeren vektoriellen Länge des Laufs führte (Abbildung 37). Damit scheinen sowohl die E-PG und P-EN Neurone, wie auch die AOTU obligat für die Nachfixation von Objekten zu sein (statistische Werte siehe Tabelle 17).

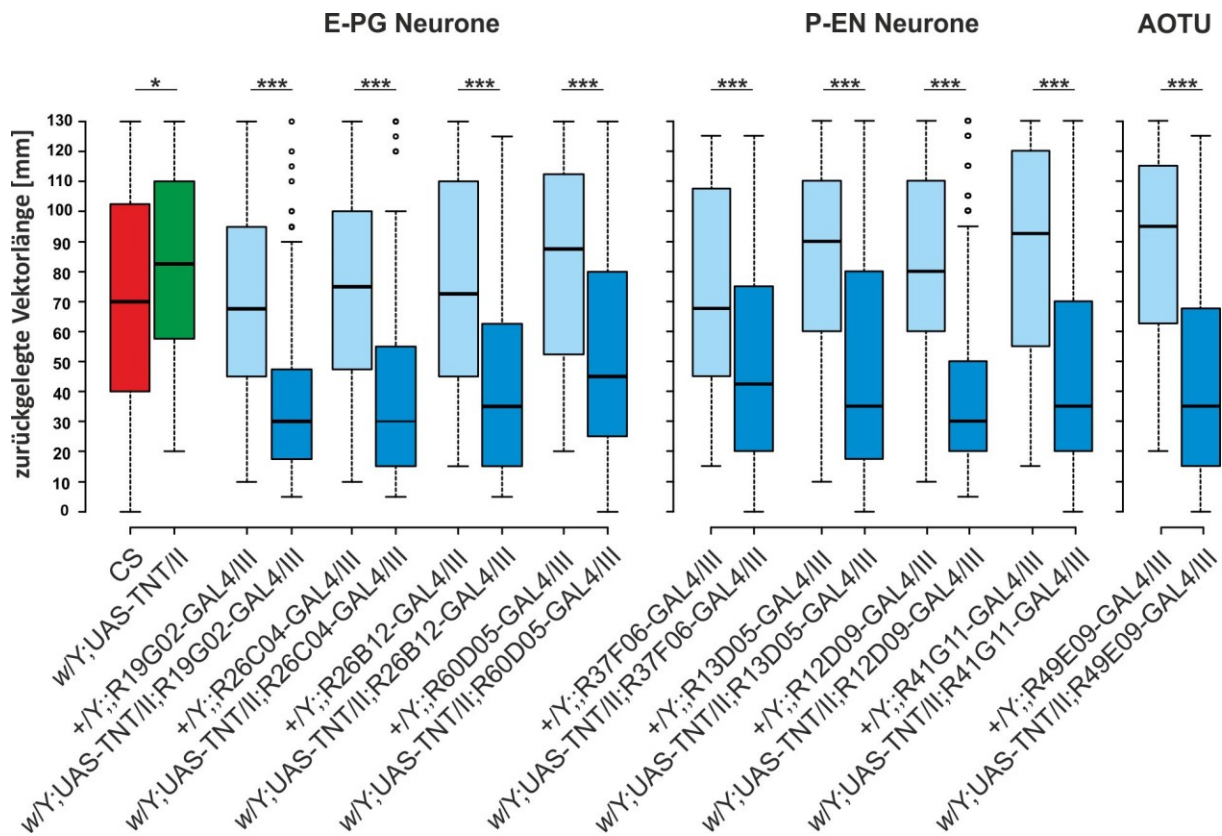


Abbildung 37: Vektorielle Laufstrecke in Landmarkenrichtung im Persistenz Paradigma nach Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone, und/oder der AOTU mit TNT. Es wurde die zurückgelegte, vektorielle Laufstrecke hin zur verschwundenen Landmarke gemessen. Die Laufstrecken der experimentellen Gruppen (dunkelblau) wurden jeweils mit der zugehörigen Treiberkontrolle (hellblau) verglichen. Nach Inaktivierung mit TNT legten alle experimentellen Gruppen eine höchst signifikant kürzere Laufstrecke zurück. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; *; $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. n= siehe Tabelle 17.

Tabelle 17: Statistische Werte nach Inaktivierung der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU mit Tetanustoxin (TNT) im Persistenz-Paradigma. Aus Abbildung 37. *Längere vektorielle Laufstrecke als CS! n= Anzahl getesteter Tiere; N= Versuchsdurchläufe pro Tier; p= Signifikanzniveau; Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten).

| Genotyp | Neurone | gegen Treiberkontrolle | | |
|--------------------------------|-----------|------------------------|--------|---------|
| | | p | W | n (N) |
| w/Y;UAS-TNT/II | Kontrolle | 0,04087* | 4163,5 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R19G02-GAL4/III | E-PG | $7,01e^{-12}$ | 7803 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R26C04-GAL4/III | | $1,51e^{-12}$ | 7891 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R26B12-GAL4/III | | $1,04e^{-09}$ | 7459 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R60D05-GAL4/III | | $5,43e^{-08}$ | 7223 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R13D05-GAL4/III | | $1,87e^{-10}$ | 7605,5 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R37F06-GAL4/III | P-EN | $2,05e^{-06}$ | 6941 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III | | $2,25e^{-13}$ | 7998 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R41G11-GAL4/III | | $6,14e^{-13}$ | 7942,5 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R49E09-GAL4/III | | $1,31e^{-15}$ | 8268 | 10 (10) |

3.7.3 Auswirkungen auf das visuelle Orientierungsgedächtnis im *Detour*-Paradigma bei Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und/oder der AOTU

Drosophila ist in der Lage, die Richtung einer angelaufenen Landmarke im *Detour*-Paradigma, nach Anlauf einer Ablenkungslandmarke wieder abzurufen und sich der erstgezeigten Landmarke wieder zuzuwenden. Die biochemischen und neuronalen Komponenten, die für dieses visuelle Orientierungsgedächtnis benötigt werden, sind mit Hilfe dieses etablierten Paradigmas eingehend untersucht worden. Neben dem EK werden auch die PB und der fächerförmige Körper benötigt (Neuser et al. 2008; Kuntz et al. 2012; Kuntz et al. 2017; Thran 2013). Mittels Blockade der chemischen Synapsen über Expression von TNT in den kolumnären E-PG und P-EN Neuronen, über welche EK und PB Informationen austauschen, wurde der Einfluss auf das Orientierungsgedächtnis im *Detour* untersucht. Eine eventuelle Leckexpression des Effektorkonstrukts hat keinen Einfluss auf die Entscheidung für die zuerst angelaufenen Landmarke in der Effektor-Kontrollgruppe $w/Y;UAS-TNT/II$ ($p=1,95e^{-03}$; $s=10$; $n=10$; $N=10$). Die Entscheidung für die zuerst angelaufene Landmarke lag im Median bei 90%. Eine Inaktivierung der E-PG Neurone führte zu einem Verlust des visuellen Arbeitsgedächtnisses. Die Entscheidungshäufigkeit der Tiere für die zuerst angelaufene Landmarke unterschied sich nicht signifikant vom Zufallsniveau von 58%, lediglich die experimentelle Gruppe $w/Y;UAS-TNT/II;R19G02-GAL4/III$ zeigte eine „Antifixation“, d.h., die Tiere wanden sich nach Verschwinden des Ablenkbalkens signifikant häufiger von der zuerst angelaufenen Landmarke ab ($p=1,95e^{-03}$; $s=0$; $n=10$; $N=10$); sie entschieden sich im Median nur zu 45% für die zuerst gezeigte Landmarke. Die Treiberkontrollgruppen verhielten sich wildtypisch und entschieden sich nach Verschwinden des Ablenkbalkens zwischen 75-95% für die zuerst gezeigte Landmarke. Auch die Treiberkontrollgruppen der P-EN Neurone zeigten ein intaktes visuelles Orientierungsgedächtnis, sie entschieden sich in 80-90% der Läufe für die zuerst angelaufene Landmarke. Die experimentelle Gruppe $w/Y;UAS-TNT/II;R37F06-GAL4/III$ zeigt einen Verlust des visuellen Orientierungsgedächtnisses ($p=0,3437$; $s=7$; $n=10$; $N=10$); sie liefen im Median nur zu 60% die zuerst gezeigte Landmarke an. Alle anderen experimentellen Gruppen, in denen TNT in den P-EN Neuronen exprimiert wurde, zeigen keine gültigen Entscheidungen. Die Tiere bleiben nach Verschwinden des Ablenkbalkens stehen, drehen um oder laufen im Kreis (Abbildung 38). Auffällig hierbei ist, dass die Treiber der experimentellen Gruppen, welche keine Entscheidungen treffen, neben den P-EN Neuronen auch in den AOTU exprimieren. Daher wurde der Einfluss der AOTU auf das visuelle Orientierungsgedächtnis untersucht. Tiere der experimentellen Gruppe $w/Y;UAS-TNT/II;R49E09-GAL4/III$, welche TNT nur in den AOTU exprimieren, zeigten ebenfalls einen Verlust der Entscheidungsfähigkeit im *Detour*-Paradigma. Die Kontrollgruppe $+/Y;;R49E09-GAL4/III$ zeigte eine wildtypische, hoch signifikant häufigere Entscheidung für die zuerst angelaufenen Landmarke ($p=1,95e^{-03}$, $s=10$; $n=10$; $N=10$); der Median lag hier bei 85% (Abbildung 38) (statistische Werte siehe Tabelle 18). Die AOTUs als Instrument zur Detektion für die Eigenbewegung (Homberg et al. 2003; El Jundi et al. 2014) scheinen somit auch für die Etablierung eines visuellen Orientierungsgedächtnisses eine Rolle zu spielen.

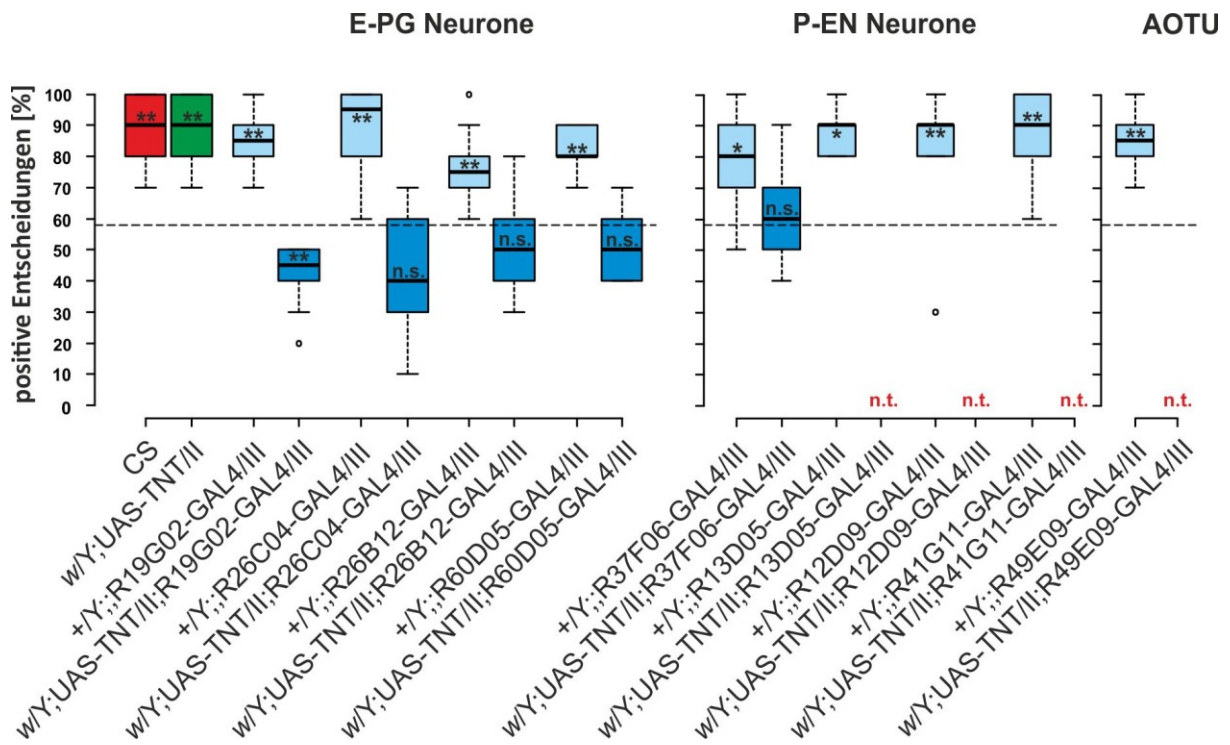


Abbildung 38: Positive Entscheidungen im *Detour* Paradigma nach Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone, und/oder der AOTU mit TNT. Es wurde die positiven Entscheidungen hin zur zuerst gesehenen, verschwundenen Landmarke gemessen. Die experimentellen Gruppen (dunkelblau), sowie die Treiberkontrolle (hellblau) wurden gegen das Zufallsniveau von 58% verglichen. Nach Inaktivierung mit TNT entschieden sich alle experimentellen Gruppen nicht mehr für die zuerst gesehene Landmarke, wobei *w/Y;UAS-TNT/II;R19G09-GAL4/III* eine Antizipation aufweist. Einige experimentelle Gruppen waren nicht testbar, da sie nach Verschwinden des Ablenkbalpens stehen blieben, oder kehrtmachten (keine Entscheidung = *n.t.*). n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. n= siehe Tabelle 18.

Tabelle 18: Statistische Werte nach Inaktivierung der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU mit *Tetanustoxin* (TNT) im *Detour* Paradigma. Aus Abbildung 38. n= Anzahl getesteter Tiere; N= Versuchsdurchläufe pro Tier; p= Signifikanzniveau; Vorzeichentest (SIGN-Test) Teststatistik (s= Anzahl positiver Vorzeichen).

| Genotyp | Neurone | Test gegen 58% | | | |
|--------------------------------|-----------|--------------------|----|--------|---------|
| | | p | s | Median | n (N) |
| CS | Kontrolle | $1,95e^{-03}$ | 10 | 90 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II | | $1,95e^{-03}$ | 10 | 90 | 10 (10) |
| +Y;;R19G02-GAL4/III | E-PG | $1,95e^{-03}$ | 10 | 85 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R19G02-GAL4/III | | $1,95e^{-03*}$ | 0 | 45 | 10 (10) |
| +Y;;R26C04-GAL4/III | | $1,95e^{-03}$ | 10 | 95 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R26C04-GAL4/III | | 0,3438 | 3 | 40 | 10 (10) |
| +Y;;R26B12-GAL4/III | | $1,95e^{-03}$ | 10 | 75 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R26B12-GAL4/III | | 0,7539 | 4 | 50 | 10 (10) |
| +Y;;R60D05-GAL4/III | | $1,95e^{-03}$ | 10 | 80 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R60D05-GAL4/III | | 0,7539 | 4 | 50 | 10 (10) |
| +Y;;R13D05-GAL4/III | | $1,95e^{-03}$ | 10 | 90 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R13D05-GAL4/III | | Keine Entscheidung | | | |
| +Y;;R37F06-GAL4/III | P-EN | $2,15e^{-02}$ | 9 | 80 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R37F06-GAL4/III | | 0,3437 | 7 | 60 | 10 (10) |
| +Y;;R12D09-GAL4/III | | $2,15e^{-02}$ | 9 | 90 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III | | Keine Entscheidung | | | |
| +Y;;R41G11-GAL4/III | | $1,95e^{-03}$ | 10 | 90 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R41G11-GAL4/III | | Keine Entscheidung | | | |
| +Y;;R49E09-GAL4/III | AOTU | $1,95e^{-03}$ | 10 | 85 | 10 (10) |
| w/Y;UAS-TNT/II;R49E09-GAL4/III | | Keine Entscheidung | | | |

3.7.4 Auswirkungen auf das idiothetische Orientierungsgedächtnis im *IODA*, bei Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und/oder der AOTU

Nach Inaktivierung der E-PG Neurone über TNT-Expression zeigten alle experimentellen Gruppen einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Sie waren in den letzten beiden Minuten des Trainings zwar noch der Lage, die unbestrafte Seite höchst signifikant zu bevorzugen, jedoch war die Aufenthaltsdauer in jener Seite in den letzten beiden Testminuten nicht signifikant verschieden vom Zufallsniveau. Die Kontrollgruppen der Treiberkontrollen für die E-PG Neurone zeigten hingegen eine signifikant längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Testminuten (Abbildung 39, statistische Werte siehe Tabelle 19).

Wurde TNT mit dem P-EN Neuronentreiber R37F06-GAL4, welcher keine zusätzliche Expression in den AOTU besitzt, exprimiert, so führte das zu einem Verlust der idiothetischen Orientierung im *IODA*, die Tiere zeigten zwar eine längere Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in der Trainingsphase ($p= 7,94e^{-05}$; $t= 5,0008$; $n= 20$), jedoch keine Bevorzugung der unbestraften Seite in den letzten beiden Testminuten ($p= 0,264$; $t= -1,1511$). Eine Expression von TNT über die AOTU inkludierenden P-EN Treiber R13D05-GAL4 oder R12D09-GAL4 resultierte in einer Nichttestbarkeit der Tiere in *IODA*. Die Lokomotion der Fliegen war so stark reduziert, dass sich ein Training als unmöglich erwies. Auch die Inaktivierung der AOTU allein resultierte in der Gruppe w/Y;UAS-TNT/II;R49E09-GAL4/III in einer den Versuch unmöglich machenden Bewegungsreduktion. Die Treiberkontrollen für die jeweiligen Gruppen zeigten ein intaktes Orientierungsgedächtnis. Die Rolle der AOTU in der nicht-visuellen Orientierung ist weitgehend ungeklärt, jedoch scheinen sie eine nicht zu vernachlässigende Rolle in der

Etablierung eines nicht-visuellen Orientierungsgedächtnisses zu spielen. Die Treiberkontrollen für die P-EN Neurone wiesen alle ein intaktes, idiothetisches Orientierungsgedächtnis auf. Alle Kontrollgruppen bevorzugten in der Trainingsphase, sowie auch in der Testphase die unbestrafte Seite höchst signifikant (Abbildung 39; statistische Werte siehe Tabelle 19).

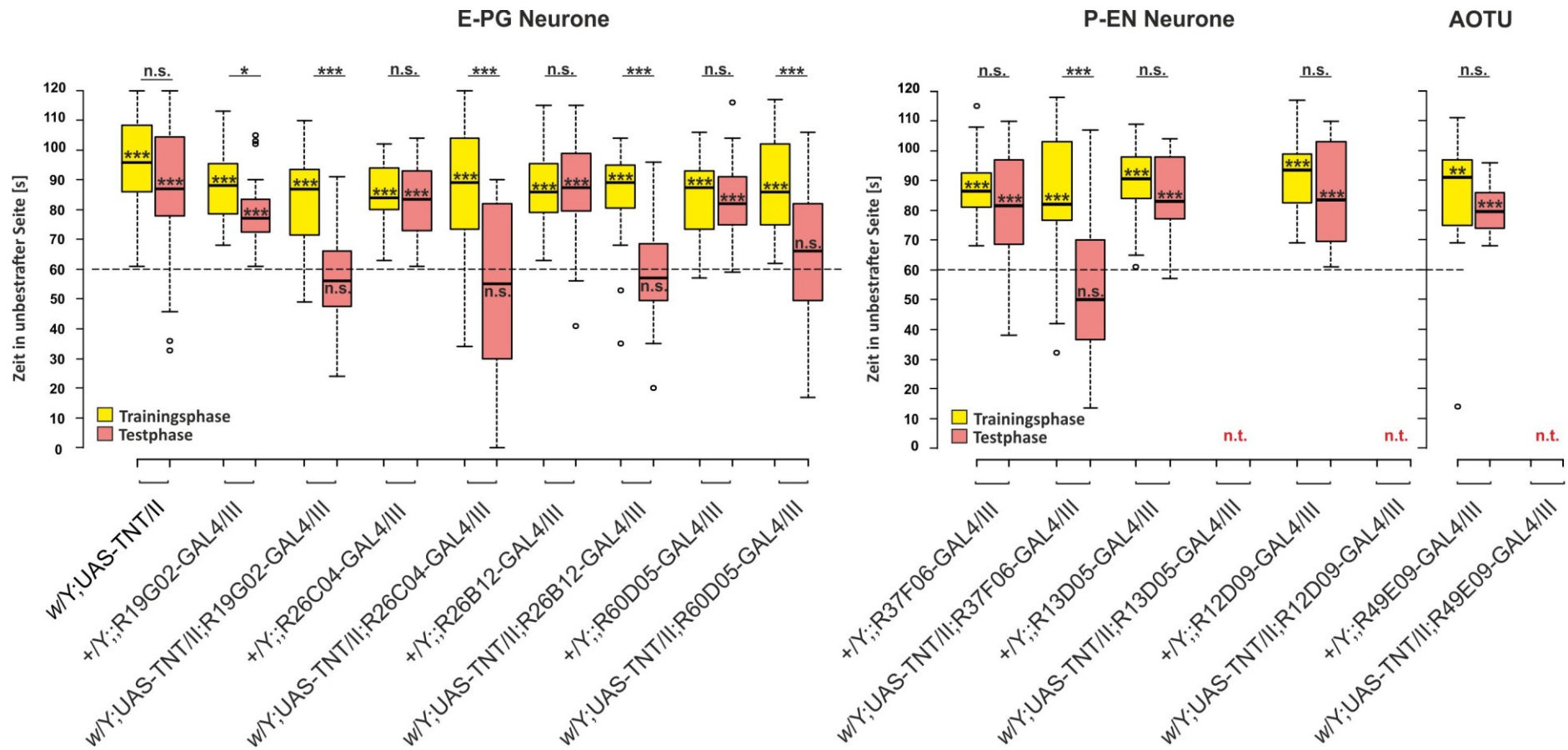


Abbildung 39: Idiothetische Orientierung im *IODA* nach Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und AOTU mit TNT. Eine Inaktivierung der E-PG, der P-EN Neurone wie auch den AOTU führt zu einem Verlust der idiothetischen Orientierung. Einige Gruppen waren aufgrund einer starken Immobilität nicht testbar (n.t.). Für die statistische Auswertung wurden die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite in den letzten beiden Trainingsminuten (Trainingsphase, gelb) und den letzten beiden Testminuten (Testphase, rosa) gegen das Zufallsniveau von 60s, sowie untereinander getestet. n.s. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Getestet wurden männliche Tiere unter Rotlichtbedingungen. n= siehe Tabelle 19.

| Neuronen-Klasse | E-PG Neurone | | E-PG Neurone | | E-PG Neurone | | E-PG Neurone | | CS | |
|-----------------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|---------|---|
| | R19G02 | | R26C04 | | R26B12 | | R60D05 | | | |
| GAL4 | R19G02 | | R26C04 | | R26B12 | | R60D05 | | ∅ | ∅ |
| Effektor | ∅ | UAS-TNT | ∅ | UAS-TNT | ∅ | UAS-TNT | ∅ | UAS-TNT | UAS-TNT | ∅ |
| Buridan | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Persistenz | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + |
| Detour | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + |
| IODA | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + |

Abbildung 40: Tabellarische Zusammenfassung der Auswirkung auf das Verhalten nach Verhinderung der synaptischen Transmission an Synapsen der E-PG Neurone. Aus Abbildung 39. Nach Unterbindung der Neurotransmitterausschüttung in den synaptischen Spalt über Expression von TNT unter der Kontrolle verschiedener E-PG Neuronentreiber, wurde die Auswirkung auf die verschiedenen Orientierungsleitungen untersucht. *Buridan*-Paradigma (visuelle Orientierung); *Persistenz*-Paradigma (Persistenz der Orientierung); *Detour*-Paradigma (visuelles Orientierungsgedächtnis) und *IODA* (idiothetisches Orientierungsgedächtnis). ∅ = kein Treiber/Effektor; +: intakte Orientierung; -: Verlust der Orientierung. Statistische Werte siehe Tabelle 19.

| Neuronen-Klasse | P-EN Neurone | | P-EN Neurone | | P-EN Neurone | | P-EN Neurone | | AOTU | |
|-----------------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------|---------|
| | +AOTU | | +AOTU | | +AOTU | | +AOTU | | | |
| GAL4 | R13D05 | | R37F06 | | R12D09 | | R41G11 | | R49E09 | |
| Effektor | ∅ | UAS-TNT | ∅ | UAS-TNT | ∅ | UAS-TNT | ∅ | UAS-TNT | ∅ | UAS-TNT |
| Buridan | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Persistenz | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Detour | + | n.t. | + | - | + | n.t. | + | n.t. | + | n.t. |
| IODA | + | n.t. | + | - | + | n.t. | | | + | n.t. |

Abbildung 41: Tabellarische Zusammenfassung der Auswirkung auf das Verhalten nach Verhinderung der synaptischen Transmission an Synapsen der P-EN Neurone und/oder AOTU. Aus Abbildung 39. Nach Unterbindung der Neurotransmitterausschüttung in den synaptischen Spalt über Expression von TNT unter der Kontrolle verschiedener E-PG Neuronentreiber, wurde die Auswirkung auf die verschiedenen Orientierungsleistungen untersucht. *Buridan*-Paradigma (visuelle Orientierung); *Persistenz*-Paradigma (Persistenz der Orientierung); *Detour*-Paradigma (visuelles Orientierungsgedächtnis) und *IODA* (idiothetisches Orientierungsgedächtnis). ∅ = kein Treiber/Effektor; +: intakte Orientierung; -: Verlust der Orientierung; n.t.: nicht testbar. Statistische Werte siehe Tabelle 19.

Tabelle 19 (nächste Seite): Statistische Werte nach Inaktivierung der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU mit *Tetanustoxin* (TNT) im *IODA*. Aus Abbildung 39. n= Anzahl getesteter Tiere; p= Signifikanzniveau; t-Teststatistik (t= Abweichung der Mittelwerte); Wilcoxon Teststatistik (W= Summe der Ränge bei ungepaarten Daten; V= Summe der positiven Ränge bei gepaarten Daten); getestet wurde unter Rotlichtbedingungen.

| Genotyp | Neuron | Trainingsphase gegen 60s | | | Testphase gegen 60s | | | Trainingsphase gegen Testphase | | |
|---|--------|--------------------------|--------|-----|----------------------|---------|----|--------------------------------|--------------|-----|
| | | p | t | W | p | t | W | p | t | V |
| +Y;;R19G02-GAL4/III N= 20 | E-PG | 3,26e ⁻⁰⁹ | 10,3 | | 9,50e ⁻⁰⁵ | | 21 | 0,02377 | | 166 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R19G02-GAL4/III n= 19 | | 1,67e ⁻⁰⁵ | 5,8105 | | 0,7128 | -0,3739 | | 8,32e ⁻⁰⁶ | 6,1487 | |
| +Y;;R26C04-GAL4/III n= 19 | | 8,47e ⁻⁰⁹ | 10,417 | | 3,41e ⁻⁰⁷ | 8,0396 | | 0,315 | 1,0354 | |
| w/Y;UAS-TNT/II;R26C04-GAL4/III | | 2,36e ⁻⁰⁵ | 5,5504 | | 0,3152 | -1,0317 | | 3,73e ⁻⁰⁴ | 4,2877 | |
| +Y;;R26B12-GAL4/III | | 1,08e ⁻⁰⁷ | 8,2383 | | 1,51e ⁻⁰⁶ | 6,8642 | | 0,9582 | 0,0531 57 | |
| w/Y;UAS-TNT/II;R26B12-GAL4/III | | 3,11e ⁻⁰⁴ | | 202 | 0,5131 | -0,6665 | | 4,78e ⁻⁰⁴ | | 199 |
| +Y;;R60D05-GAL4/III | | 2,08e ⁻⁰⁷ | 7,8842 | | 7,19e ⁻⁰⁷ | 7,2367 | | 0,8147 | 0,2376 8 | |
| w/Y;UAS-TNT/II;R60D05-GAL4/III | | 1,05e ⁻⁰⁷ | 8,2568 | | 0,362 | 0,9341 | | 5,91e ⁻⁰⁴ | 4,1134 | |
| +Y;;R13D05-GAL4/III n= 18 | P-EN | 3,33e ⁻⁰⁸ | 9,4883 | | 3,72e ⁻⁰⁷ | 7,9897 | | 0,2601 | 1,1649 | |
| w/Y;UAS-TNT/II;R13D05-GAL4/III | | Nicht testbar | | | | | | | | |
| +Y;;R37F06-GAL4/III n= 20 | | 1,59e ⁻⁰⁹ | 10,765 | | 2,84e ⁻⁰⁵ | 5,4654 | | 0,2409 | 1,2105 | |
| w/Y;UAS-TNT/II;R37F06-GAL4/III n= 20 | | 7,94e ⁻⁰⁵ | 5,0008 | | 0,264 | -1,1511 | | 2,38e ⁻⁰⁴ | 4,5124 | |
| +Y;;R12D09-GAL4/III n= 20 | | 5,60e ⁻¹⁰ | 11,461 | | 5,77e ⁻⁰⁶ | 6,2094 | | 0,0841 | 1,8229 | |
| w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III | | Nicht testbar | | | | | | | | |
| +Y;;R49E09-GAL4/III n= 18 | AOTU | 3,05e ⁻⁰³ | | 154 | 5,54e ⁻⁰⁹ | 10,719 | | 0,08107 | | 126 |
| w/Y;UAS-TNT/II;R49E09-GAL4/III | | Nicht testbar | | | | | | | | |

3.8 Histologie

Zur Überprüfung der Expressionsmuster der verwendeten Treiber wurde das Fluoreszenzprotein *Green Fluorescent Protein* (GFP) unter der Kontrolle der einzelnen Treiber exprimiert. Anschließend wurden Ganzpräparate (Whole Mounts) angefertigt und die Fluoreszenz mit Hilfe eines Laserscanningmikroskops aufgenommen (siehe Kapitel 2.5 Histologie)

3.8.1 Expressionsmuster Ringneuronen-spezifischer Treiber

Der Ellipsoidkörper kann klassisch in vier Ringneuronensysteme unterteilt werden (R1,R2,R3,R4 mit R4m und R4d) (Renn et al. 1999), seit neuerem werden auch zwei weitere, äußere Ringtypen beschrieben, R5 und R6, sowie eine Unterteilung des Ringsystems R3 in R3a, R3d, R3m, R3p und R3w (Omoto et al. 2017; Omoto et al. 2018).

3.8.1.1. Ringsystem R1

Das Ringsystem R1 besteht aus 13 ± 2 Neuronen pro Hemisphäre (Omoto et al. 2018) und projiziert von den *lateralen akzessorischen Loben* (LAL) über den *Zentralkanal* zum posterioren Teil des EK und besitzt als einziges Ringsystem keine neuronalen Verzweigungen in die *Bulbi* (BU). Exklusive Treiber für dieses Ringsystem sind R31A12-GAL4 und c105-GAL4 (Omoto et al. 2018). Nach Expression von GFP unter der Kontrolle von R31A12-GAL4 ist sowohl ein GFP-Signal im inneren Ring des EK, als auch den LAL zu erkennen (Abbildung 42).

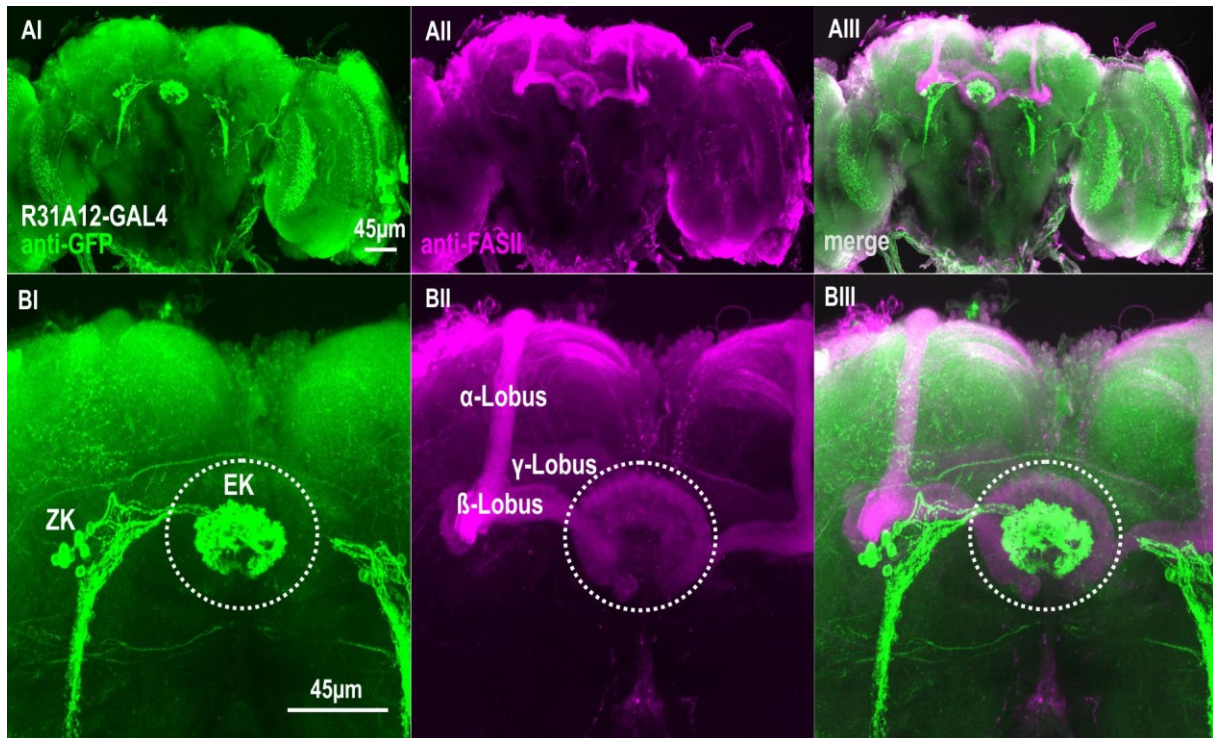


Abbildung 42: Expressionsmuster des Treibers R31A12-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R31A12-GAL4 (AI-CI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-CII) als Referenz. (AIII-CIII) Expression von GFP und FASII. (BI-BIII) linke Hemisphäre, (CI-CIII) rechte Hemisphäre. EK=Ellipsoidkörper; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 104,25µm; BI-BIII: 210µm.

Nach Renn et al., 1999 wird auch der Treiber 198Y-GAL4 als exklusiver R1-Treiber beschrieben. (Renn et al. 1999). Jedoch konnte in dieser Arbeit keine Expression von GFP unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 beobachtet werden (Abbildung 43 BI, dünn gepunkteter Kreis; BII Gegenfärbung mit anti-FASII, Lage des EK, dicht gepunkteter Kreis). Jedoch zeigte sich in Orientierungsparadigma *IODA*, dass dieser Treiber in Kombination mit verschiedenen Effektorstrukturen durchaus einen Effekt auf das Orientierungsverhalten ausübt (siehe Abbildung 20, 22 und Abbildung 28). Jedoch wurde die Färbung über ein Jahr nach den Verhaltensexperimenten durchgeführt, wodurch das fehlende GFP-Signal möglicherweise durch einen Verlust der GAL4-Aktivität des Treibers innerhalb dieses Zeitraums zu erklären wäre.

Renn et al., konnten zwar ein GFP-Signal von 198Y-GAL4 zeigen, jedoch ist, wenn auch nur schwach, GFP-Expression in den Bulbi zu erkennen, was unter der Kontrolle des R1 Treibers c105-GAL4 nicht der Fall war (Renn et al. 1999). Somit ist es wahrscheinlich, dass 198Y-GAL4 nicht nur in R1 exprimiert, sondern noch weitere Ringsysteme anspricht. Somit wird 198Y-GAL4 in die Kategorie „R1 plus“ eingeordnet. Die Verwendung von c105-GAL4 als alternativen R1 Treiber für die Verhaltensexperimente, erwies sich jedoch nicht als sinnvoll, da unter der Kontrolle von c105-GAL4 in der immunhistologischen Untersuchung ebenfalls kein GFP-Signal erkennbar war. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Treiber seine Aktivität verloren hatte, bzw. es konnte keine Aussage über das Expressionsmuster getroffen werden.

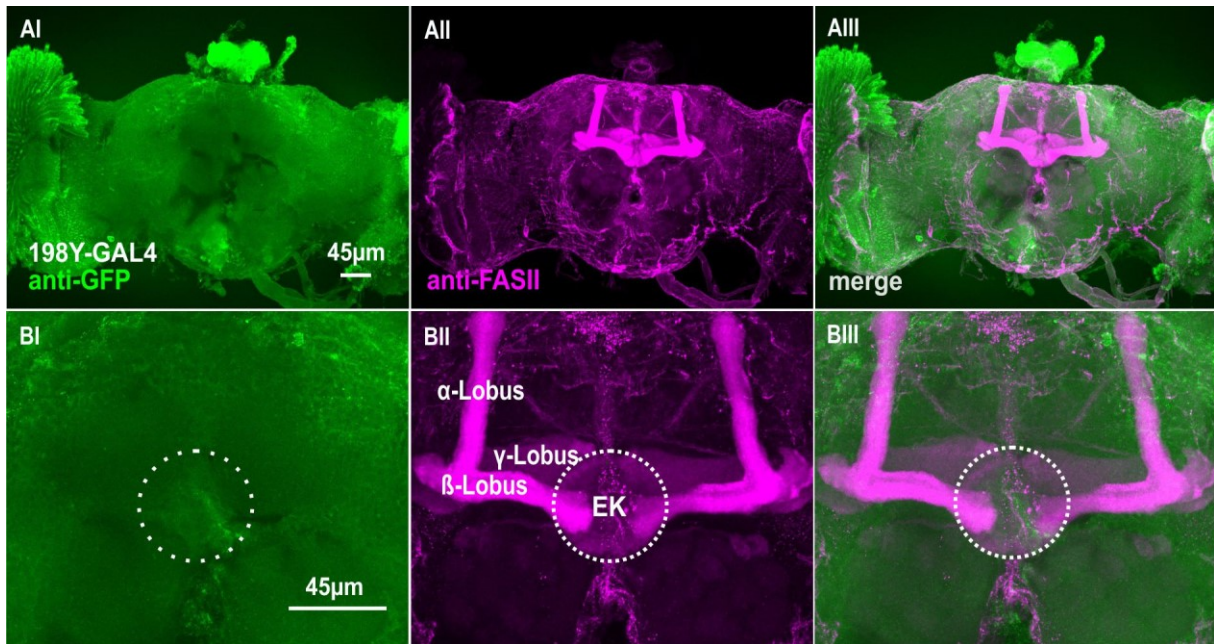


Abbildung 43: Expressionsmuster des Treibers 198Y-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. Kein GFP-Signal im Ellipsoidkörper (BI). EK=Ellipsoidkörper; Optische Schichtdicke: AI-AIII: 115,5 µm; BI-BIII: 81,75µm.

3.8.1.2. Ringsystem R2

Das Ringsystem R2 wird aus 23 ± 2 Zellen jeder Hemisphäre gebildet (Omoto et al. 2018). Die Axone der Neurone folgen dem *lateralen Ellipsoidkörper Faszikel* (LE), um den anterioren Teil des EK, durch den *Zentralkanal* und projizieren zentrifugal in den äußeren Teil des inneren Rings. Die Bulbi werden von proximalen dendritischen Enden der R2-Neurone innerviert. R2 spezifische Treiber sind R78B06-GAL4, c42-GAL4 und EB1-GAL4 (Omoto et al. 2018). Die Expression von GFP über EB1-GAL4 zeigt GFP-Signale im äußeren Teil des EK (Abbildung 44 BI), den Bulbi (Abbildung 44 BI, CI) und ca. 20-25 Zellen pro Hemisphäre (HS) (Abbildung 44 CI), $n_{HS} = 6$.

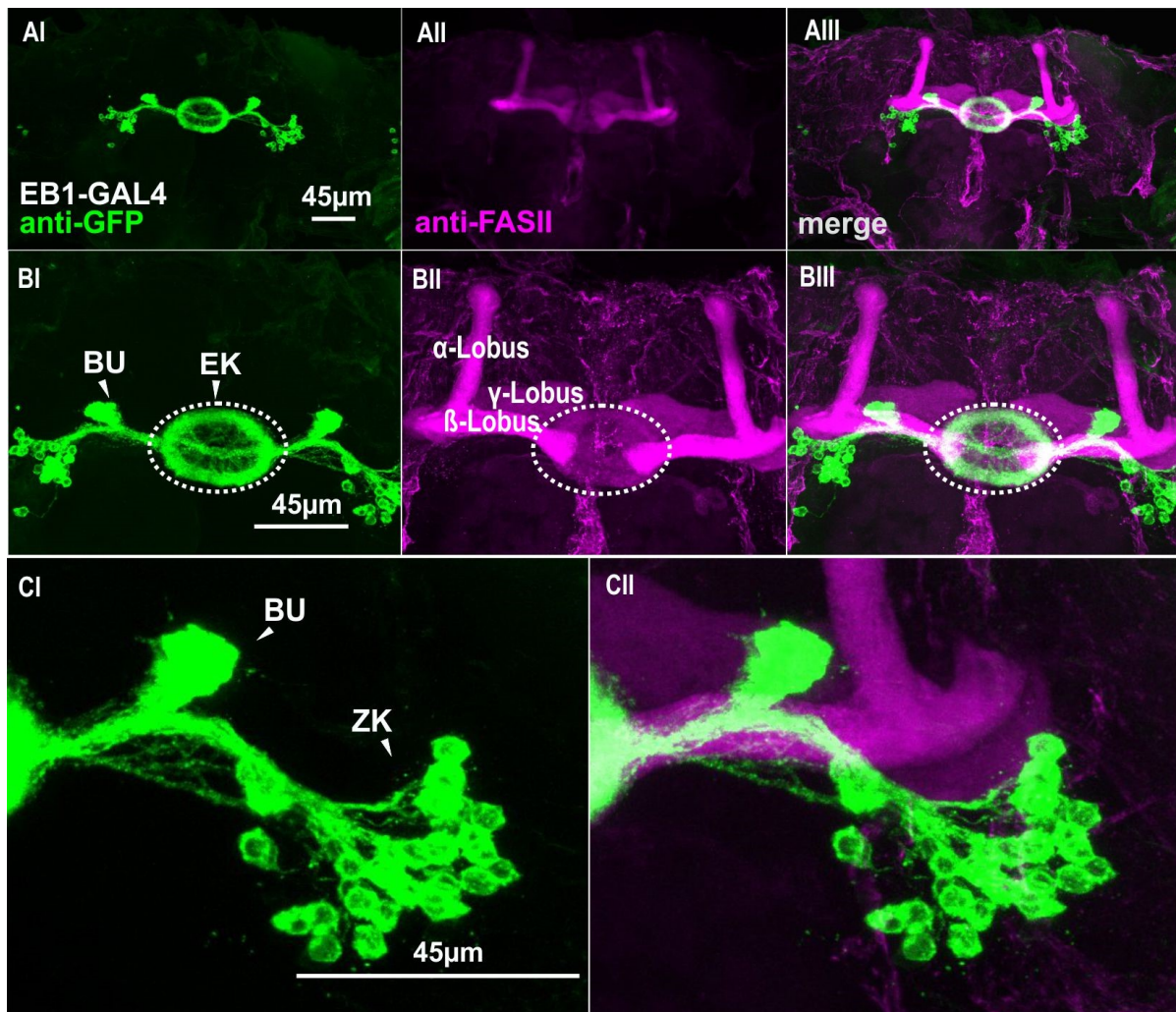


Abbildung 44: Expressionsmuster des Treibers EB1-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von EB1-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme rechte Hemisphäre (CI-CII). EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 93,75 μ m; BI-BIII: 67,5 μ m; CI-CII: 61,5 μ m.

Der Treiber R19C08-GAL4 wird ebenfalls als R2-Treiber eingeordnet (Omoto et al. 2017) und zeigt ein ähnliches Expressionsmuster (Abbildung 45) wie EB1 (Abbildung 44). Pro Hemisphäre sind hier ca. 19-25 Zellkörper angefärbt ($n_{HS}=6$). Jedoch zeigt die Doppelfärbung von R19C08-lexA und R28D01-GAL4 eine Koexpression in mindestens einem Zellkörper jeder Hemisphäre (Abbildung 65). Damit kann eine Expression von R19C08-GAL4 in anderen Ringsystemen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wird R19C08-GAL4 in die Kategorie „R2 plus“ eingeordnet.

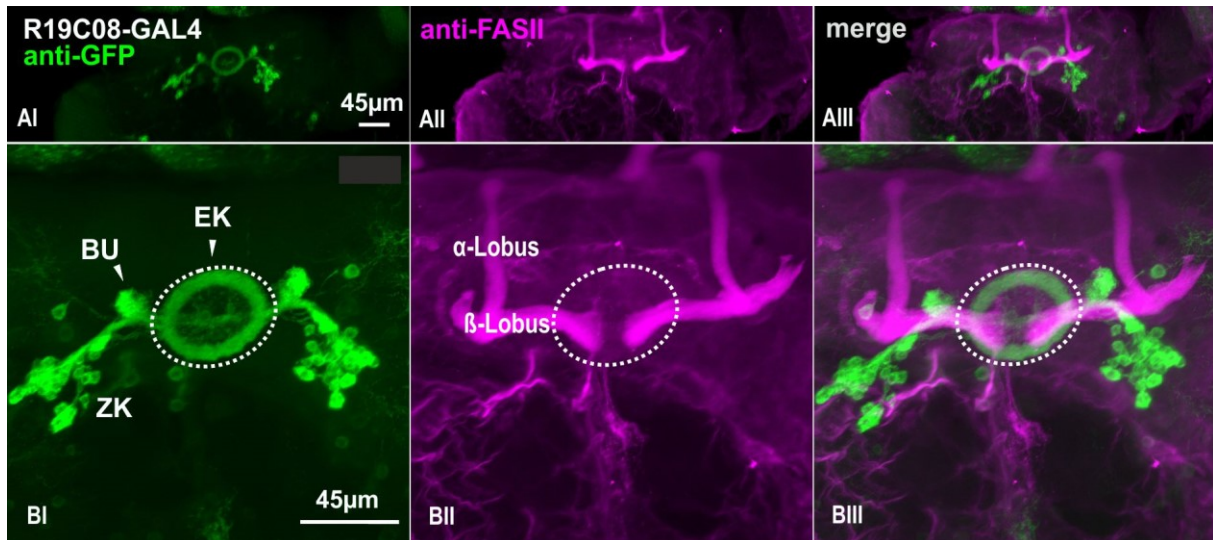


Abbildung 45: Expressionsmuster des Treibers R19C08-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R19C08-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 192µm; BI-BIII: 126,25µm.

Die Expression von GFP unter der Kontrolle des als R2-spezifisch postulierten Treibers VT49921-GAL4 (Lin et al. 2013) zeigt ebenfalls ein Fluoreszenzsignal im äußeren Teil des EK und den Bulbi, jedoch ist nur in fünf bis acht Zellkörpern jeder Hemisphäre ein GFP-Signal zu erkennen (Abbildung 46 BI, CI), $n_{HS}=6$. Aufgrund der wenigen, angefärbten Zellkörper ist es möglich, dass VT49921-GAL4 nicht das gesamte Ringsystem R2 umfasst, daher wird auch VT49921-GAL4 in die Treiberkategorie „R2 minus“ eingeordnet, da das Expressionsmuster nicht mit den vorgegebenen Kriterien übereinstimmt (Omoto et al. 2018).

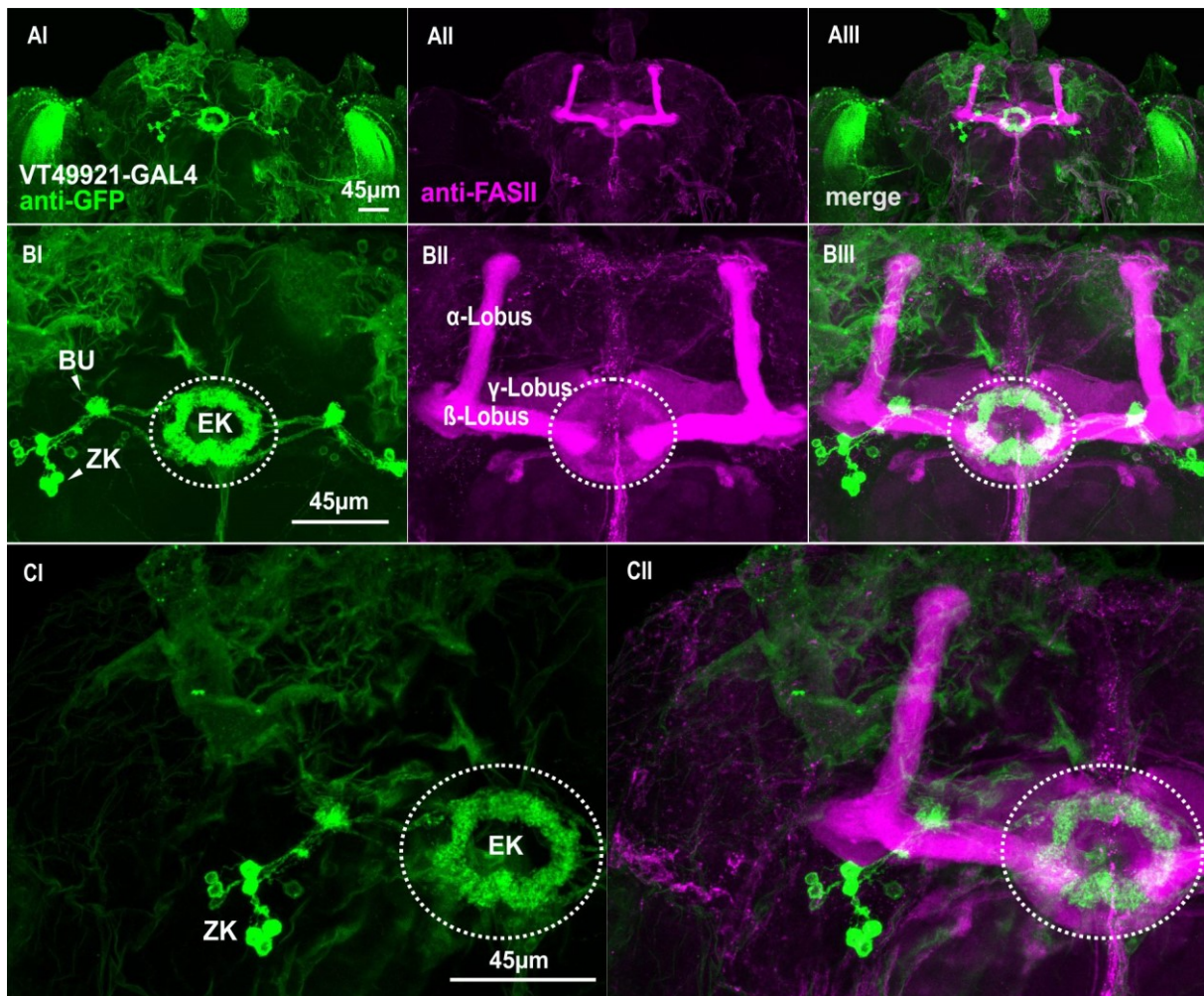


Abbildung 46: Expressionsmuster des Treibers VT49921-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von VT49921-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme linke Hemisphäre (CI-CII). EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 123µm; BI-BIII: 96µm; CI-CII: 53,25µm.

3.8.1.3. Ringsystem R3

Das dritte Ringsystem R3 kann in die Subklassen R3a, R3d, R3m, R3p und R3w unterteilt werden. Der Treiber 189Y-GAL4 wurde bis Ende 2018 als globaler R3-Treiber definiert (Renn et al. 1999), jedoch spricht er nur einen Teil des dritten Ringsystems an, definiert als R3d und R3p. Die Ringsysteme innervieren den inneren, posterioren Teil des EK und einen Teil der Bulbi (Omoto et al. 2018).

Die Expression von GFP unter der Kontrolle von 189Y-GAL4 zeigt ein Signal im inneren Teil des EK, den Bulbi (Abbildung 47 BI) und ca. 18-24 Zellkörper pro Hemisphäre. Überdies ist zusätzlich eine Expression in den Pilzkörpern (PK) zu beobachten (Abbildung 47 BI;CI), $n_{HS}=6$.

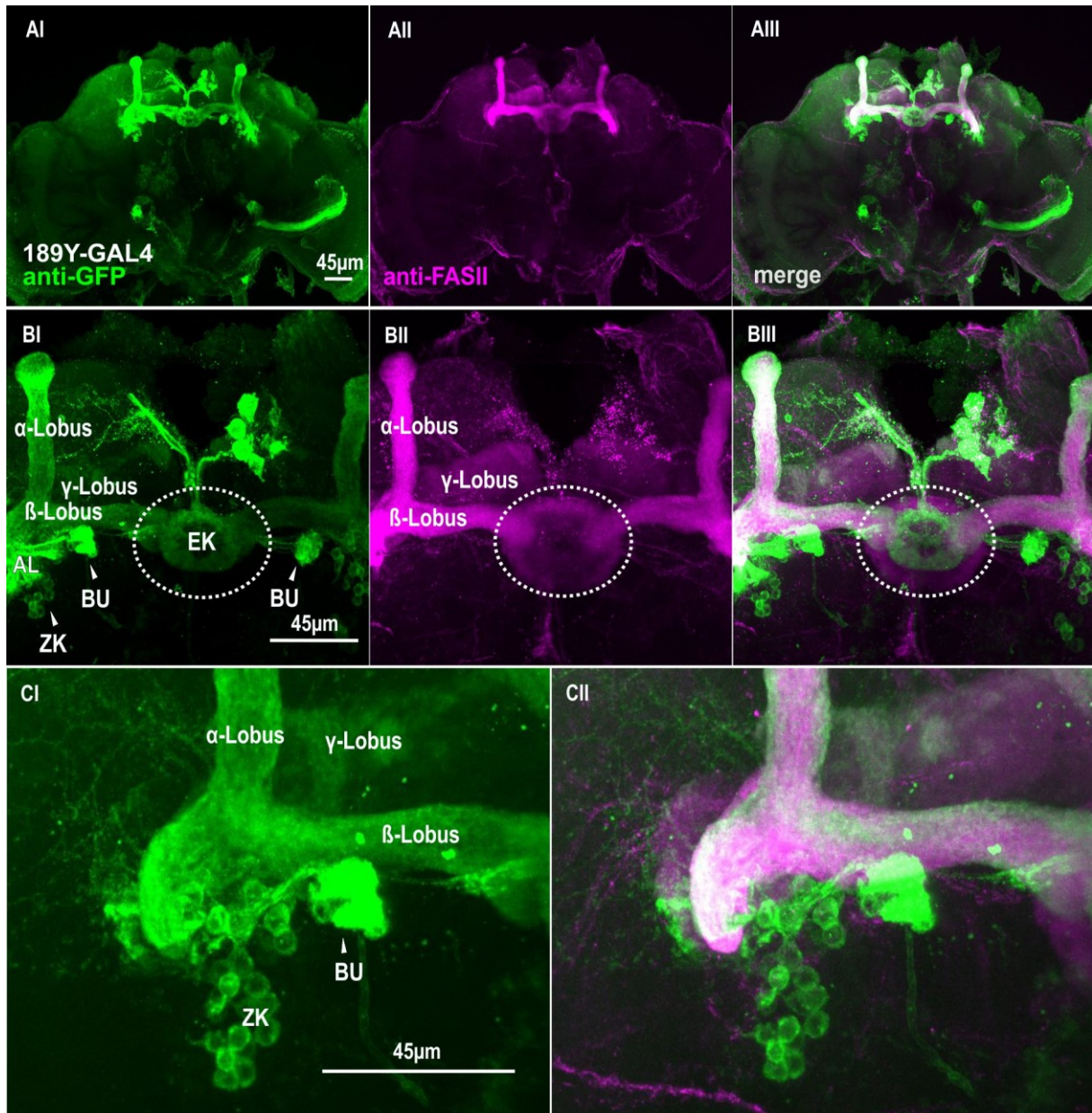


Abbildung 47: Expressionsmuster des Treibers 189Y-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von 189Y-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme linke Hemisphäre (CI-CII). Neben der Expression im EK adressiert 189Y-GAL4 auch die PK (AI-CI). EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper; AL=Antennalloben. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 124; BI-BIII: 93µm; CI-CII: 68,25µm.

Obwohl der Treiber R28D01-GAL4 in vorausgegangenen Arbeiten als R1 spezifisch beschrieben wurde (Ofstad et al. 2011), muss dieser Treiber aufgrund seiner Expression im anterioren Teil der Bulbi als R1 exklusiver Treiber ausgeschlossen werden (Abbildung 48 BI). Nach Omoto et al. exprimiert R28D01-GAL4 im Ringsystem R3m (Omoto et al. 2018). Zwar zeigt sich eine nur schwache Expression von GFP unter der Kontrolle von R28D01-GAL4, jedoch zeigt sich eine Rettung des Orientierungsverhaltens der Tiere im *IODA*, sobald über diesen Treiber *rut*-cDNA bzw. *dnc*-cDNA im jeweiligen mutanten Hintergrund exprimiert wird (siehe Abbildung 24 und Abbildung 31).

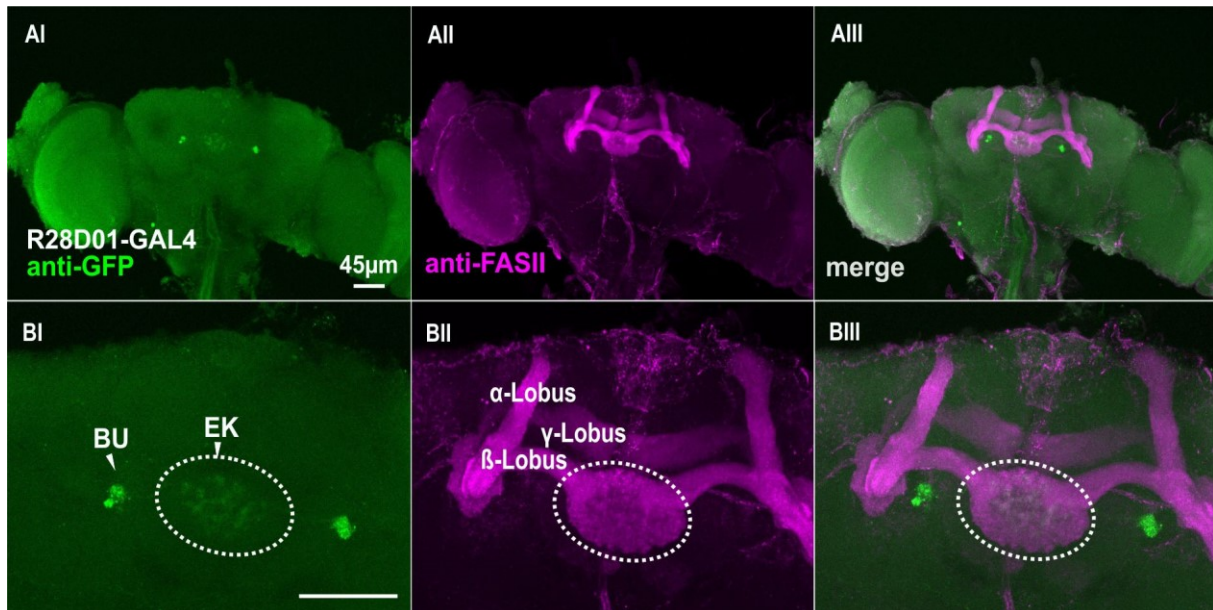


Abbildung 48: Expressionsmuster des Treibers R28D01-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R28D01-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 71,25µm; BI-BIII: 43,5µm.

R54B05-lexA wurde als R3-spezifischer Treiber mit Expression im inneren zentralen und inneren posterioren Teil des EK, sowie im inferioren Teil der Bulbi, beschrieben [R54B05-lexA, (Omoto et al. 2017)]. Auch in der vorliegenden Arbeit ist bei Verwendung von R54B05-lexA eine Expression von GFP im EK zu erkennen (Abbildung 67) und ein Effekt mit R54B05-GAL4 auf das Orientierungsverhalten im *rut^{RNAi}* Experiment war gegeben (siehe Abbildung 32).

Es war jedoch nicht möglich, GFP unter der Kontrolle von R54B05-GAL4 zu exprimieren (Abbildung 49 BI, dünn gepunkteter Kreis; BII Gegenfärbung mit anti-FASII, Lage des EK, dicht gepunkteter Kreis). Um auszuschließen, dass eventuell vorhandene genetische Modifikatoren einen Einfluss auf die Expression dieses Treibers ausüben, wurde eine dreimalige Rückkreuzung mit der Wildtypelinie CS durchgeführt (siehe Anhang), um das restliche Genom wieder in den wildtypischen Zustand zu versetzen und damit die Modifikatoren zu entfernen. Doch auch mit wildtypischen Hintergrund konnte kein GFP – Signal detektiert werden.

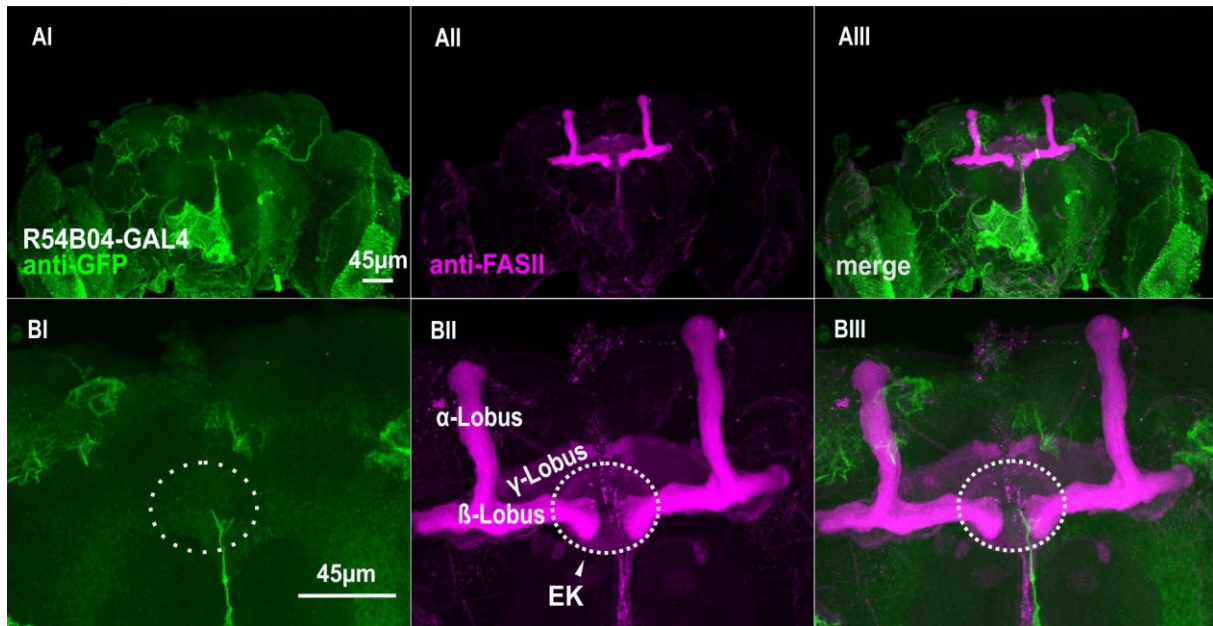


Abbildung 49: Expressionsmuster des Treibers R54B05-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R54B05-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. Es ist keine Expression von GFP im EK zu erkennen (AI-BI). EK=Ellipsoidkörper. Anzahl der Schichten: AI-AIII: 116,25µm; BI-BIII: 108µm.

Wird GFP unter der Kontrolle von VT42759-GAL4 exprimiert, so ist eine Expression im inneren Teil des EK, den Bulbi (Abbildung 50 BI) und in ca. elf bis 15 Zellkörpern jeder Hemisphäre zu erkennen (Abbildung 50 CI, CII), $n_{HS} = 6$. Der Treiber VT42759-GAL4 wurde bis jetzt als globaler R3-Treiber postuliert (Lin et al. 2013). Da die Anzahl der dargestellten Zellkörper jedoch nicht der erwarteten Zahl entspricht, ist es wahrscheinlich, dass VT42759-GAL4 nur eine Subklasse von R3 anspricht. Möglicherweise könnte VT42759-GAL4 das Subsystem R3a adressieren, da dieses Ringsystem 11 ± 0 Zellkörper pro Hemisphäre besitzt (Omoto et al. 2018), oder es könnten ebenfalls nicht alle Zellkörper eines der übrigen R3-Subsysteme angefärbt worden sein. Daher wird VT42759-GAL4 in die Kategorie R3 minus eingeordnet.

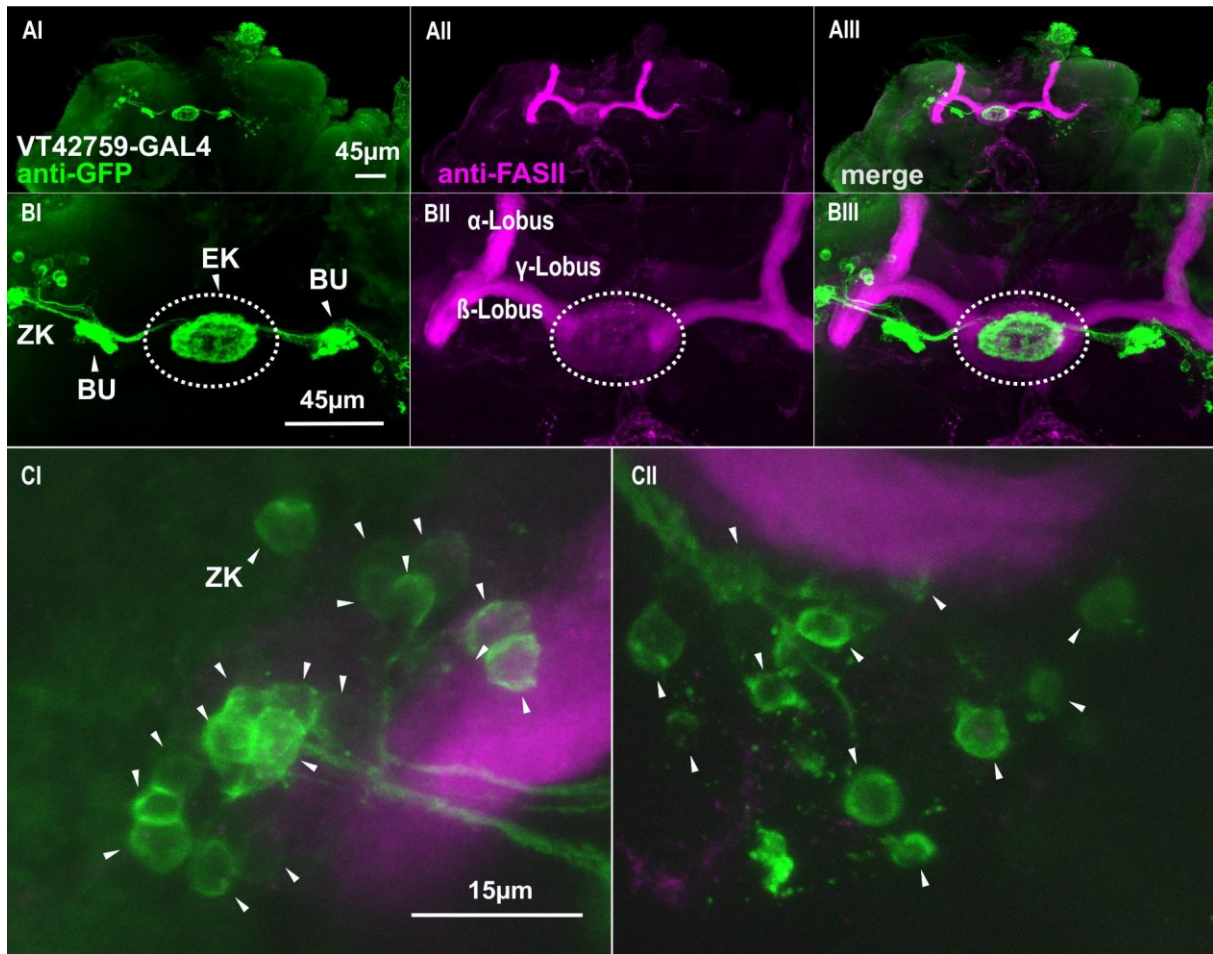


Abbildung 50: Expressionsmuster des Treibers VT42759-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von VT42759-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII; BIII; CI-CII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme linke Hemisphäre (CI) und rechte Hemisphäre (CII). EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 78µm; BI-BIII: 63,75µm; CI: 65,25µm; CII: 111µm.

3.8.1.4. Ringsystem R4

Das vierte Ringsystem liegt im peripheren und zentripetalen, äußeren Teil des EK und innerviert die Bulbi. Es kann in R4d (distal) mit je acht Zellkörpern pro Hemisphäre und R4m (medial), mit je 11 ± 3 Zellkörpern unterteilt werden (Omoto et al. 2018). Ein im vierten Ringsystem exprimierender Treiber ist *ftz-ng-GAL4* (Thran 2013).

Nach Expression von GFP über *ftz-ng-GAL4*, ist ein GFP-Signal im äußeren Teil des EK zu erkennen, sowie in den Bulbi und in je ca. fünf bis 12 Zellkörpern pro Hemisphäre (Abbildung 51 und Abbildung 52), $n_{HS} = 6$. Würde *ftz-ng* global in R4 exprimieren, so müssten mindestens 20 Zellkörper auf jeder Seite zu erkennen sein. Vermutlich deckt *ftz-ng-GAL4* nicht das komplette Ringsystem R4 ab, sondern nur einen Teil. Somit wird dieser Treiber in die Kategorie „R4 minus“ eingeordnet.

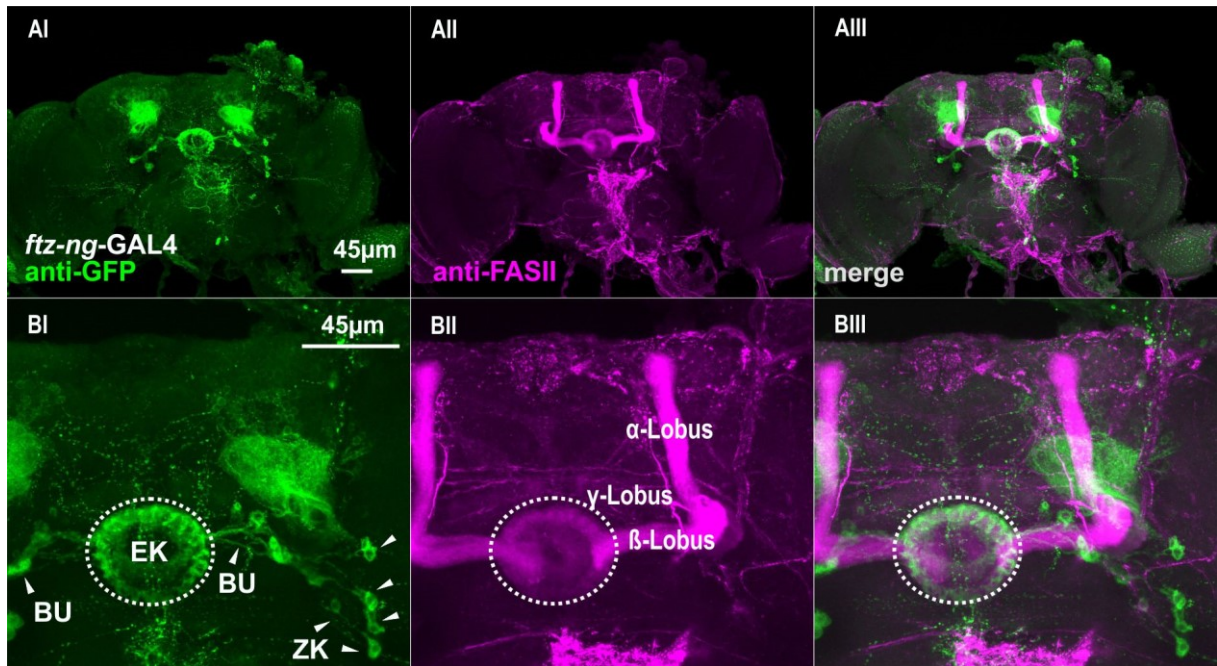


Abbildung 51: Expressionsmuster des Treibers *ftz-ng-GAL4*. Expression von GFP unter der Kontrolle von *ftz-ng-GAL4* (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 123,75µm; BI-BIII: 111,75µm.

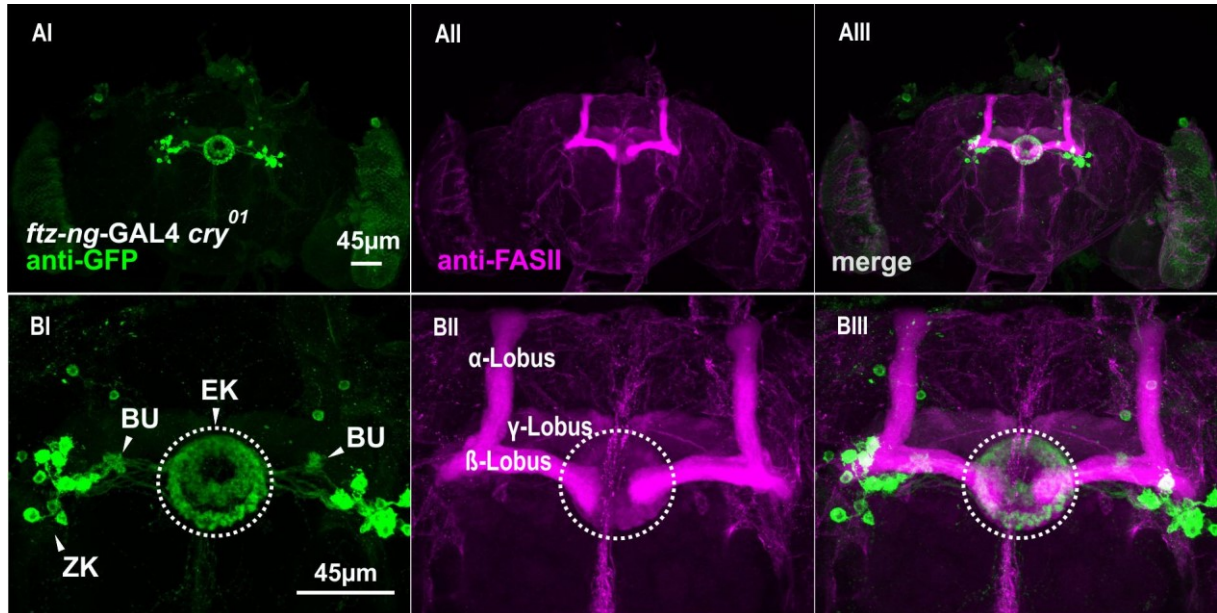


Abbildung 52: Expressionsmuster des rekombinanten Treibers *ftz-ng-GAL4* im *cry⁰¹*-mutanten Hintergrund. Expression von GFP unter der Kontrolle von *ftz-ng-GAL4* (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 90,75µm; BI-BIII: 98,25µm.

Als R4d spezifischen Treiber wurde VT043679-GAL4 verwendet. R4d als R4 Subsystem wird aus acht Neuronen pro Hemisphäre gebildet und projiziert von der Peripherie des EK zentripetal in den äußeren Rand jenes (Omoto et al. 2018). Leider war es nicht möglich, unter der Kontrolle des Treibers VT043679-GAL4 eine GFP-Expression zu erzielen (Abbildung 53), $n_{HS}= 10$. Jedoch scheint das Treiberkonstrukt zur Zeit der Verhaltensexperimente noch Aktivität zu besitzen, denn nach Expression von TNT unter der Kontrolle von VT043679-GAL4, zeigt sich ein Verlust des Orientierungsvermögens im *IODA* (Abbildung 20). Die Antikörperfärbung wurde einige Monate nach den Verhaltensexperimenten durchgeführt, sodass innerhalb dieses Zeitraums ein Verlust der Treiberaktivität aufgetreten sein könnte.

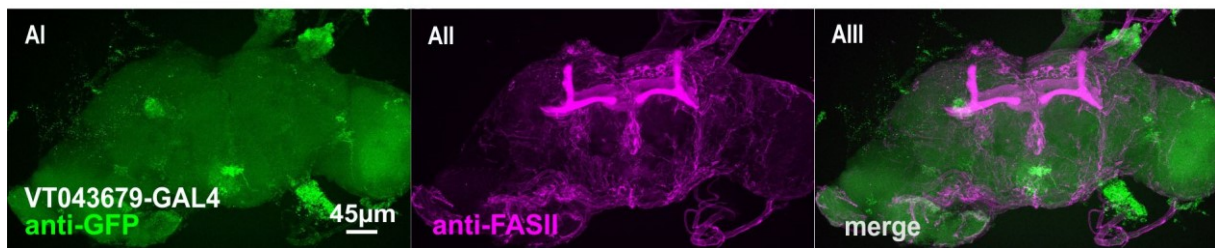


Abbildung 53: Expressionsmuster des Treibers VT043679-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von VT043679-GAL4 (AI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII) als Referenz. (AIII) Expression von GFP und FASII. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 113,25µm.

Der mediale Teil des Ringsystems R4, bezeichnet als R4m, wird von 11 ± 3 Neuronen gebildet und besitzt ein ähnliches Projektionsmuster wie R4d, jedoch sind die terminalen Verzweigungen der Neurone länger und füllen den gesamten inneren Teil des äußeren Rings aus (Omoto et al. 2018). Exprimiert man GFP über den spezifischen R4m-Treiber VT025526-GAL4, so erkennt man eine GFP-Expression im äußeren Teil des EK (Abbildung 54 AII) und den Bulbus, jedoch nur in fünf bis sieben Zellkörpern pro Hemisphäre (Abbildung 54 AIII), $n_{HS}= 6$.

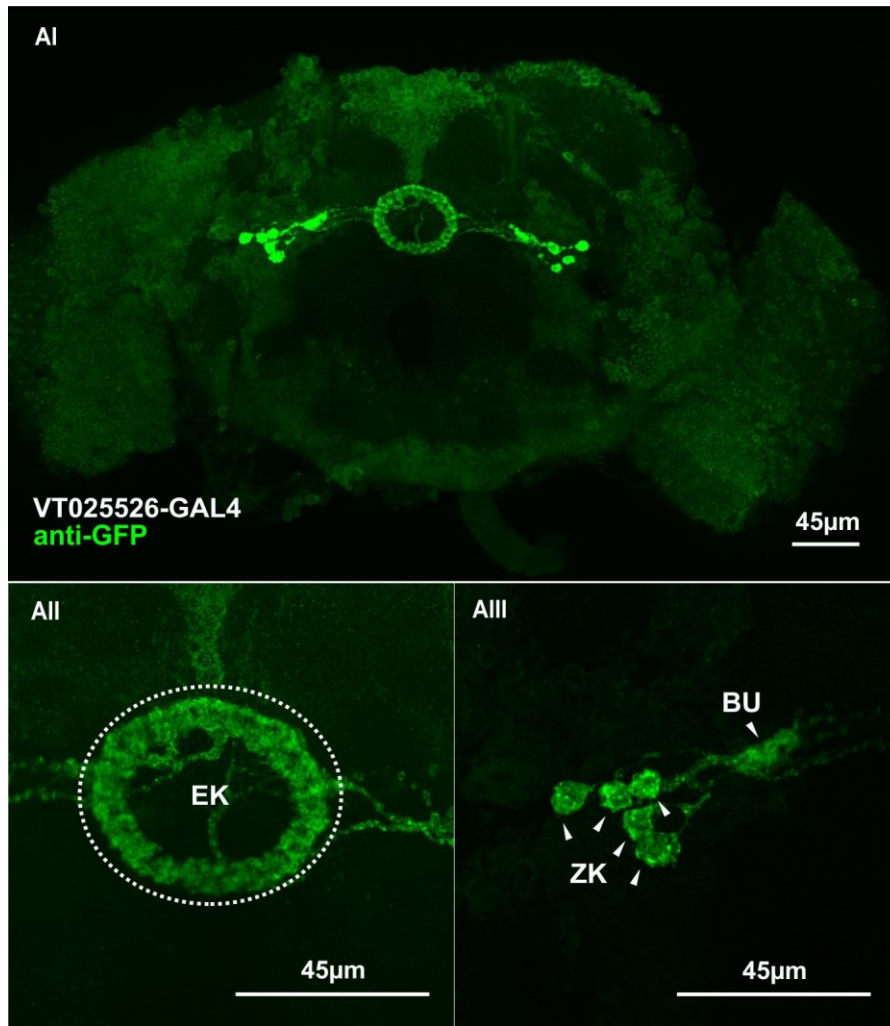


Abbildung 54: Expressionsmuster des Treibers VT025526-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von VT025526-GAL4 (AI). Detailaufnahme des EK (AII) und der Zellkörper (AIII). EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI: 36µm; AII: 26,25µm; AIII: 27,75µm.

3.8.1.5. E-PG Neurone

Eine Neuronenklasse, welche zu den kolumnären Neuronen gezählt wird, sind die E-PG Neurone. Sie projizieren vom peripheren und zentralen Teil des Ellipsoidkörpers zu der Protozerebralbrücke und zur der Gall (Wolff et al. 2015; Turner-Evans et al. 2017).

Der E-PG-Treiber R19G02-GAL4 besitzt Expression im EK und der Gall (Abbildung 55 BI), sowie der Protozerebralbrücke (Abbildung 55 PB in DI). Neben der Expression in den E-PG Neuronen zeigt dieser R19G02-GAL4 auch eine Expression im Fächerförmigen Körper (Abbildung 55 FK in CI). Eine Expression in den Noduli ist nicht eindeutig zu erkennen, n= 3.

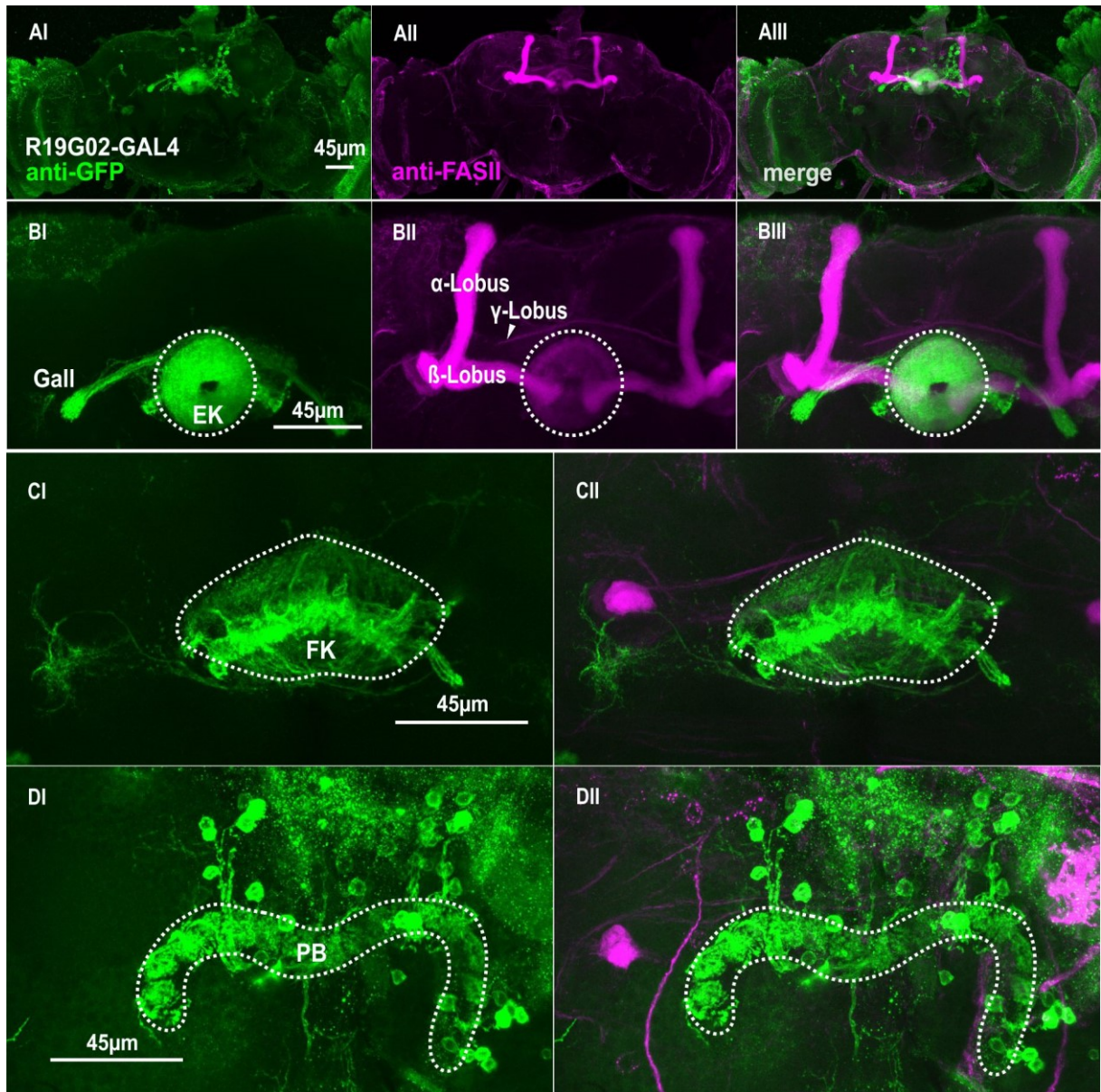


Abbildung 55: Expressionsmuster des Treibers R19G02-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R19G02-GAL4 (AI-DI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BII, CII-DII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme vom EK (BI-BIII, optischer Schnitt 10-64), des FK (CI-CII, optischer Schnitt 64-99) und PB (DI-DII, optischer Schnitt 105-142). EK=Ellipsoidkörper; PB=Protozerebralbrücke; FK=Fächerförmiger Körper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 96µm; BI-BIII: 50,5µm; CI-CII: 26,25µm; DI-DII: 27,75µm.

R26C04-GAL4 zeigt Expression im EK (Abbildung 56) und der PB (Abbildung 56 CI). Der FK zeigt ebenfalls GFP-Expression (Abbildung 56 CII). Auch eine Expression in den Noduli ist zu erkennen (Abbildung 56 BI, CII), nach Wolff et al. inkludiert diese E-PG-Linie auch die Noduli (Wolff et al. 2015). Eine Expression in der Gall kann nicht eindeutig erkannt werden. n= 3.

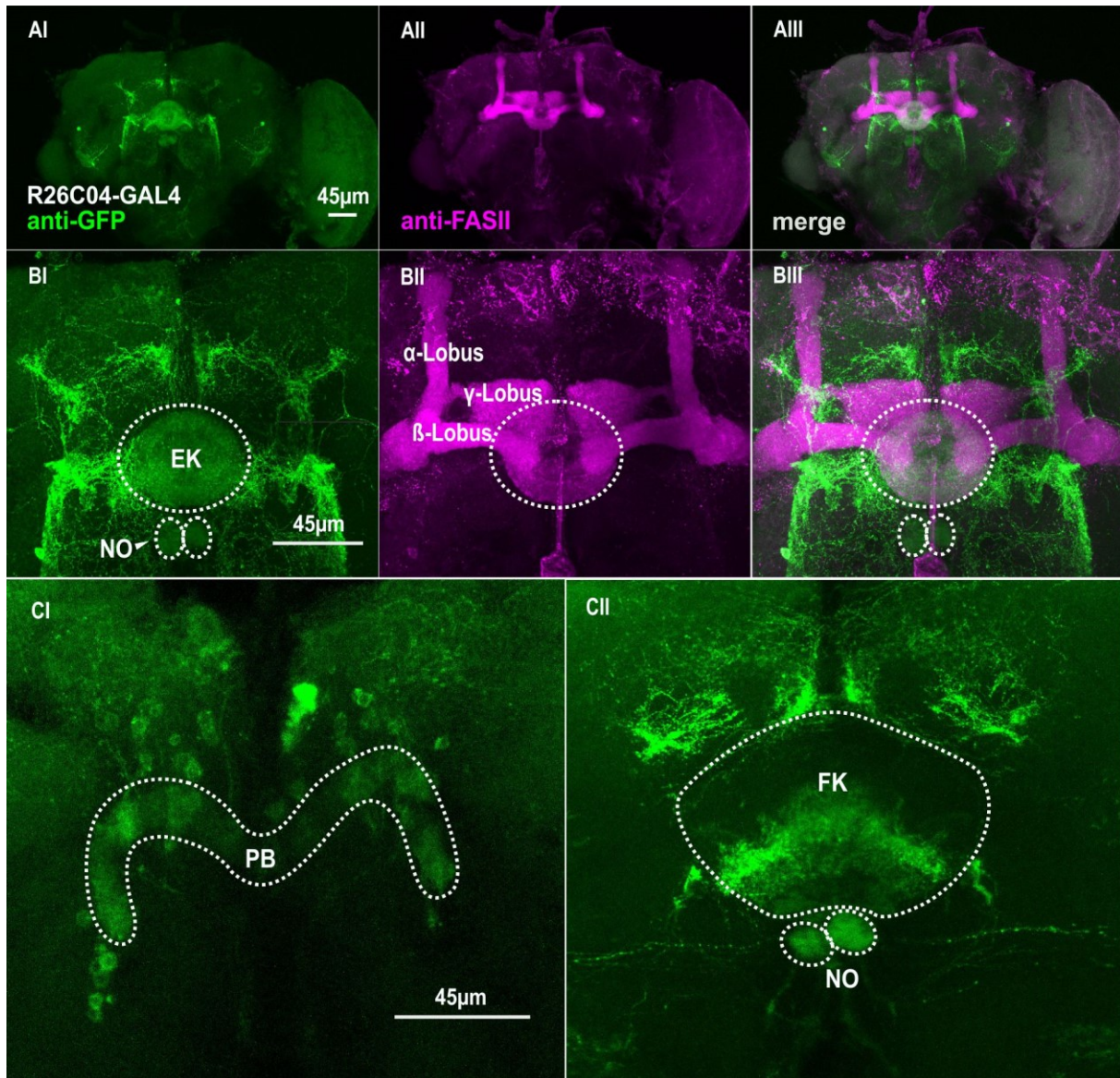


Abbildung 56: Expressionsmuster des Treibers R26C04-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R26C04-GAL4 (AI-CI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BII, CII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme der PB (CI, optischer Schnitt 6-30; CII, optischer Schnitt 45-73), EK=Ellipsoidkörper; PB=Protozerebralbrücke; NO=Noduli. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 93µm; BI-BII: 93µm; CI: 18µm; CII: 21µm.

Unter der Kontrolle von R26B12-GAL4 kann keine GFP-Expression beobachtet werden (Abbildung 57 BI, dünn gepunkteter Kreis; BII Gegenfärbung mit anti-FASII, Lage des EK, dicht gepunkteter Kreis), n= 4. Jedoch wirkt sich eine Expression von TNT in den E-PG Neuronen über diesen Treiber, genauso wie über die E-PG-Treiber, welche eine GFP-Expression erkennen lassen, negativ auf das visuelle und idiothetische Orientierungsgedächtnis auf (siehe Abbildung 36, 37, 38 und Abbildung 39). Daher ist entweder anzunehmen, dass der Treiber R26B12-GAL4 eventuell nur schwach aktiv ist, oder dass die Aktivität des Treibers nach den Verhaltensexperimenten verloren gegangen war, da zwischen der experimentellen Phase und der immunhistologischen Analyse einige Monate vergangen waren.

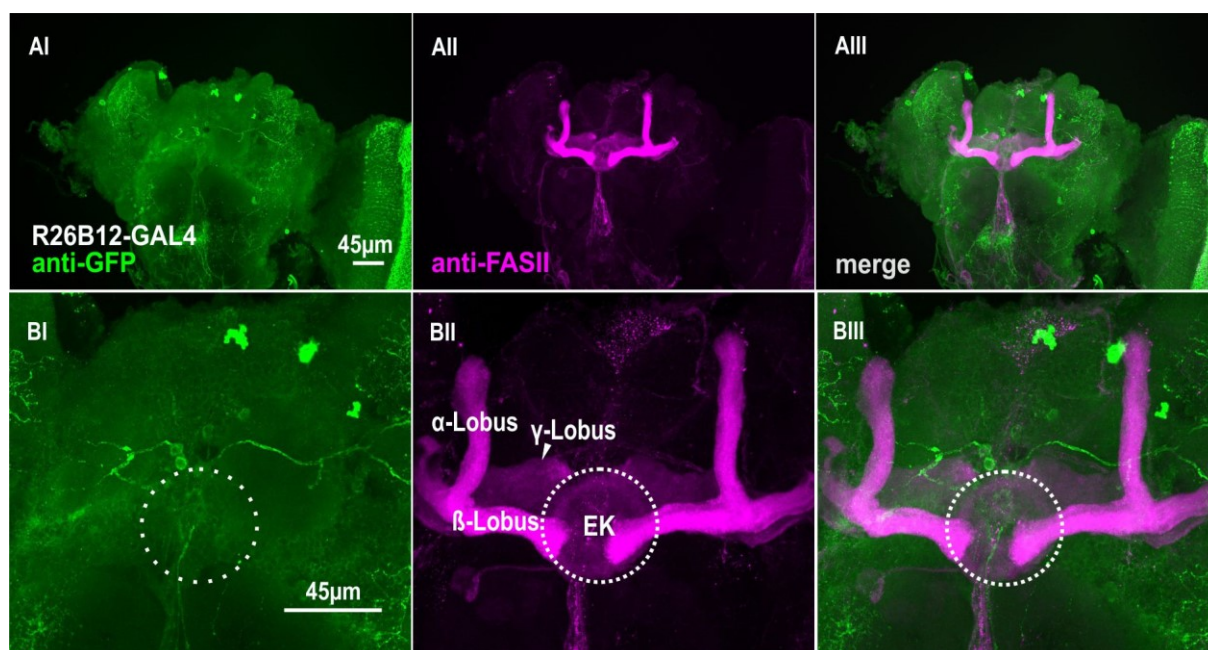


Abbildung 57: Expressionsmuster des Treibers R26B12-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R26B12-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. Es ist kein GFP-Signal im EK zu erkennen (BI). EK=Ellipsoidkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 102,75µm; BI-BIII: 91,5µm;

Auch die Expression von GFP unter der Kontrolle von R60D05-GAL4 ließ kein GFP-Signal im EK (Abbildung 58 dünn gepunkteter Kreis; BII Gegenfärbung mit anti-FASII, Lage des EK, dicht gepunkteter Kreis) oder in Strukturen des CX erkennen (Abbildung 58 A, B), n= 12. Auch die Expression eines alternativen Fluoreszenzproteins (mCherry) unter der Kontrolle dieses Treibers zeigte zwar kein Signal im EK, jedoch zeigen die Pilzkörper überraschenderweise eine RFP- Expression (Abbildung 58 DI), n= 7. Ebenso wie der E-PG-Treiber R26C04-GAL4, welcher auch keine GFP-Expression zeigt, führt die Expression von TNT unter der Kontrolle von R60D05-GAL4 zu einem Verlust des visuellen und nicht-visuellen Orientierungsgedächtnisses (siehe Abbildung 36, 37, 38 und Abbildung 39). Somit besitzt möglicherweise auch R60D05-GAL4 eine nur schwache Expression, welche jedoch ausreichend ist, um nach Kombination mit einem TNT-Konstrukt Einfluss auf das Verhalten auszuüben. Möglich wäre überdies auch hier ein Verlust der Treiberaktivität innerhalb einiger Monate, da auch die

Verhaltensexperimente mit R60D05-GAL4 vor der histologischen Untersuchung stattgefunden haben.

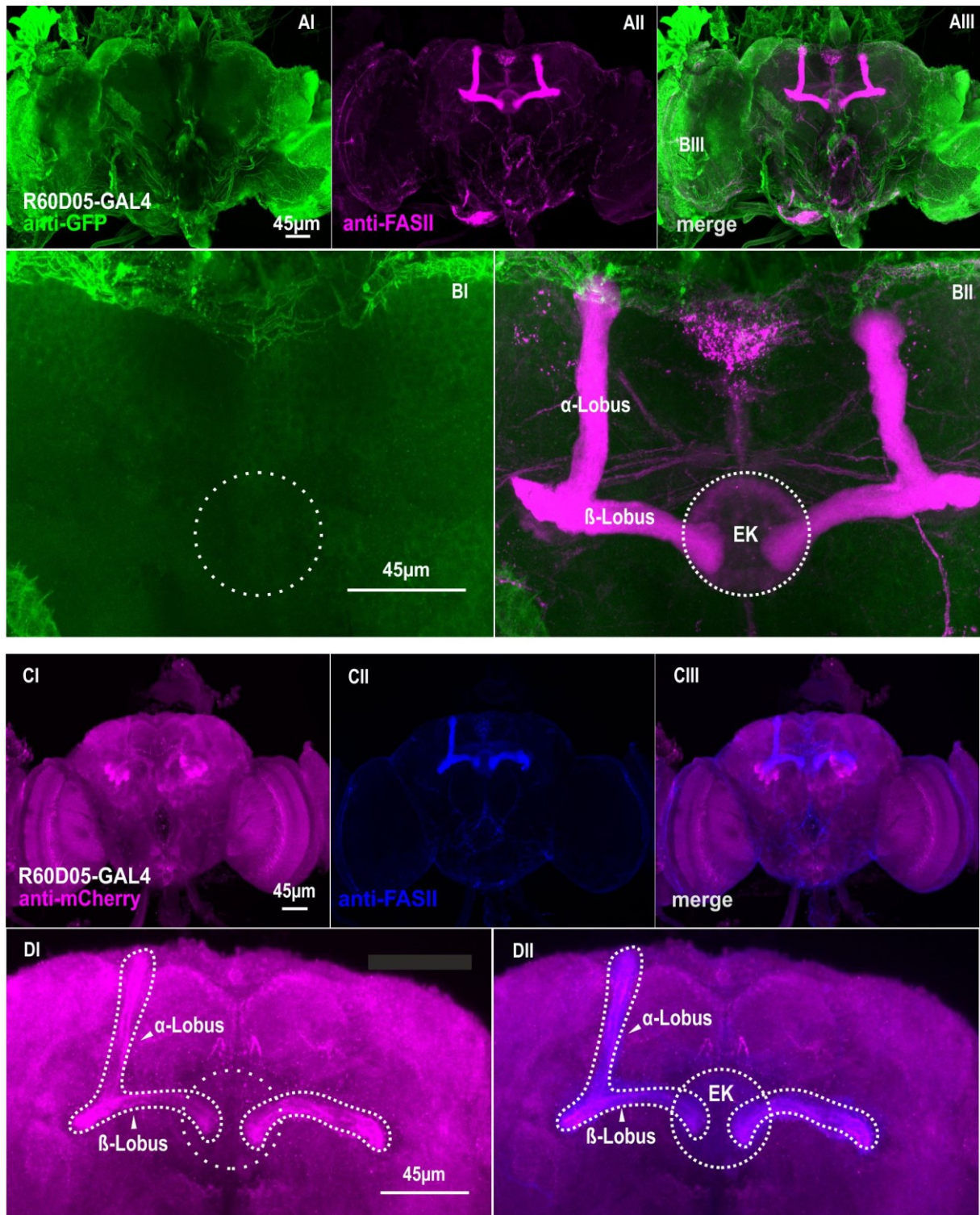


Abbildung 58: Expressionsmuster des Treibers R60D05-GAL4.(A,B) Expression von GFP unter der Kontrolle von R60D05-GAL4 (AI-BI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII) Expression von GFP und FASII. Es ist kein GFP-Signal im EK zu erkennen (BI). Expression von RFP unter der Kontrolle von R60D05-GAL4 (CI-DI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (CII) als Referenz. (CIII-DII) Expression von RFP und FASII. Es ist ebenfalls kein RFP-Signal im EK zu erkennen, jedoch zeigen die PK ein RFP-Signal (DI). EK=Ellipsoidkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 109,5µm; BI-BII: 94,5µm; CI-CIII: 100,5µm; DI-DII: 56,25µm.

3.8.1.6. P-EN Neurone

Eine weitere Klasse der kolumnären Neurone sind die P-EN Neurone. Sie projizieren von der Protozerebralbrücke zum Ellipsoidkörper und den Noduli (Omoto et al. 2018). Der Treiber R37F06-GAL4 zählt zu der Subklasse P-EN1 (Omoto et al. 2018) und soll eine zusätzliche Expression in dem FK besitzen (Wolff et al. 2015), was hier aber nicht beobachtet werden konnte. Die Expression in dem EK, den Noduli (Abbildung 59 BI) und der PB (Abbildung 59 CI) ist jedoch deutlich zu erkennen. Ein GFP-Signal in den AOTUs konnte nicht beobachtet werden, n= 6.

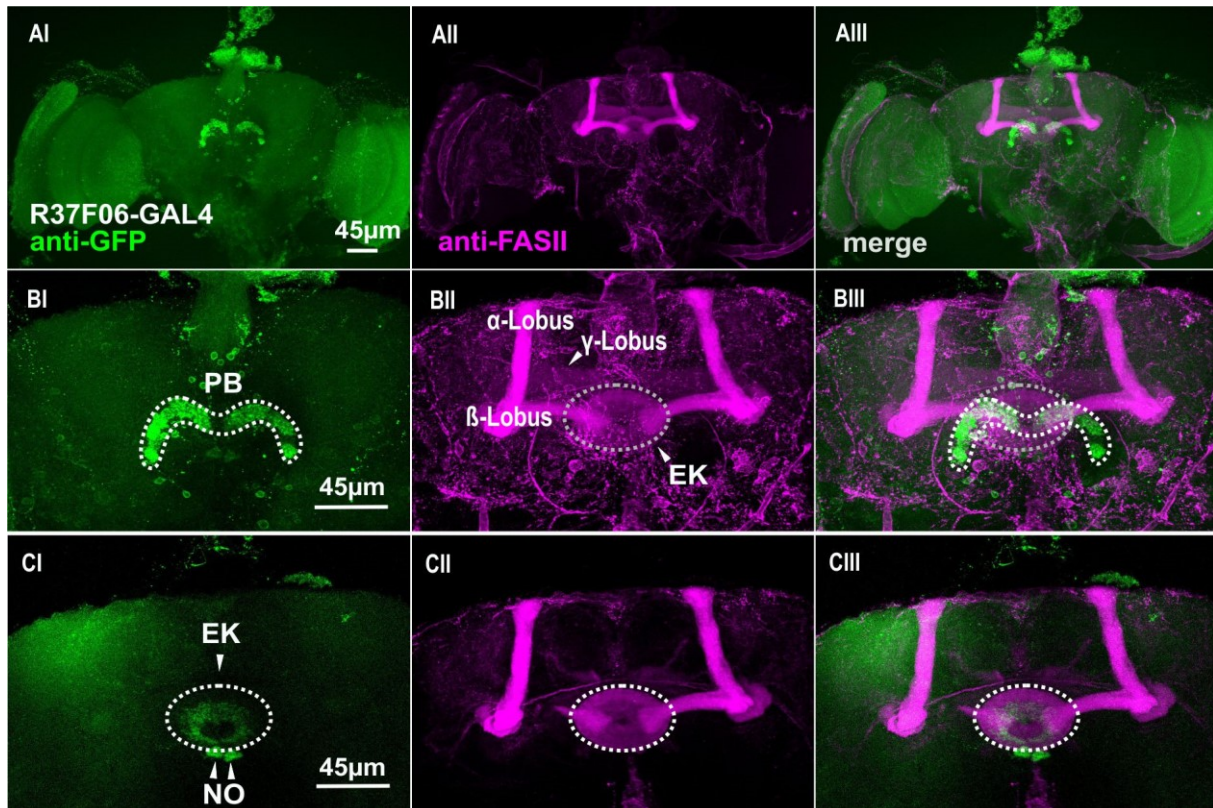


Abbildung 59: Expressionsmuster des Treibers R37F06-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R37F06-GAL4 (AI-CI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-CII) als Referenz. (AIII-CIII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme des EK (CI-CIII, optischer Schnitt 40-91). EK=Ellipsoidkörper; PB=Protozerebralbrücke; NO=Noduli. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 128,25µm; BI-BIII: 134,25µm; CI-CIII: 38,25µm.

Der Treiber R12D09 wurde von Omoto et al. in die Kategorie P-EN2 eingeordnet (Omoto et al. 2018). Neben der Expression in der PB (Abbildung 60), dem EK und den Noduli (Abbildung 60 CI), besitzt dieser Treiber eine zusätzliche Expression in einem Teil der AOTU (Abbildung 60 DI), n= 3. Im *Buridan*-Paradigma zeigten Fliegen, in welchen TNT in den P-EN Neuronen über diesen Treiber exprimiert wurde, eine signifikant schlechtere Orientierungsfähigkeit zwischen den gezeigten Landmarken, verglichen mit dem Wildtyp CS. Zwar oszillieren die Tieren zwischen den Landmarken, jedoch ist der absolute mediane Fehlerwinkel, also die Genauigkeit, die Landmarken auf dem kürzesten Weg anzulaufen, wesentlich schlechter (Abbildung 36). In den übrigen Paradigmen (*Persistenz*-; *Detour*-Paradigma, sowie *IODA*)

waren diese Tiere, genauso wie die übrigen experimentellen Gruppen, welche zusätzliche, unterschiedlich starke oder ausschließliche Expression in den AOTUs zeigen (siehe Abbildung 61 und Abbildung 63), nicht testbar (siehe Abbildung 36, 37, 38 und Abbildung 39). Nach Verschwinden der gezeigten Landmarken blieben sie häufig stehen, oder liefen im Kreis (*Persistenz*-; *Detour*-Paradigma), oder waren zu inaktiv (*IODA*).

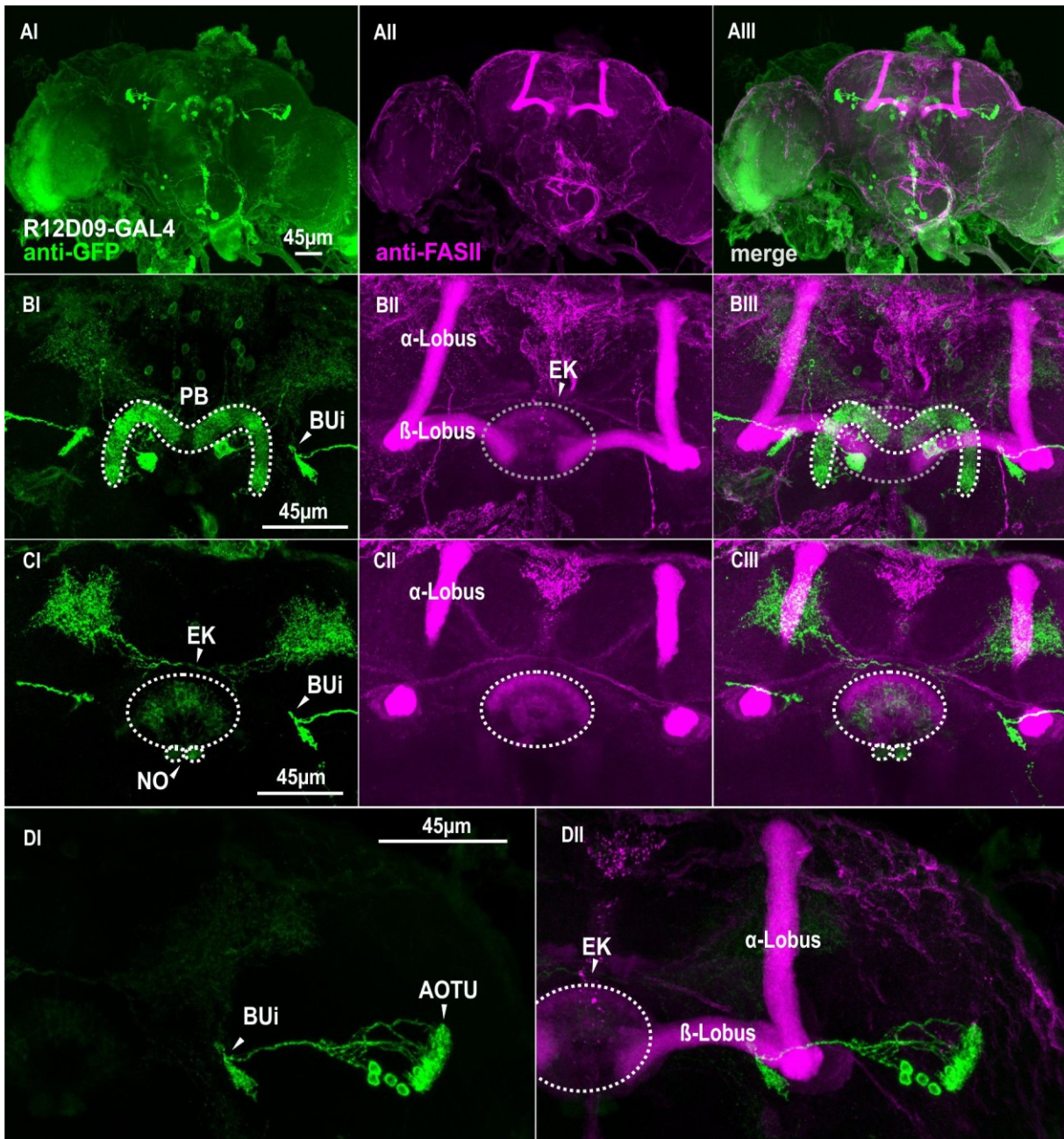


Abbildung 60: Expressionsmuster des Treibers R12D09-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R12D09-GAL4 (AI-DI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-CII) als Referenz. (AIII-DII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme des EK (CI-CIII, optischer Schnitt 60-91) und der AOTU (DI-DII). EK=Ellipsoidkörper; PB=Protozerebrallücke; NO=Noduli; AOTU=Anteriore Optische Tuberkel. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 124,5µm; BI-BIII: 94,5µm; CI-CIII: 23,25µm; DI-DII: 45,75µm.

R13D05-GAL4 exprimiert in der PB (Abbildung 61 BI), dem EK und den Noduli (Abbildung 61), aber auch in einer Schicht des FK (Abbildung 61 DI) und in wahrscheinlich ca. zwei Zellen der AOTU (Abbildung 61 EI), n= 3.

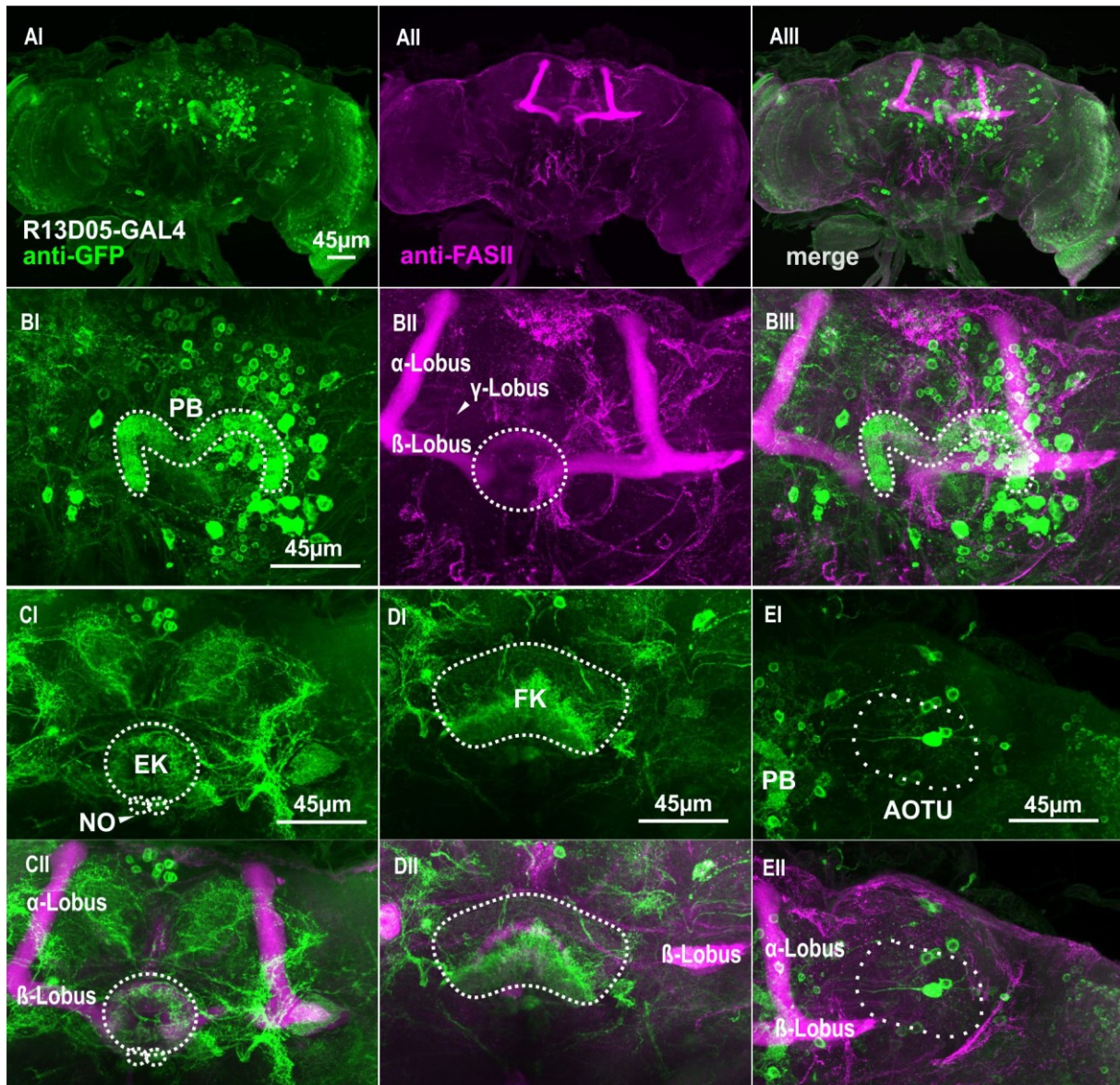


Abbildung 61: Expressionsmuster des Treibers R13D05-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R13D05-GAL4 (AI-EI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII, CII-EII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme des EK (CI-CII, optische Schnitte 41-72); des FK (DI-DII, optische Schnitte 70-111) und der AOTU (EI-EII, optische Schnitte 1-133). Verglichen mit R12D09 zeigt R13D05 eine geringe Expression von GFP in den AOTU. EK=Ellipsoidkörper; PB=Protozerebralbrücke; FK= Fächerförmiger Körper; NO=Noduli; AOTU=Anteriore Optische Tuberkel. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 132,75µm; BI-BIII: 132µm; CI-CII: 23,25µm; DI-DII: 30,75; EI-EII: 99,75µm.

Auch der Treiber R41G11-GAL4 besitzt Expression in der PB (Abbildung 62 BI), dem EK und den Noduli (Abbildung 62 CI) und auch im FK, welche nicht zu den P-EN Neuronen zählt (Abbildung 62 DI). Eine Expression in den AOTU konnte nicht eindeutig erkannt werden, n=3.

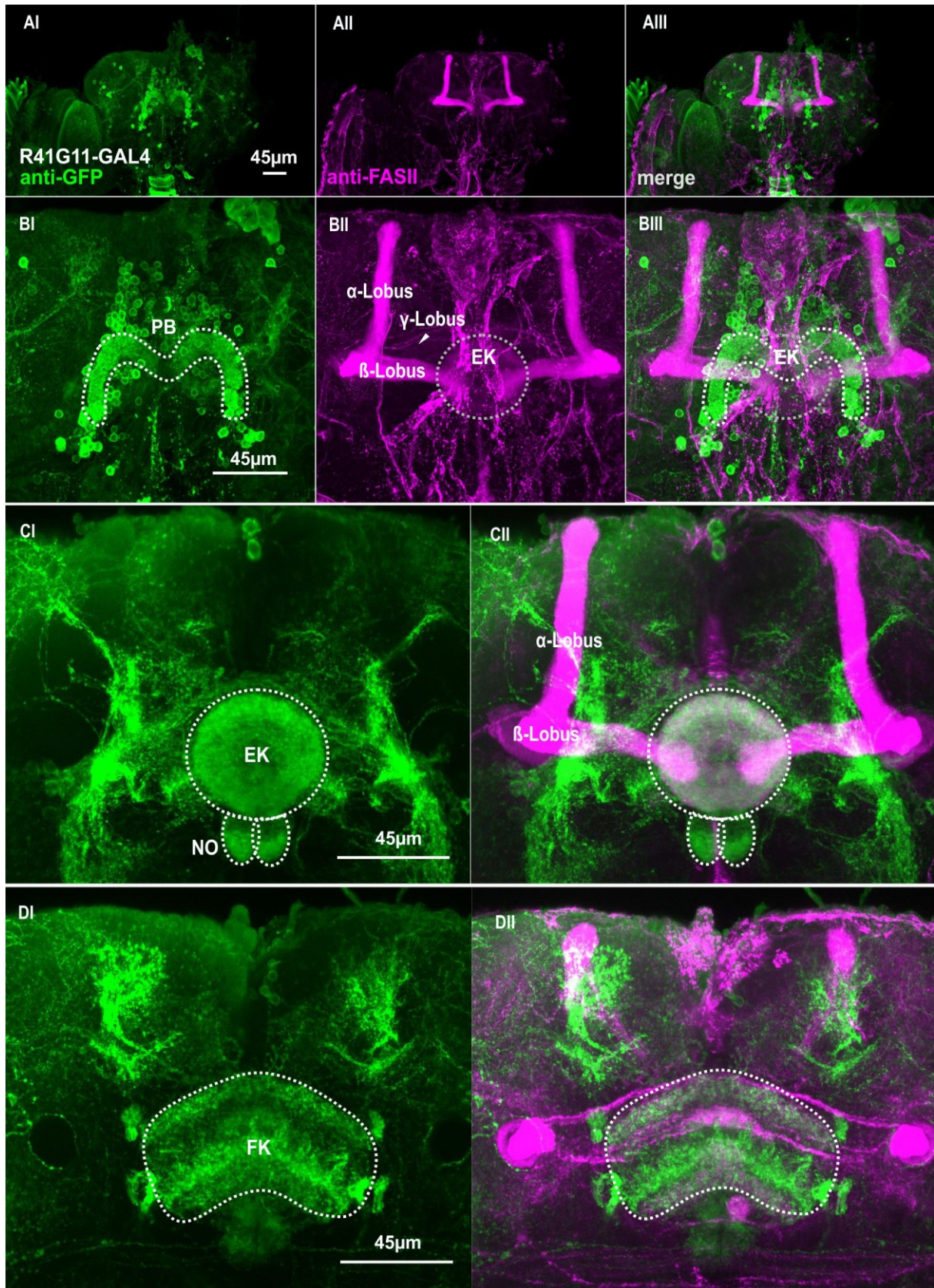


Abbildung 62: Expressionsmuster des Treibers R41G11-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R41G11-GAL4 (AI-DI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-BIII, CII-DII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme des EK (CI-CII, optischer Schnitt 25-62); des FK (DI-DII, optischer Schnitt 64-105). EK=Ellipsoidkörper; PB=Protozerebralbrücke; FK= Fächerförmiger Körper; NO=Noduli; AOTU=Anteriore Optische Tuberkel. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 123,75μm; BI-BIII: 129,75μm; CI-CII: 27,75μm; DI-DII: 29,25μm.

3.8.1.7. Anteriore optische Tuberkel

R49E09-GAL4 spricht eine Zellpopulation an, welche von der intermediaten medialen Region der AOTUs (AOTUim) zu der inferioren Region des Bulbus (BUi) projiziert (Omoto et al. 2017). Nach Expression von GFP unter der Kontrolle dieses Treibers, ist ebenfalls eine Expression in den AOTUs zu erkennen (Abbildung 63 CI), der EK wird von diesem Treibers nicht angesprochen (Abbildung 63 BI), n=3.

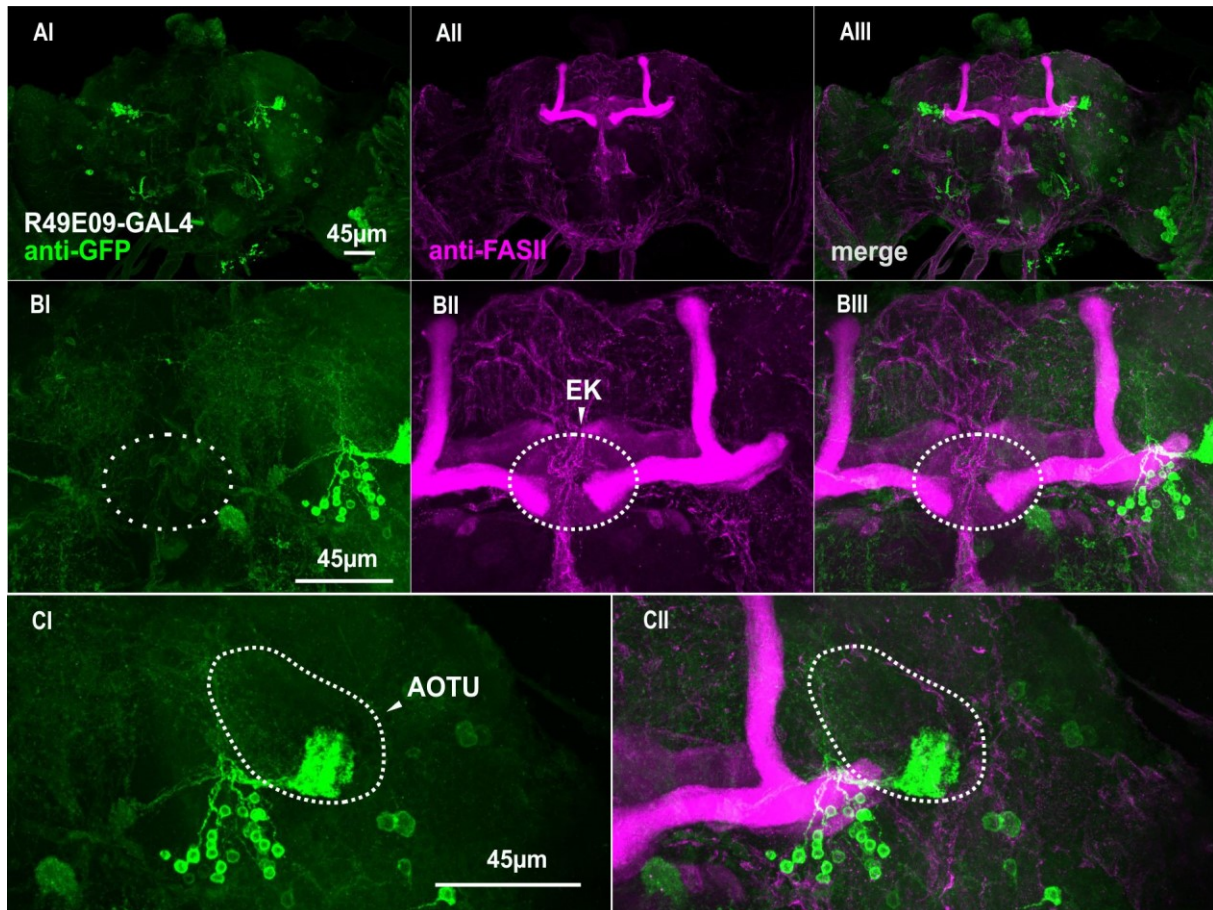


Abbildung 63: Expressionsmuster des Treibers R49E09-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R49E09-GAL4 (AI-CI) und Färbung der endogenen FasziklinII-Expression (AII-BII) als Referenz. (AIII-CII) Expression von GFP und FASII. Detailaufnahme des EK (BI-BII), es ist kein GFP-Signal im EK zu erkennen. Eine starke Expression von GFP zeigen die AOTUs (CI). EK=Ellipsoidkörper; AOTU=Anteriore Optische Tuberkel. Optische Schichtdicke: AI-AIII: 127,5µm; BI-BIII: 82,5µm, CI-CII: 69µm.

3.8.1.8. Doppelfärbungen zur Überprüfung gemeinsamer Expressionsbereiche zweier Treiber

Um zu überprüfen, ob zwei unterschiedliche Treiber für verschiedenen Ringsysteme des Ellipsoidkörpers möglicherweise in überlappenden Bereichen exprimieren, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen angefertigt (siehe Kapitel 2.5). Aufgrund des Kreuzungsverfahrens der Elterngenerationen trägt statistisch die Hälfte der weiblichen Nachkommen aus dieser Verpaarung das Effektor-konstrukt, sowie das GAL4 und das LexA-Konstrukt. Die andere Hälfte der Weibchen besitzt neben dem Effektor-konstrukt nur das LexA-Konstrukt. Das Vorhandensein beider Konstrukte kann erst nach der Anfertigung der *Whole Mounts* unter dem Laserscanningmikroskop gesehen werden. Daher konnte, trotz einer großen Anzahl präparierter Gehirne, in nur ein bis zwei *Whole Mounts* pro Genotyp, eine geeignete Doppelfärbung detektiert werden.

Der Grund für diese Überprüfung lieferten die Ergebnisse der Rettungsexperimente von *rut* und *dnc*. Da eine Rettung von *rut* sowohl im Ringsystem R1, wie auch im Ringsystem R2, bzw. von *dnc* im Ringsystem R1 und Ringsystem R3 möglich war, stellte sich die Frage, ob einige Treiber nicht nur das postulierte Ringsystem ansprechen, sondern noch weitere.

Ursprünglich wurde angenommen, dass R28D01-GAL4 zu den R1-spezifischen Treibern zu zählen ist (Ofstad et al. 2011). Daher wurde dieser Treiber in den Doppelfärbungen auch als solcher verwendet. Erst nach der Auswertung der histologischen Untersuchungen und nach Erscheinen der Arbeit von Omoto et al. Ende 2018, wurde deutlich, dass R28D01-GAL4 nicht zu den R1-Treibern gezählt werden konnte.

Nach gemeinsamer Expression von GFP und RFP unter der Kontrolle des R3m (früher R1) spezifischen Treibers R28D01-LexA und des R2-spezifischen Treibers EB1-GAL4 (Omoto et al. 2018) ist keine Kolo-kalisation der Expressionsprodukte beider Treiber zu erkennen (Abbildung 64 BII-DIII), $n_{HS} = 2$. Obwohl die Maximalprojektion (Abbildung 64 CIII) den Eindruck vermittelt, dass in einer Zelle sowohl GFP, als auch RFP (CIII, Kreis) exprimiert, zeigt der Schnitt 161 (Abbildung 64 CIIIa und b) nur ein GFP, jedoch kein RFP-Signal. Das bedeutet, dass eine GFP-exprimierende Zelle und eine RFP-exprimierende Zelle übereinanderliegen, wodurch in der Maximalprojektion der Eindruck einer Kolo-kalisation entsteht.

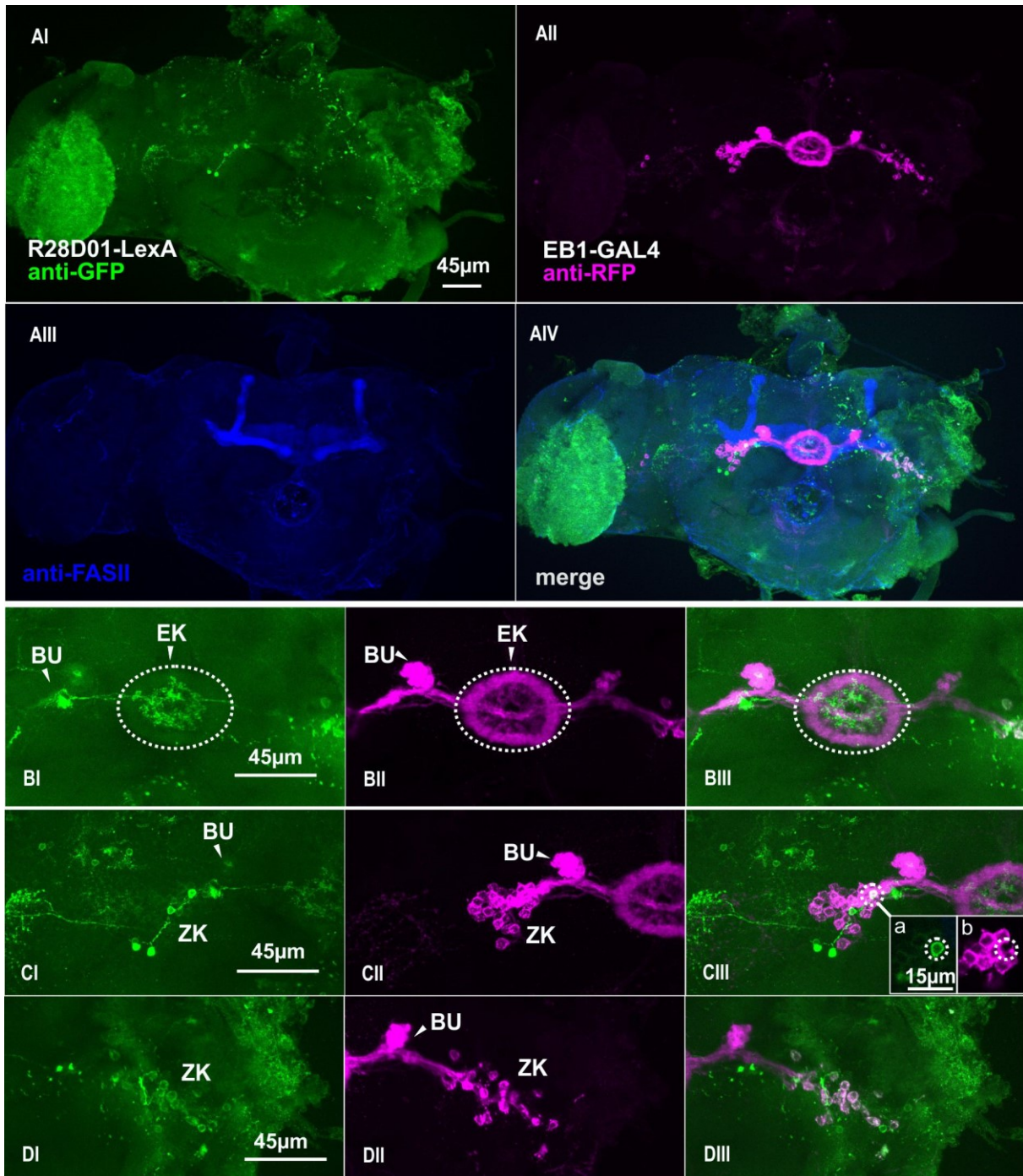


Abbildung 64: Expressionsmuster der Treiber R28D01-LexA und EB1-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R28D01-LexA und (AI-DI) und RFP unter der Kontrolle von EB1-GAL4 (AII-DII), Färbung der endogenen FasziklinII-Expression als Referenz (AIII). (AIV; BIII-DIII) Expression von GFP und RFP. (CI-CIII) rechte Hemisphäre, (DI-DIII) linke Hemisphäre. Keine Kolokalisation von GFP und RFP (CIIIa und b, Schnitt 161). EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIV: 78µm; BI-BIII: 47,85µm; CI-CIII: 60,39µm; DI-DIII: 62,7µm.

Die gemeinsame Expression von GFP und RFP über R19C08-LexA und R28D01-GAL4 zeigt eine Kolokalisation beider Fluoreszenzproteine in einem Zellkörper der linken (Abbildung 65CIa-CIIIc) und in drei Zellkörpern der rechten (Abbildung 65DIIa-CIIIc) Hemisphäre. Auch in einem weiteren Präparat ist eine Kolokalisation in mind. einer Zelle pro Hemisphäre zu erkennen.

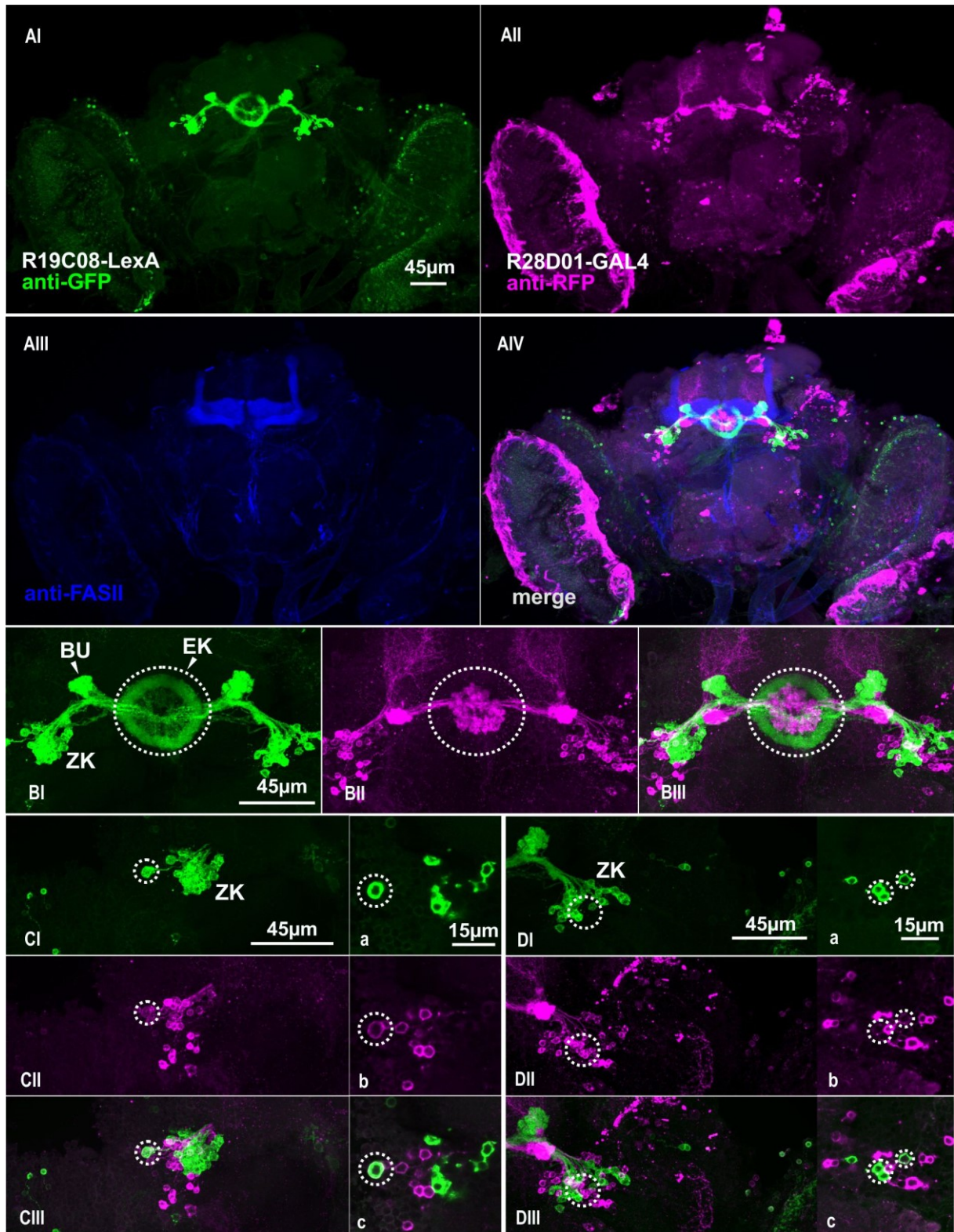


Abbildung 65: Expressionsmuster der Treiber R19C08-LexA und R28D01-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R19C08-LexA und (AI-DI) und RFP unter der Kontrolle von R28D01-GAL4 (AII-DII), Färbung der endogenen FasziklinII-Expression als Referenz (AIII). (AIV; BIII-DIII) Expression von GFP und RFP. Kolokalisation von GFP und RFP in einer Zelle in der linken Hemisphäre (CIa-CIIIc, optischer Schnitt 19, 0,33 μ m), und schwach in drei Zellen der rechten (DIa-DIIIc, optischer Schnitt 52, 0,33 μ m). (CI-CIII) linke Hemisphäre, (DI-DIII) rechte Hemisphäre). EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIV: 93 μ m; BI-BIII: 34,65 μ m; CI-CIII: 11,55 μ m; DI-DIII: 15,18 μ m.

Die Treiber R28D01-LexA und 189Y-GAL4 besitzen keine überlappenden Expressionsbereiche, $n_{HS} = 4$. Keiner der Zellkörper zeige ein gemeinsames GFP- und RFP-Signal (Abbildung 66). Eine vermeintliche Kolo­kalisierung in DIII kommt durch zwei Zellen mit GFP, bzw, RFP-Expression, welche in verschiedenen Ebenen übereinanderliegen, zustande.

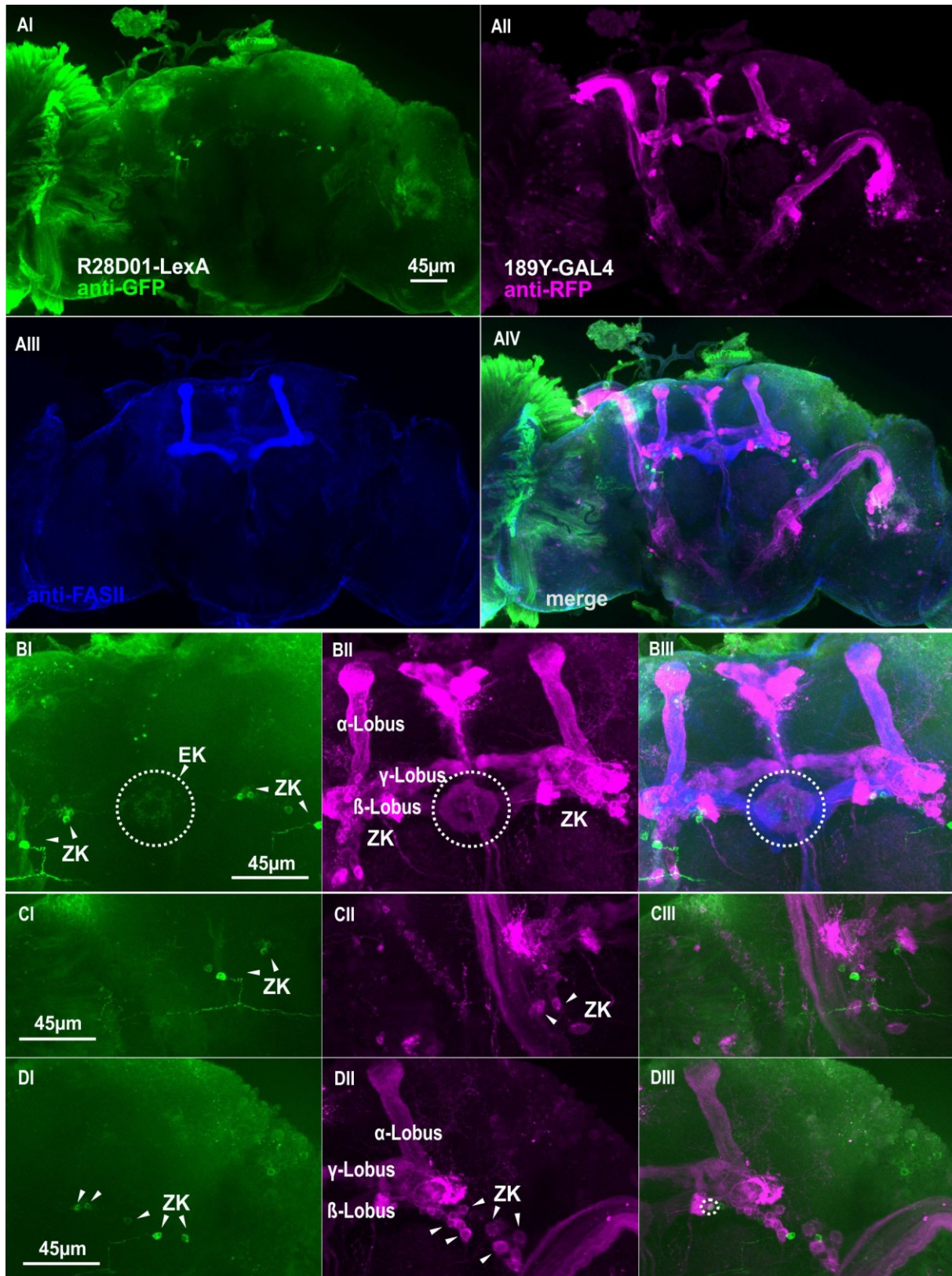


Abbildung 66: Expressionsmuster der Treiber R28D01-LexA und 189Y-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R28D01-LexA und (AI-BI) und RFP unter der Kontrolle von 189Y-GAL4 (AII-BII), Färbung der endogenen FasziklinII-Expression als Referenz (AIII). (AIV; BIII) Expression von GFP und RFP. Keine Zellen mit gemeinsamer GFP und RFP Expression zu erkennen (DIII: vermeintliche Kolokalisation kommt durch zwei Zellen mit GFP, bzw. RFP-Expression, welche in verschiedenen Ebenen übereinanderliegen, zustande). Expression von RFP über 189Y-GAL4 in den PK (BII). EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIV: 121,5µm; BI-BIII: 68,46µm; CI-CIII: 11,55µm; DI-DIII: 21,12µm.

Im Gegensatz zum Treiber R54B05-GAL4 (Abbildung 49) lässt sich mit der LexA-Version R54B05-lexA GFP im Zentralkomplex exprimieren (Abbildung 67, BI-DI). Der Treiber R54B05-lexA und R28D01-GAL4 zeigen in der linken (Abbildung 67, CIII) und in der rechten (Abbildung 67, DIII) Hemisphäre Koexpression in jeweils einem Zellkörper, $n_{HS} = 2$.

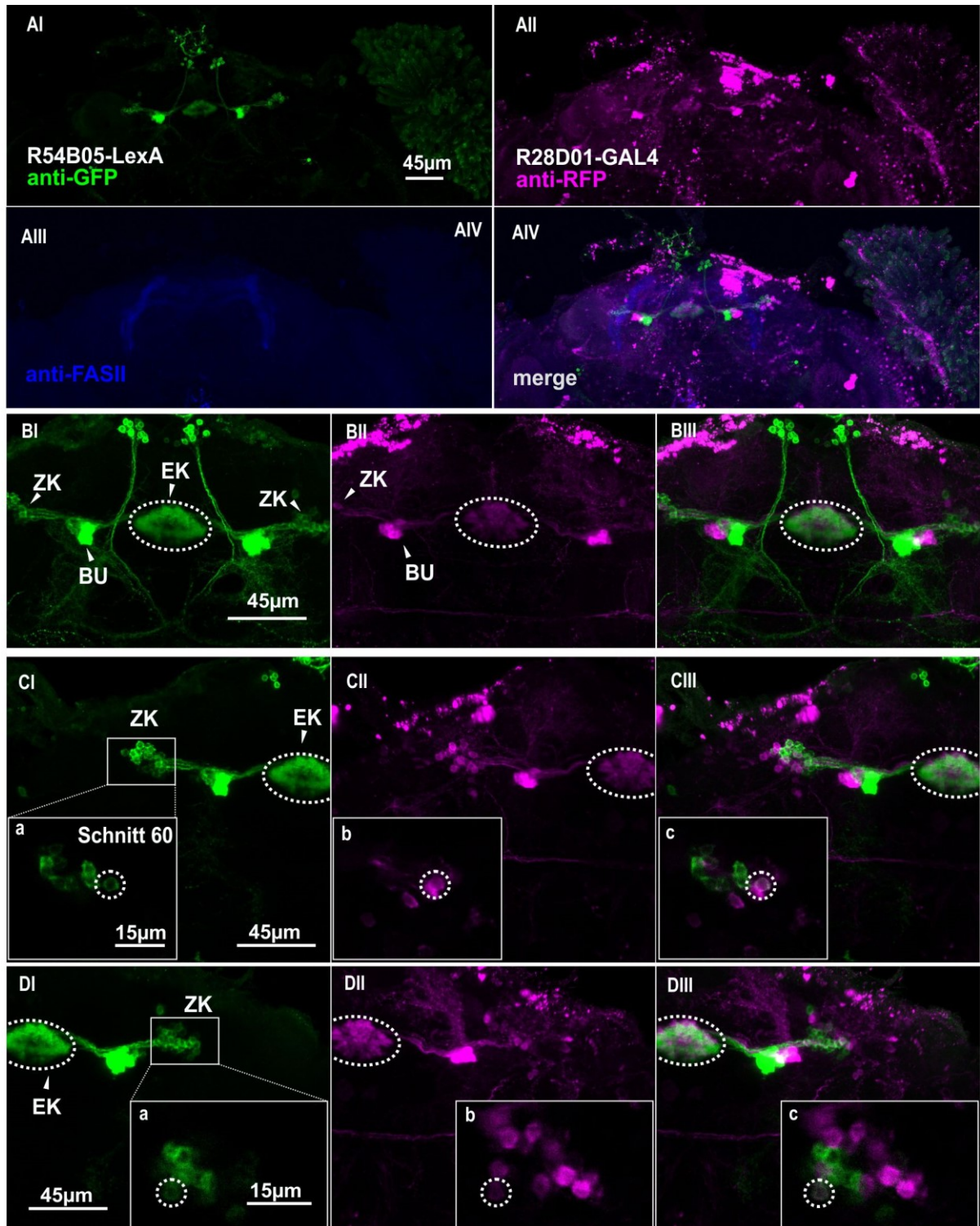


Abbildung 67: Expressionsmuster der Treiber R54B05-LexA und R28D01-GAL4. Expression von GFP unter der Kontrolle von R54B05-LexA und (AI-DI) und RFP unter der Kontrolle von R28D01-GAL4 (AII-DII), Färbung der endogenen FasziklinII-Expression als Referenz (AIII). (AIV; BIII-DIII) Expression von GFP und RFP. Zellkörper der linken Hemisphäre (CI-CIII), Zellkörper der rechten Hemisphäre (DI-DIII) In jeweils einem Zellkörper jeder Hemisphäre ist eine Kolokalisation von GFP und RFP zu erkennen (CIIIa-c, optischer Schnitt 60, 0,33µm; DIIIa-c, optischer Schnitt 118, 0,33µm). EK=Ellipsoidkörper; BU=Bulbus; ZK=Zellkörper. Optische Schichtdicke: AI-AIV:96,75µm; BI-BIII: 71,94µm; CI-CIII: 56,43µm; DI-DIII: 74,91µm.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse von Strukturen und Proteinen, welche in den Prozess der idiothetischen Orientierung bei *Drosophila melanogaster* involviert sind. Zudem wurden gemeinsame und spezifische Strukturen im Ellipsoidkörper für das visuelle Orientierungsgedächtnis (Neuser et al. 2008; Kuntz et al. 2017) und das Ortsgedächtnis identifiziert. Für die idiothetische Orientierung werden im Gegensatz zur allothetischen keine visuellen, olfaktorischen oder auditorischen Rauminformationen benötigt. Welche neuronalen Strukturen und Signalwege in diese besondere Orientierungsform involviert sind, ist für Insekten weitgehend unbekannt, jedoch gehörte der Ellipsoidkörper des Zentralkomplexes zu den primären Kandidaten (Hartmann und Wehner 1995). In der humanen nicht-visuellen Orientierung spielt beispielsweise der *Hippocampus* eine entscheidende Rolle (Anagnostou et al. 2018).

Hingegen ist über die Hirnstrukturen, welche für die idiothetische Orientierung bei der Ratte notwendig sind, ausführlichere Forschungsarbeit geleistet worden. Entscheidende Schaltstellen, für die Verarbeitung idiothetischer Informationen, sind der *Supragenuale Nucleus*, welcher im *Anterodorsalen Thalamus* (AT) zu finden ist, sowie die *Heading-Zellen*, die Kurskorrekturinformationen an die nachgeschalteten *Ortszellen* und *Gitterzellen* des *Medialen Entorhinalen Cortex* (MEC), ebenfalls Teil des AT und für die idiothetische Orientierung notwendig (Clark et al. 2011), weiterleiten (Winter et al. 2015; Calton et al. 2003; Stackman RW. und Taube 1997, 1998).

Bei Insekten ist die Fähigkeit zur idiothetischen Orientierung mittels Pfadintegration weit verbreitet; man findet sie bei Käfern (Hironaka et al. 2003; Hironaka et al. 2007), Feldheuschrecken (Beugnon und Campan 1989), Grillen (Durier und Ruvault 1999), Bienen (Srinivasan 2015), Ameisen (Müller und Wehner 1988; Collett et al. 2013) und auch bei *Drosophila* (Kim und Dickinson 2017) Die Pfadintegration beschreibt die Fähigkeit, idiothetische Informationen oder Körpereigenbewegungen verrechnen zu können, um die eigene, aktuelle Position im Raum zu bestimmen und einen Bewegungsablauf relativ zum Ausgangspunkt einhalten zu können (Gallistel 1990). Welche Hirnstrukturen und Proteine bei *Drosophila* in diese Art der Orientierung involviert sind, war bis jetzt weitgehend unbekannt. Seelig und Jayaraman konnten mittels Kalziumimaging zeigen, dass eine visuelle Landmarke einen Kalziumeinstrom in einigen wenigen Zellen benachbarter Sektoren des EK bewirkt („Aktivitäts-Bump“) und dass dieses Signal auf dem EK rotiert, sobald die sich Fliege dreht, oder das Objekt seine Position verändert. Dieses Signal wird auch nach Verschwinden der Landmarke aufrechterhalten und verändert sogar seine Lage, sobald die Fliege ihre Körperachsenposition verändert. Für die Entstehung des Signals, sowie dessen „Drift“ sind die kolumnären Neuronengruppen der E-PG und P-EN Neurone verantwortlich (Seelig und Jayaraman 2015). Somit ist naheliegend, dass für die nicht visuelle Orientierung diese Neuronengruppen ebenfalls eine Rolle spielen kann.

Im Zusammenhang mit verschiedenen visuellen Orientierungsformen ist der EK bestens untersucht. Für das visuelle Orientierungsgedächtnis ist der cGMP-Spiegel des Ringsystems R3 essentiell. Wird die cGMP-Produktion in diesem Ringssystem verhindert, so verlieren die Tiere im visuellen Orientierungsparadigma *Detour* ihr Orientierungsgedächtnis (Kuntz et al. 2017). Um den Einfluss der einzelnen Ringsysteme des EK auf das idiothetische Orientierungsgedächtnis zu untersuchen, wurden einzelne Ringsysteme mit Hilfe von Tetanustoxinexpression stillgelegt. Es konnte gezeigt werden, dass alle Ringsysteme des EK

für die Etablierung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses notwendig sind (siehe Kapitel 3.4).

Als mögliche Signalkaskade für die Ausbildung dieser Gedächtnisform wurde der Einfluss der *rutabaga*-Adenylylzyklase (AC), sowie der *dunce*-Phosphodiesterase (PDE4), als die zentralen cAMP-Signalwegkomponenten in den einzelnen Ringsystemen, untersucht. *rut¹* und *dnc¹* zeigten, in der vorliegenden Mutantenanalyse, neben *amn¹*, *rad¹*, *cry⁰¹*, *ebo⁶⁷⁸* und *norpA^{P24}*, einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses im *IODA*. Kuntz konnte zeigen, dass auch für das visuelle Arbeitsgedächtnis die *rut* AC in R3 benötigt wird (Kuntz 2015). Somit wurden in dieser Arbeit über Rettungs- und Knockdown Experimente die *rut* AC in R2 und R3m, sowie die *dnc* PDE4 in R3 mit R3m und R3d mit R3p als notwendige Faktoren für die nicht-visuelle Orientierung etabliert (siehe Kapitel 3.5 Knock-Down und Rettungsexperimente von *dunce* (*dnc*) oder *rutabaga* (*rut*) im Ellipsoidkörper bei der idiothetischen Orientierung).

Überraschenderweise scheint auch das Blaulichtrezeptorprotein Cryptochrom (CRY) in die Ausbildung eines nicht-visuellen Orientierungsgedächtnisses eingebunden zu sein. Der erste Hinweis darauf folgte aus der Arbeit von Gegeer et al., 2008, in der bewiesen werden sollte, dass wildtypische *Drosophila* Fliegen magnetische Felder vermeiden, sich aber mit Hilfe von Zuckerbelohnung darauf trainieren lassen, jene dennoch aufzusuchen (Gegeer et al. 2010; Gegeer et al. 2008). Jedoch scheint dieser Effekt auf einer kleinen statistischen Ungenauigkeit zu beruhen (siehe Kapitel 3.1). Wie ist aber das Fehlen der „Magnetotaxis“ bei *cry*-mutanten Fliegen zu erklären? Das CRY neben seiner Rolle in der zirkadianen Rhythmik auch eine nicht lichtabhängige Aufgabe im Orientierungsverhalten besitzt, war bis heute nicht bekannt. Lediglich in Mäusen konnte die Arbeitsgruppe um Bundel im Jahr 2013 nachweisen, dass Tiere, welche für eines der beiden CRY-Proteine oder für beide mutant waren, Defizite in klassischen Verhaltensparadigmen für Mäuse und Ratten aufwiesen. Mäuse besitzen zwei CRY-Varianten, CRY1 und CRY2, wobei Tiere, welche homozygot mutant für beide Varianten sind, Defizite in der zirkadianen Rhythmik, der Aktivität und im *Object-Recognition-Test* zeigen. Auch das Angstgefühl ist erhöht; so zeigen die mutanten Tiere eine gesteigerte Ängstlichkeit im *Open-Field* und *Elevated-Plus-Maze* (Bundel et al. 2013). *Drosophila* besitzt nur eine CRY-Variante, von der hauptsächlich bekannt ist, dass sie in die lichtabhängige Regulation der inneren Uhr eingebunden ist (Yoshii et al. 2009; Picot et al. 2007; Yuan et al. 2005; Helfrich-Förster 2002). Wir konnten nachweisen, dass CRY im Ringsystem R4 auch eine entscheidende Rolle in der nicht-visuellen Orientierung spielt, und dass dieser Effekt unabhängig von Licht und Magnetfeldern ist.

Neueste Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass das *Arabidopsis* mit Cryptochrom-1 in einer Dunkelphase nach Lichtaktivierung immer noch sensitiv für magnetische Felder ist. Das bedeutet, CRY besitzt eine lichtinduzierte, beeinflussbare Aktivität, welche noch lange nach Lichteinfluss bestehen bleibt (Pooam et al. 2019). Möglicherweise besitzt *Drosophila*-CRY über diesen Mechanismus auch einen Einfluss auf das idiothetische Orientierungsgedächtnis, da die Versuchstiere bis kurz vor Versuchsbeginn im *IODA* normalen Lichtverhältnissen ausgesetzt waren, was zu aktivierten CRY-Molekülen geführt haben könnte. Eine Möglichkeit zur Überprüfung dieser These wären Versuchsdurchläufe mit im Dunkeln aufgezogenen Wildtypen, oder Tieren, die Tage/Stunden vor dem Versuchsbeginn ohne Licht verbracht haben. Das aktivierte CRY im *IODA* zu einer Orientierung an magnetischen Feldern geführt haben konnte, kann ausgeschlossen werden. Nach Unterbrechung der Pfadintegration bzw. Drehung der Versuchsapparatur um 90° zum Erdmagnetfeld, hätten die Tiere ein noch

vorhandenes, bzw. kein Orientierungsgedächtnis mehr zeigen müssen, wenn sie sich nach magnetischen Feldlinien orientiert hätten. Dies war jedoch nicht der Fall (siehe Kapitel 3.2).

4.1 Die idiothetische Orientierung in wildtypischen Fliegen

Wustmann entwickelte 1996 die sogenannte *Heat Box*, eine längliche Kammer, in welcher wählbar eine Hälfte, mittels eines für *Drosophila* unangenehmen Hitzereizes, bestraft werden konnte. Wildtypische Fliegen zeigten nach der Trainingsphase eine signifikante Vermeidung der zuvor bestrafte Seite der Kammer, während die Mutanten *rut¹* und *dnc¹* zwar im Training die erhitzte Seite vermieden, im Test jedoch versagten (Wustmann et al. 1996). Mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit entwickelten *Idiothetic Orientation in the Dark Assay (IODA)*, welches auf dem Prinzip der *Heat Box* beruht, konnten wir die Grundlagen der Fähigkeit von *Drosophila*, zur Vermeidung einer mittels Vibration zuvor bestrafte Seite, untersuchen. Dabei benötigt es keiner visuellen Landmarke zur Orientierung und die Vermeidung der zuvor bestrafte Seite kann nicht nur unter sichtbarem Licht, sondern auch unter für *Drosophila* nicht sichtbarem Rotlicht erfolgen. Wir versuchten überdies weibliche, wildtypische Fliegen zu testen, jedoch erwiesen sich die Weibchen nicht geeignet für den Test im *IODA*, da sie in Dunkelheit eine so stark eingeschränkte Aktivität im Versuchsaufbau aufwiesen, dass ein erfolgreiches Training, aufgrund der zu geringen Anzahl von Wechseln zwischen bestrafte und unbestrafte Seite, nicht möglich war. Somit wurden nur männliche Fliegen für die Experimente verwendet.

Eine Nutzung des Erdmagnetfeldes als Orientierungsmöglichkeit konnte ausgeschlossen werden. Wurde die Apparatur nach dem Training um 90° gedreht, hielten sich wildtypische Fliegen dennoch länger in der unbestrafte Seite auf. Hätte eine Orientierung nach den magnetischen Feldlinien stattgefunden, so hätten die Tiere die bestrafte Seite nicht mehr erkennen können. Dabei ist zu beachten, dass die „Magnetotaxis“, welche über Cryptochrom vermittelt werden soll, in Licht mit der Wellenlänge >420nm nicht mehr funktionieren soll (Gegeer et al. 2008; Gegeer et al. 2010). Die Anregungsenergie ist in diesem Wellenlängenbereich nicht ausreichend, um einen Zerfall des Cryptochrom-Flavinmoleküls in zwei magnetfeldsensitive Radikalpaarprodukte zu ermöglichen (Ritz et al. 2009; Maeda et al. 2012). Da die Orientierung wildtypischer Fliegen nach Eliminierung des Lichtanteils der Wellenlänge <420nm jedoch intakt ist, kann man ausschließen, dass eine über Cryptochrom vermittelte Orientierung nach dem Erdmagnetfeld stattgefunden hat. Da jedoch Cryptochrom in *Arabidopsis* den lichtinduzierten Anregungszustand auch in einer anschließenden Dunkelphase „speichern“ kann (Pooam et al. 2019), wäre es denkbar, dass die CRY-vermittelte, idiothetische Orientierung in Dunkelheit über diesen andauernden Anregungszustand vermittelt werden könnte.

Wurde der Fliege aber die Möglichkeit zur Pfadintegration genommen, indem die Apparatur nach dem Training einige Male horizontal rotierte wurde, was dazu führte, dass das Tier auf den Rücken fiel und um die eigene Achse gedreht wurde, verloren sie die Fähigkeit, die zuvor bestrafte Seite zu vermeiden. Da für eine korrekte Pfadintegration die Fortschreibung des eigenen Standpunkts im Raum einen essentiellen Faktor darstellt, kann ohne eine Kontinuität keine korrekte Vektorberechnung stattfinden. Somit konnte auch ausgeschlossen werden, dass sich die Fliege nach eventuell gesetzten Duftmarken orientiert hatte, denn die olfaktorische Orientierung wäre nach Unterbrechung der Pfadintegration noch durchaus möglich gewesen.

Bei Ameisen ist bekannt, dass sie nach erfolgreicher Futtersuche die Beute auf dem kürzesten Weg zurück zum Nest bringen. Dazu verrechnen sie die während der Suche eingenommenen Winkel und die zurückgelegten Strecken mit ihrer aktuellen Position, um ihren aktuellen Standpunkt relativ zum Nest zu ermitteln (Müller und Wehner 1988; Wehner und Wehner 1986; Ronacher 2008). Fehlt der eigene Bezugspunkt, so kann die kognitive Landkarte nicht angewendet werden. Sollte die Fliege eine der Ameisen vergleichbare Technik zur Vektorintegration anwenden, so wäre die Protozerebralbrücke als Generator des Streckenvektors geeignet (Strauss und Heisenberg 1993) und der Ellipsoidkörper der Ort der Information über den eigenen eingenommenen Körperwinkel zu einem Punkt im Raum während des Laufens (Seelig und Jayaraman 2015; Turner-Evans et al. 2017; Kuntz 2015) und im Flug (Guo et al. 2014). Bei Ratten konnte nachgewiesen werden, dass sie das Vestibularsystem verwenden, um ein Richtungssignal nach Körperachsendrehung in der Dunkelheit zu generieren (Taube 2007; Stackman RW. und Taube 1997). Eine Beteiligung der Pilzkörper für die idiothetische Orientierung bei *Drosophila* wurde ausgeschlossen, da schon in den *Heat-Box* Experimenten der Arbeitsgruppe Wolff pilzkörperlose Fliegen ein dem Wildtyp vergleichbares Orientierungsgedächtnis in Dunkelheit zeigten (Zars et al. 2000).

4.2 Untersuchung ausgewählter Proteine als mögliche Kandidaten für die Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses

Mittels Mutantanalysen wurden die „klassischen Lerngene“ *rutabaga (rut)*, *dunce (dnc)*, *amnesiac (amn)*, *radish (rad)*, *ignorant (ign)*, sowie *ellipsoid body open (ebo)*, aber auch ein Schlüsselgen der visuellen Transduktionskaskade *no receptor potential A (norpA)*, sowie an der Regulierung des zirkadianen Rhythmus beteiligten Gene *cryptochrome (cry)* und *period (per)*, bezüglich ihres Einflusses auf die nicht-visuelle Orientierung und das Orientierungsgedächtnis untersucht. Die in den cAMP-Signalweg eingebundenen Genprodukte von *rut* (Adenylzyklase) und *dnc* (Phosphodiesterase) sind essentielle Faktoren für viele Lernvorgänge und Gedächtnisformen wie die olfaktorische Konditionierung (Nighorn et al. 1991; Levin et al. 1992) und die visuelle Mustererkennung (Liu et al. 2006). Wustman et al. konnten schon 1996 in ihren *Heat-Box* Experimenten zeigen, dass für ein nicht-visuelles Orientierungsgedächtnis die Genprodukte von *rut* und *dnc* benötigt werden (Wustmann et al. 1996). Später konnte Putz nachweisen, dass eine Nullmutation des Gens *ignorant*, welches für die *Ribosomale S6 Kinase (S6KII)* codiert, zwar das olfaktorische Lernen beeinträchtigt, jedoch nicht das Ortsgedächtnis (Putz et al. 2004). Die *ebo* Genprodukte Exportin-6, werden für ein funktionsfähiges, visuelles Arbeitsgedächtnis benötigt (Neuser et al. 2008; Thran 2013). Tiere, die für *amn* oder *rad* mutant sind, zeigen Defizite in der klassischen, olfaktorischen Konditionierung (Waddell und Quinn 2001). *per* und *cry* als Komponenten der inneren Uhr (Ashmore und Sehgal 2003; Ceriani 1999; Ceriani et al. 2002; Edery et al. 1994; Emery et al. 1998; Helfrich-Förster 2002; Yoshii et al. 2010), hatten vor dieser vorliegenden Arbeit jetzt keine nachgewiesene Funktion in der Ausbildung eines Orientierungsgedächtnisses. Eine Mutation des *per*-Gens jedoch besitzt über die Interaktion mit dem *cAMP-responsive transcription factor (CREB)* eine Auswirkung auf das Langzeitgedächtnis bei *Drosophila* (Sakai et al. 2004). Für *cry* war in *Drosophila* noch keine Beteiligung an der Ausbildung einer Gedächtnisform untersucht worden, lediglich in Versuchen mit Ratten konnte nachgewiesen werden, dass eine Nullmutation von beiden *cry*-Genen Auswirkungen auf verschiedene klassische Lern- oder Orientierungsparadigmen besitzt (Bundel et al. 2013). In der Diskussion stand ebenfalls die über CRY vermittelte „Magnetotaxis“ von *Drosophila* (Gegear et al. 2008).

Die Beteiligung des cAMP-Signalweges in der nicht-visuellen Orientierung wurde mit Hilfe der Mutanten *dnc¹* und *rut¹* untersucht. Die ersten Aufklärungen über die Beteiligung des cAMP-Signalweges im Kurzzeitgedächtnis wurden bei der Meeresschnecke *Aplysia* über die klassische Konditionierung des Kiemen-Rückziehreflexes durchgeführt. Ein Kalzium-Einstrom in eine neuronale Zelle bewirkt eine Aktivierung von Calmodulin und folgend der von *rut* codierten *Adenylylzyklase* (AC). Die AC generiert nun den sekundären Botenstoff cAMP und dieser aktiviert die *Protein Kinase A* (PKA), welche über den *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)-Signalweg Ionenkanäle phosphoryliert und somit die Erregbarkeitsschwelle des Neurons herabsetzt (siehe Kapitel 1.4) (Kandel et al. 1983). Dieser Zustand kann für mehrere Stunden andauern und ist essentiell für die Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses. Die von *dnc* codierte *Phosphodiesterase* (PDE4) sorgt als Gegenspieler der AC für einen Abbau von cAMP (Delgado et al. 1998). Für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses bei *Drosophila* muss die PKA mehrfach aktiviert werden, woraufhin das *Ca²⁺/cAMP Response Element Binding* (dCREB) Protein, über die von *ignorant* codierte *Ribosomal S6 Kinase* (RS6KII), phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von dCREB führt zu einer Expression von Kompetenzfaktoren, was zu einer dauerhaften Veränderung des Neurons führt (Kuntz et al. 2017).

Im *IODA* zeigten die Mutanten *rut¹* und *dnc¹* sogar unter normalen Lichtverhältnissen einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Zwar sind die Tiere noch in der Lage, sich während des Trainings im Versuchsaufbau zu orientieren, jedoch ist es ihnen nicht möglich, ein Gedächtnis für die Position der zuvor bestraften Seite auszubilden.

dnc¹ ist ein X-chromosomales, hypomorphes Allel, d.h. die von *dnc¹* codierte PDE4 besitzt noch 50% Restaktivität (Davis und Kiger 1981). Im Verhaltensexperiment zeigten *dnc*-mutante Fliegen ein defizitäres olfaktorisches Kurzzeitgedächtnis, während das Langzeitgedächtnis wildtypisch erhalten bleibt (Tully und Quinn 1985).

Tiere, welche eine Mutation des X-chromosomalen *rut*-Gens tragen, besitzen eine verminderte Lernfähigkeit in der appetitiven (Tempel et al. 1983) und aversiven (Dudai 1983) Konditionierung. Auch die visuelle Orientierung ist beeinträchtigt. *rut*-mutante Fliegen zeigten keine zielgerichteten Anläufe auf Landmarken (Kuntz et al. 2017). Im *IODA* hingegen zeigten sie während des Trainings, dass sie durchaus in der Lage sind, aus der bestraften Seite herauszufinden. Jedoch konnte die Information über die Lage der unbestraften Seite nicht in die Testphase übertragen werden.

Im *IODA* hatten hemizygoten *amn¹*-Tiere zwar ein intaktes Orientierungsgedächtnis unter normalen Lichtverhältnissen; diese Fähigkeit ging aber unter Rotlichtverhältnissen verloren. Somit sind offenbar zwei verschiedene Signalwege an der Ausbildung eines visuellen und nicht-visuellen, idiothetischen Gedächtnisses beteiligt. *amn* codiert für ein *PACAP-like Neuropeptid* und ist bei *Drosophila* über die Modifizierung des cAMP-Spiegels in die Etablierung des Kurzzeitgedächtnisses involviert (Tully und Quinn 1985; Heisenberg 2003). *amn* interagiert hierbei mit *rut* (Moore et al. 1998) und *dnc* (Feany und Quinn 1995).

Kuntz et al. zeigten 2017, dass für die Ausbildung des visuellen Orientierungsgedächtnisses im *Detour* eine Aktivierung der *ign* RSKII durch den cGMP/PKG-Signalweg notwendig ist (Kuntz et al. 2017). Im *IODA* zeigten *ign*-mutante (*ign^{58/1}*) Fliegen ein intaktes idiothetisches Orientierungsgedächtnis, während das visuelle Arbeitsgedächtnis im *Detour* beeinträchtigt war (siehe Kapitel 3.3). Für die Experimente mit *ign^{58/1}*-Tieren, wurden vor Versuchsbeginn Rückkreuzungen mit wildtypischen Fliegen durchgeführt, die F1-Generation wurde auf den

ign-Phänotyp im *Detour* getestet, um sicherzustellen, dass die Mutation noch vorhanden war, da *ign*^{58/1} zu „Spontanheilung“ neigt. Auch Putz konnte zeigen, dass das akute Ortsgedächtnis von *Drosophila* durch eine Mutation im *ign*-Gen nicht beeinträchtigt wird (Putz et al. 2004). Das spricht ebenfalls für zwei getrennte Verarbeitungswege visueller und idiothetischer Informationen. Um das jedoch mit Sicherheit sagen zu können, müssten noch Versuche im Zusammenhang mit der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) in den Ringneuronen durchgeführt werden. Kuntz konnte 2017 zeigen, dass Stickstoffmonoxid die cGMP-regulierten Ionenkanäle moduliert. Lokale NO/cGMP Produktion in Ringneuronkompartimenten soll die Lage eines visuellen Objektes auf dem Ellipsoidkörper codieren (Kuntz et al. 2017).

Das Gen *ebo* codiert für *Exportin6* (Exp6), welches Komplexe mit *Aktin* bildet und dieses aus dem Nukleus heraus in das Zytosol transportiert. Bestimmte Mutationen im *ebo*-Gen führen zu Akkumulation von Aktin im Zellkern, wodurch der Transkriptionskomplex *Serum Response Factor/Myocardin-Related Transcriptional Factor* (dSRF/dMRTF) blockiert wird. Dies führt zu einem Verlust des visuellen Arbeitsgedächtnisses (Thran 2013; Neuser et al. 2008). Überdies weisen *ebo*-mutante Tiere eine strukturelle Entwicklungsstörung der Ellipsoidkörperformation auf. Beispielsweise zeigen *ebo*⁶⁷⁸-Tiere einen mehr oder weniger stark nierenförmigen Ellipsoidkörper, sowie einen median gespaltenen Fächerförmigen Körper (Strauss und Heisenberg 1993), wobei aber die strukturelle Veränderung des Ellipsoidkörpers nicht für den Verlust des visuellen Arbeitsgedächtnisses verantwortlich ist. Nach adulter Expression von *ebo* cDNA in den einzelnen Ringsystemen des Ellipsoidkörpers im *ebo*-mutanten Hintergrund konnte das Arbeitsgedächtnis gerettet werden, obwohl der strukturelle Defekt des Ellipsoidkörpers noch vorhanden war (Thran 2013). Im *IODA* zeigten *ebo*⁶⁷⁸-Tiere ein abnormales Laufverhalten. Die Lokomotion war stark eingeschränkt und die Tiere vielen häufig von der „Decke“ des Röhrchens, woraufhin sie die Orientierung verloren; somit waren sie nicht für ein Training geeignet. Es ist bekannt, dass *ebo*⁶⁷⁸-Tiere Defekte im Laufverhalten zeigen. So ist die Laufgeschwindigkeit im *Buridan* stark reduziert, während die zurückgelegte Strecke wildtypisch erhalten bleibt (Strauss und Heisenberg 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden daraufhin *ebo*⁶⁷⁸-mutante Tiere, welche zusätzlich ein UAS-*ebo* Konstrukt auf dem X-Chromosom trugen, auf ihr Verhalten im *IODA* getestet. Dazu wurden männliche CS-Wildtypen mit Weibchen des Genotyps *ebo*⁶⁷⁸ UAS-*ebo*/FM7a (X Chr.) verpaart. Die Nachkommen mit dem Genotyp *ebo*⁶⁷⁸ UAS-*ebo*/Y (X Chr.) zeigten im *IODA* ein annähernd normales Laufverhalten, was dem Heterosiseffekt geschuldet sein kann. Die Orientierung während des Trainings war jedoch nicht gegeben, aufgrund dessen das Orientierungsgedächtnis im anschließenden Test nicht vorhanden war.

Das Gen *rad* (früher auch *rsh*) codiert für ein *Adenylyl Cyclase-Activating Peptid Homolog* und ist in die Ausbildung des Anästhesie-resistenten Gedächtnisses (*Anaesthesia-Resistant Memory*, ARM) involviert (Heisenberg 2003; Lee et al. 2011). Im Gegensatz zu den molekularen Mechanismen, die dem *Short-Term Memory* (STM; cAMP/PKA Signalweg) und dem *Later Long-Term Memory* (LLTM; PKA/CREB Signalweg) zu Grunde liegen, ist der Signalweg zur Ausbildung eines ARM weitgehend unbekannt. *In vitro* Versuche zeigten, dass RAD von der PKA phosphoryliert werden kann, was ein Hinweis auf eine Beteiligung von RAD am cAMP/PKA-Signalweg sein könnte (Guan et al. 2011). *rad*¹ besitzt die stärkste Expression in den Calyces, sowie den Pedunkeln und den Loben der Pilzkörper, aber auch im Ellipsoidkörper des Zentralkomplexes (Folkers et al. 2006). *rad*¹-Tiere zeigten einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses im *IODA*, die Orientierung während des Trainings blieb intakt. Da die Pilzkörper nicht in die idiothetische Orientierung in der *Heat-Box*

involviert sind (Putz und Heisenberg 2002), scheint *rad* seine Funktion im Ellipsoidkörper oder in schwach exprimierenden Regionen des Gehirns auszuüben.

Im *IODA* zeigten Fliegen, welchen das Gen zur Bildung von Cryptochrom (CRY) fehlt, einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Das Blaulichtrezeptor-Protein Cryptochrom, welches von *cry* codiert wird, gehört zu der Familie der *DNA-Photolyasen*, besitzt selber aber keine Photolyaseaktivität mehr (Emery et al. 1998; Okano et al. 1999). Bei *Drosophila* ist bekannt, dass CRY in die Regulation der inneren Uhr involviert ist und zwar über die Verhinderung der lichtabhängigen PERIOD/TIMELESS Heterodimer-Komplexbildung (Emery et al. 1998; Ceriani 1999; Stanewsky et al. 1998). Überdies bindet CRY mit Proteinen des *supramolekularen Signalkomplexes* (Signalplex) des visuellen Systems. CRY interagiert hierbei über das membranständige Protein *Inactivation No Afterpotential D* (INAD) mit *Neither Inactivation Nor Afterpotential C* (NINAC) (Mazzotta et al. 2013). Überraschenderweise zeigen auch Fliegen mit einer Mutation des Gens *norpA* einen Verlust des idiothetischen Gedächtnisses. Bekannt ist die *norpA*-Phospholipase C als ein Schlüsselprotein der Phototransduktionskaskade (Bloomquist et al. 1988) und es war bis jetzt keine nicht-visuelle Funktion des Proteins bekannt. Die Möglichkeit, dass sehende Fliegen sich unter Rotlichtbedingungen an für sie sichtbaren Restlicht im *IODA* orientiert haben könnten, wurde damit ausgeschlossen. Nach Messung des emittierten Wellenspektrums der verwendeten Rotlichtlampe, wurden keine für *Drosophila* sichtbaren Wellenlängen erkannt (siehe Anhang). Somit ist davon auszugehen, dass *norpA* möglicherweise eine Rolle bei der idiothetischen Orientierung über den *cry* mediierten Signalweg spielt. *norpA* ist hierbei durchaus als Interaktionspartner von CRY bekannt (Emery et al. 2000; Ni et al. 2017; Szular et al. 2012).

Auch in der Wahrnehmung magnetischer Felder soll CRY bei *Drosophila* involviert sein. Hierbei soll das CRY-Flavoprotein magnetfeldsensitive Radikalpaare bilden, welche einen photoninduzierten Elektronentransfer über eine *Tryptophantriade* ermöglichen. Ein magnetisches Feld beeinflusst hierbei die Ausgangsprodukte der Flavin-Radikalpaare. Die nachgeschaltete Transduktionskaskade ist weitgehend unbekannt. Viele der migrierenden Tierarten, wie z. B. Vögel, verwenden einen CRY-abhängigen Inklinationskompass für magnetische Feldlinien zur Orientierung während ihrer saisonalen Wanderungen (Wiltschko 1972). Auch bei Fischen (Kirschvink et al. 2001); und sogar Säugern (Kimchi et al. 2004), wurde die Fähigkeit zur Magnetfeldorientierung nachgewiesen, wobei nicht nur Inklinations- sondern auch Polaritäts- (Nord/Süd)-Kompass vorkommen. Wildtypische *Drosophila*-Fliegen sollen sich mit Hilfe des CRY-medierten Signalweges ebenfalls an magnetischen Feldern orientieren können; *cry*-mutanten Fliegen fehlt diese Fähigkeit (Gegeer et al. 2008; Gegeer et al. 2010). Aufgrund der Untersuchungen von Gegeer et al., sowie unseren eigenen Ergebnissen bezüglich der „Magnetotaxis“ bei wildtypischen und *cry*-mutanten Fliegen ist jedoch anzunehmen, dass *Drosophila* in diesen Experimenten keine magnetischen Felder zur Orientierung verwendet (siehe Kapitel 3.1). Die „Magnetfeldvermeidung“ in Gegears Experimenten (Gegeer et al. 2008; Gegeer et al. 2010), lässt sich durch einen statistischen Effekt erklären, da unentschlossene Fliegen zu „Vermeidern“ des künstlichen Magnetfeldes gemacht wurden. Die Hinwendung zur zuletzt belohnten Seite dagegen kann durch idiothetische Orientierung erklärt werden.

Tiere, welche eine Mutation des Uhrengens *per* tragen, zeigen keinen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. *per*, dessen Genprodukte mit CRY interagieren und somit für einen lichtabhängigen Tag/Nacht-Rhythmus sorgen, haben zwar als Hauptkomponenten der inneren Uhr eine Schlüsselrolle in ihrer Regulation, (Lin et al. 2005; Ashmore und Sehgal 2003;

Ceriani et al. 2002), den Prozess des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses scheint die Unterdrückung der zirkadianen Rhythmik jedoch nicht zu beeinflussen. Damit ist es wahrscheinlich, dass der Verlust des Gedächtnisses im direkten Zusammenhang mit einer anderen *cry*-Funktion steht und nicht auf eine gestörte, zirkadiane Rhythmik zurückzuführen ist.

4.3 Der Einfluss des Ellipsoidkörpers auf die idiothetische Orientierung

Welche Rolle die einzelnen Ringsysteme des Ellipsoidkörpers auf die Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses haben, wurde über die Stilllegung und partielle Rettung der einzelnen Subsysteme, im jeweiligen mutanten genetischen Hintergrund, untersucht. Da der Ellipsoidkörper aus verschiedenen konzentrischen Ringsystemen besteht, welche wiederum in Untersysteme (R1; R2; R3 mit R3a, R3d, R3m, R3p und R3w; R4 mit R4d und R4m; R5 und R6) unterteilt sind (Omoto et al. 2018), stellte sich die Frage, welche Ringsysteme welche Funktion bei der Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses besitzen. Der Ellipsoidkörper dient als zentrale Schaltstelle in der visuellen Orientierung bei *Drosophila*. Hierbei spielen besonders die Ringneurone der Ringsysteme R3d und R3p (bis vor kurzem noch als Ringsystem R3 angesprochen) eine entscheidende Rolle. Ein Verlust des cGMP-Signalweges in dieser Neuronenklasse führt auch zu einem Verlust der visuellen Orientierungsfähigkeit im *Detour*-Paradigma (Kuntz et al. 2017; Kuntz et al. 2012). Das Genprodukt von *ebo*, Exportin6 (Exp6), kann hingegen zu einer Rettung des visuellen Arbeitsgedächtnisses führen, sobald es im mutanten Hintergrund in jedem beliebigen, der damals bekannten, Ringsystem (früher nur R1 bis R4), exprimiert wird. (Thran 2013). Exp6 ermöglicht den Abtransport von Aktin aus dem Zellkern heraus, was für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion essentiell ist (Thran 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde die chemische Transmission zwischen den Neuronen in den einzelnen Ringsystemen zum Erliegen gebracht. Mit Hilfe von Expression von *Tetanustoxin* (TNT) in den einzelnen Ringsystemen des Ellipsoidkörpers kann gezielt in jedem Subsystem die chemische Transmission zwischen den Synapsen unterbunden werden, da TNT das für die Exozytose benötigte Protein *Synaptobrevin* spaltet und es somit funktionsunfähig macht (Sweeney et al. 1995). Kombiniert man ein UAS-Konstrukt, mit dessen Hilfe TNT exprimiert werden kann, mit einem GAL4-Konstrukt, welches nur in bestimmten Subsystemen des Ellipsoidkörpers aktiv ist, so lässt sich gezielt die Neurotransmitterausschüttung in einzelnen Ringsystemen unterbinden (siehe Kapitel 3.4). Mit Hilfe verschiedener Treiberlinien konnte die Expression von TNT auf bestimmte Ringsysteme beschränkt werden. Es wurden die Treiber R31A12-GAL4 für R1 (Omoto et al. 2018), 198Y-GAL4 (Renn et al. 1999) für R1 plus, EB1-GAL4 für R2 (Omoto et al. 2018), R19C08-GAL4 (Omoto et al. 2017) und VT049921-GAL4 für R2 minus, 189Y-GAL4 für R3d&R3p (Omoto et al. 2018) und VT043679-GAL4 für R4d verwendet. Der R4 minus-spezifische Treiber *ftz-ng*-GAL4 führte, genauso wie der R4m-Treiber VT025526-GAL4 (Lin et al. 2013), nach Expression von TNT zur Letalität der Versuchstiere.

Wird TNT in jeweils einem Ringsystem von den vier ursprünglich bekannten Ringsystemen exprimiert, verlieren die Tiere ihre Fähigkeit in der Testphase des *IODA*, die zuvor unbestrafte Seite wiederzufinden. Eine Unterdrückung der synaptischen Transmission im Ringsystem R1 mit Hilfe des Treibers R31A12-GAL4 führte im *IODA* zu einer so starken Immobilität der Fliegen unter Rotlichtbedingungen, dass ein Training nicht möglich war. Unter normalen

Lichtbedingungen war die Aktivität der Tiere annähernd normal. Die Expression von GFP über den R1 plus Treiber 198Y-GAL4 lässt kein Fluoreszenzsignal in der immunhistologischen Untersuchung erkennen (Abbildung 43), führt aber nach Expression von TNT, zu einem Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses in der Testphase, wobei die Orientierungsfähigkeit in der Trainingsphase erhalten bleibt (siehe Abbildung 20). Warum der Treiber nach Kombination mit einem Effektor ein Einfluss auf das Verhalten zeigt, nicht jedoch zu einem GFP-Signal führt, ist unbekannt. Möglicherweise besitzt der Treiber eine nur schwache Aktivität, welche nicht ausreichend für eine GFP-Expression ist. Für die Verhaltensanalyse könnte jedoch auch schon eine geringe Aktivität ausreichend sein, um nach Kombination mit einem Effektor einen Einfluss auf das Verhalten auszuüben. Da die immunhistologischen Untersuchungen für 198Y-GAL4 erst ca. ein Jahr nach den Verhaltensexperimenten durchgeführt worden waren, könnte in diesem Zeitraum auch ein Verlust der GAL4-Aktivität durch, z.B. eine P-Element-Insertion, stattgefunden haben.

Auch nach Stilllegung des Ringsystems R2 mit EB1-GAL4 oder R29C08-GAL4 zeigten die Tiere eine stark eingeschränkte Mobilität im Rotlicht, wodurch auch hier kein Training möglich war. Eine Expression von TNT durch den R2 minus Treiber VT49921-GAL4 hält die Aktivität der Tiere aufrecht, jedoch verlieren sie ihr idiothetisches Orientierungsgedächtnis.

Der Treiber 189Y-GAL4 spricht die Ringsysteme R3d und R3p an. Die Auswirkungen der Expression von TNT mit Hilfe von 189Y-GAL4 wurde sowohl unter normalen Lichtverhältnissen, wie auch unter Rotlichtbedingungen getestet. Die Aktivität der experimentellen Tiere war nur unter normalen Lichtverhältnissen ausreichend, um die Tiere zu trainieren. Sie zeigten nach dem Training ein intaktes, idiothetisches Orientierungsgedächtnis. Unter Rotlichtbedingungen war auch hier die Mobilität der Tiere zu stark eingeschränkt; ein Training war somit nicht möglich. Dieses Verhalten lässt ebenfalls die Vermutung zu, dass sich das visuelle und nicht-visuelle Orientierungsgedächtnis in ihren Signaltransduktionswegen unterscheiden.

Auch eine Unterdrückung der chemischen Transmission in R4d über VT043679-GAL4 führte zu einem Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Ob der Treiber das postulierte Ringsystem R4d noch anspricht, konnte aufgrund der fehlenden GFP Expression in der immunhistologischen Untersuchung, welche einige Monate nach den Verhaltensexperimenten durchgeführt wurde, nicht überprüft werden (Abbildung 53). Möglicherweise ist der Treiber zu schwach, um eine GFP-Expression zu ermöglichen, denn selbst nach einer Neubestellung des Treiberstammes und unverzüglicher Kreuzung mit einer UAS-GFP-Linie, konnte in den Nachkommen ebenfalls kein GFP-Signal erkannt werden.

Über die Rolle des Ringsystems R4m in der idiothetischen Orientierung kann keine Aussage getroffen werden, da eine Expression von TNT in diesem Ringsystem zur Letalität der Versuchstiere führt, genauso wie mit dem globalen R4-Treiber *ftz-ng*-GAL4, welcher sich nach TNT-Expression ebenfalls letal auf die Tiere auswirkt. Offenbar werden die Ringsysteme R1; R2; R3d und R3p; sowie eventuell R4d für die Ausbildung eines nicht-visuellen Orientierungsgedächtnisses benötigt (Abbildung 68).

Da die Ringsysteme R5 und R6 erst gegen Ende der vorliegenden Arbeit bekannt wurden, sind sie nicht in die Verhaltensexperimente mit einbezogen worden. Ausblickend würde die Analyse dieser Ringneuronsysteme das Bild der notwendigen Systeme, in Bezug auf die idiothetischen Orientierung, jedoch vervollständigen.

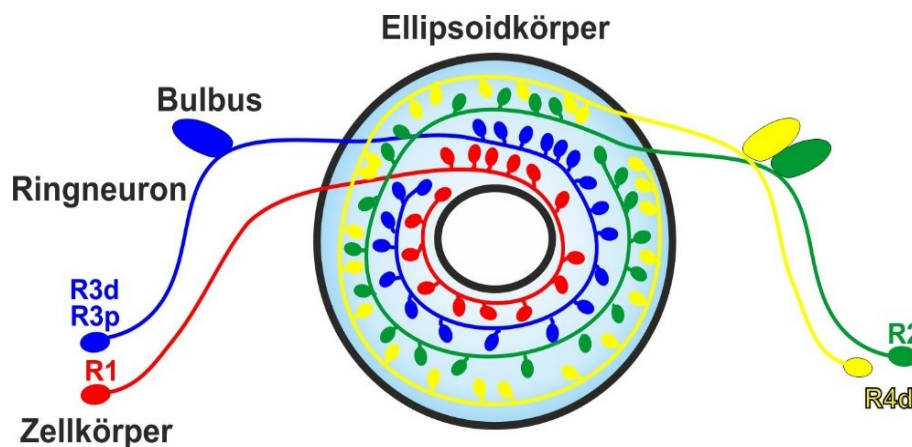


Abbildung 68: Für das idiothetische Orientierungsgedächtnis benötigte Ringneuronsysteme für die Informationsleitung. Schematische Darstellung einzelner Ringneurone der Ringneuronsysteme im Ellipsoidkörper. Für ein funktionierendes idiothetisches Orientierungsgedächtnis werden die Ringsysteme R1, R2, R3d und R3p, sowie R4 benötigt. Die Neurone der Ringsysteme R2 (grün), R3d und R3p (blau), sowie R4d (gelb) besitzen dendritische Eingänge in den Bulbi, Neurone des Ringsystems R1 (rot) besitzt keine Eingänge in die Bulbi. Die Zellkörper der Ringneurone liegen weiter distal vom EK. R5 und R6 nicht getestet.

4.4 Die Notwendigkeit der *dnc*-PDE und *rut*-AC in den Ringsystemen des Ellipsoidkörpers

Untersucht wurden die für die Modifikation des cAMP-Spiegels zuständigen Genprodukte von *rut* und *dnc* auf ihre Erfordernisse in den Subsystemen R1 bis R4 des Ellipsoidkörpers. Das GAL4/UAS-System erlaubt die partielle Rettung von Mutationen, d.h. nur in jeweils einzelnen Ringen wird die Expression von wildtypischer *rut*-cDNA, bzw. *dnc*-cDNA, in dem für das entsprechenden Gen mutanten Hintergrund, möglich. Wird das idiothetische Orientierungsgedächtnis damit wiederhergestellt, so lässt sich daraus schließen, dass das bereitgestellte Genprodukt im angesprochenen Ringsystem für diese Gedächtnisform benötigt wird und dies für das untersuchte Verhalten hinreichend ist (Rettungsexperiment) (Zars et al. 2000). Parallel hierzu wird mittels Expression in den jeweiligen Ringsystemen von für *rut*-mRNA, bzw. *dnc*-mRNA komplementäre Interferenz-dsRNA (RNAi) die Bildung der Genprodukte verhindert (Knock-Down-Experiment). Dabei ist zu beachten, dass im Knock-Down Experiment i.d.R. nicht alle mRNAs des Gens degradiert werden, was zu einer Restaktivität des Genprodukts führen kann, die folgend das Verhalten aufrechterhalten könnte. Ebenfalls ist ein möglicher *Off-Target Effekt* („Am Ziel vorbei“) zu berücksichtigen. Dieser beschreibt eine mögliche Degradierung nicht adressierter mRNA anderer Gene, welche sich auf das Verhalten auswirken kann (Kuntz 2015).

Die Rettungsexperimente von *rut* zeigen, dass das Genprodukt AC in den Ringsystemen R2 und R3m für die Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses benötigt wird. Zwar ist eine Rettung des Orientierungsverhaltens auch mit den postulierten R1 plus Treibern 198Y-GAL4 (Renn et al. 1999) und VT039763-GAL4 möglich, jedoch scheinen diese Treiber auch noch andere Ringsysteme anzusprechen.. Das Ringsystem R1 besitzt als einziges Subsystem keine dendritischen Verästelungen in den Bulbi des Zentralkomplexes, jedoch ist in den immunhistologischen Präparaten von Renn aus dem Jahre 1999 eine Expression des

Treibers 198Y-GAL4 in den Bulbi zu erkennen (Renn et al. 1999). Leider zeigte 198Y-GAL4 in der vorliegenden Arbeit keine Expression von GFP (Abbildung 43), daher können keine Rückschlüsse auf die von 198Y-GAL4 adressierten Strukturen gezogen werden. Möglicherweise ist auch hier die Aktivität des Treibers zu schwach, um eine GFP-Expression zu ermöglichen, aber ausreichend um im Rettungs- und Knock-Down Experiment einen Einfluss auf das Verhalten auszuüben. Da die immunhistologischen Untersuchungen für 198Y-GAL4 erst ca. ein Jahr nach den Verhaltensexperimenten durchgeführt worden waren, könnte in diesem Zeitraum auch ein Verlust der GAL4-Aktivität durch, z.B. eine P-Element-Insertion, stattgefunden haben. Auch der Treiber VT039763-GAL4 zeigt eine Expression in den Bulbi (<http://www.virtualflybrain.org>). Daher scheint die Rettung des Orientierungsgedächtnisses nach Expression von *rut*-cDNA unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 oder VT039763-GAL4 wahrscheinlich in der Expression in zusätzlichen Ringsystemen, wahrscheinlich R2 oder R3, begründet zu sein. Daher sind diese beiden Treiber in die Kategorie „R1 plus“ einzuordnen. Ein Rettungsversuch durch Expression von *rut*-cDNA mit dem R1 exklusivem Treiber R31A12-GAL4 (Omoto et al. 2018) führte zu keiner Rettung des Orientierungsgedächtnisses, daher wurde auf die Durchführung des Knock-Down Experimentes mit diesem Treiber aus Zeitgründen verzichtet, da ein Rettungsexperiment die „sichereren“ Ergebnisse liefert. Die Knock-Down Experimente unter der Kontrolle der R1 plus Treiber, zeigten einen Verlust des Orientierungsgedächtnisses sobald das *rut*-Interferenzkonstrukt unter der Kontrolle von 198Y-GAL4 exprimiert wird. Unter der Kontrolle des Treibers VT039763-GAL4 zeigen die Tiere hingegen ein intaktes Orientierungsgedächtnis. Möglicherweise wurde nicht das gesamte Genprodukt in den zusätzlich exprimierten Bereichen degradiert, wodurch das Verhalten aufrechterhalten werden konnte.

Eine Rettung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses über Expression von *rut*-cDNA im *rut*¹ Hintergrund in den Ringsystemen R2 über EB1-GAL4 oder R2 plus über R19C08-GAL4 (Omoto et al. 2018; Omoto et al. 2017), sowie im Ringsystem R3m mit R28D01-GAL4 (Omoto et al. 2018), führte zu einer Wiederherstellung des Orientierungsgedächtnisses; ein Knock-Down von *rut*-mRNA mit EB1-GAL4 bewirkte einen Verlust des idiothetischen Gedächtnisses. Der nicht eindeutig als R2 spezifisch nachweisbare R2 minus Treiber VT49921-GAL4 kann über Expression von *rut*-cDNA das Orientierungsgedächtnis nicht wiederherstellen, jedoch zeigt das Knock-Down Experiment mit jenem Treiber überraschenderweise einen Verlust dieser Gedächtnisform. Möglicherweise wurden durch den *Off-Target Effekt* mRNA anderer Proteine in diesem Ringsystem, oder *rut*-mRNA in weiteren, zusätzlich von diesem Treiber angesprochenen Strukturen, degradiert.

Nach Expression von *rut*-cDNA in weiteren Ringsystemem über 189Y-GAL4 für R3d und R3p (Omoto et al. 2018), VT42759-GAL4 für R3 minus, R54B05-GAL4 für R3 plus oder *ftz-ng*-GAL4 für R4 minus konnte keine Rettung des Orientierungsgedächtnisses beobachtet werden. Jedoch konnte ein Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses nach Expression von *rut*^{RNAi} unter der Kontrolle von R54B05-GAL4 beobachtet werden. Zu beachten ist, dass auch bei R54B05-GAL4, im Gegensatz zu R54B05-LexA, kein GFP-Signal in der immunhistologischen Untersuchung detektiert werden konnte. Wahrscheinlich ist auch das Ergebnis einem *Off-Target Effekt* zuzuschreiben, da bei Verwendung dieses Treibers im Rettungsexperiment keine Wiederherstellung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses beobachtet werden konnte. Die Notwendigkeit des *rut*-Genprodukts scheint somit auf die Ringsysteme R2 und R3m beschränkt zu sein (Abbildung 69), wobei die Untersuchung der Ringsysteme R5 und R6 noch ausstehen, da sie zur Zeit der Experimente noch nicht bekannt waren.

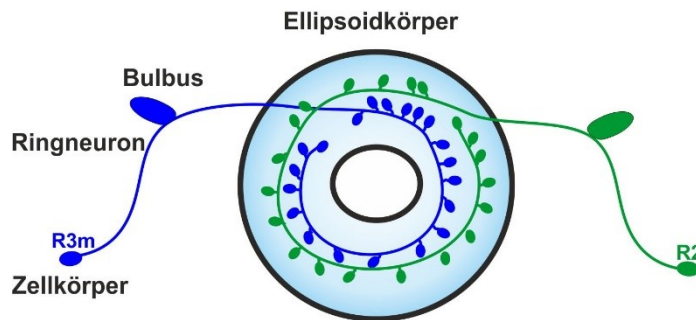
Ähnliche Ergebnisse lieferte auch das Rettungsexperiment von *dnc* für R1 über Expression von *dnc*-cDNA im *dnc*¹-mutanten Hintergrund. Auch hier konnte nur eine Rettung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses mit den R1-plus Treibern 198Y-GAL4 und VT039763-GAL4 erzielt werden, nicht aber mit dem exklusiven R1-Treiber R31A12-GAL4. Jedoch konnte mit Hilfe der RNA-Interferenz unter der Kontrolle des R1 plus-Treibers 198Y-GAL4 das Orientierungsgedächtnis nicht zerstört werden, was wahrscheinlich ebenfalls auf Restaktivität des Genprodukts zurückzuführen ist. Ein Verlust der Aktivität des Treibers ist auszuschließen, da das Knock-Down Experiment einige Monate vor dem erfolgreichen Rettungsexperiment von *dnc* durchgeführt worden war. Ob die Aktivität von 198Y-GAL4 nachfolgend verloren ging, was die fehlenden GFP-Expression begründen würde (Abbildung 43), kann nicht ausgeschlossen werden, da sich zwischen der experimentellen Phase mit diesem Treiber und der immunhistologischen Analyse fast zwei Jahre befunden hatten.

Eine Rettung des Gedächtnisses mit Hilfe der R2-Treiber EB1-GAL4, bzw. R2 plus Treibers R19C08-GAL4 konnte nicht beobachtet werden, auch ein Knock-Down von *dnc*-mRNA über EB1-GAL4 beeinflusste das Verhalten nicht.

Jedoch führt die Expression der *dnc*-cDNA in den Ringsystemen R3m über R28D01-GAL4; R3d und R3p über 189Y-GAL4 sowie R3 minus über VT42759-GAL4 zu einer Wiederherstellung des Orientierungsgedächtnisses. Die Degradierung der *dnc*-mRNA im Knock-Down Experiment über 189Y-GAL4 oder R54B05-GAL4 zeigte jedoch keinen Einfluss auf das Orientierungsgedächtnis, was aber mit einer Restaktivität von nicht abgebauten *dnc*-Genprodukt begründet werden kann. Möglicherweise könnte aber auch im Falle von R54B05-GAL4 die Aktivität des Treibers über die Zeit verloren gegangen sein. Zwischen den zuerst vorgenommenen Rettungs-/ Knock-Down Experimenten von *rut*, in denen der Treiber einen Effekt im Knock-Down Experiment zeigte und dem Knock-Down Versuch von *dnc*, in welchem kein Einfluss des Treibers zu erkennen war, lagen zwei Monate. Die immunhistologischen Untersuchungen erfolgten fast zwei Jahre später, am Ende meiner experimentellen Arbeit.

Im Ringsystem R4 minus, adressiert über den Treiber *ftz-ng*-GAL4, konnte weder im Rettungsexperiment, noch im Knock-Down Versuch, ein Einfluss auf das Orientierungsverhalten beobachtet werden. Somit scheint das Genprodukt von *dnc* sowohl in R3m, als auch in R3d und R3p für eine Etablierung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses zuständig sein zu können (Abbildung 69). Auch hier wurden R5 und R6 nicht getestet, da sie auch zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt waren. Die Notwendigkeit der Genprodukte von *rut* und *dnc* in unterschiedlichen Zelltypen ist nicht ungewöhnlich. U. a. konnte Krause 2015 zeigen, dass die Genprodukte von *rut* und *dnc* in unterschiedlichen Neuronengruppen für das Erlernen der eigenen Körpergröße benötigt werden (Krause 2015).

rutabaga



dunce

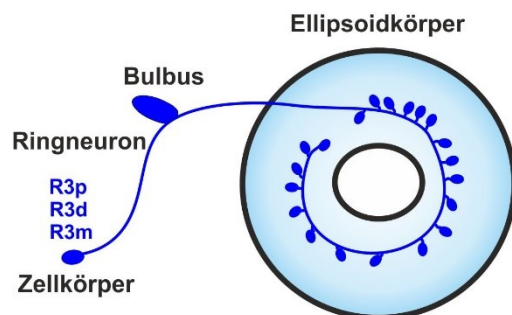


Abbildung 69: Notwendigkeit der Genprodukte von *rutabaga* und *dunce* in den einzelnen Ringsystemen R1 bis R4. Schematische Darstellung einzelner Ringneurone der Ringneuronsysteme im Ellipsoidkörper. Für ein funktionierendes idiothetisches Orientierungsgedächtnis kann die *rutAD* in den Ringsystemen R2 und R3m verwendet werden. Die *dnc-PDE4* wird in den R3 Subsystemen R3m oder R3d und R3p benötigt. Die Neurone der Ringsysteme R2 (grün), R3m, R3d und R3p (blau) besitzen dendritische Eingänge in den Bulbi. Die Zellkörper der Ringneurone liegen weiter distal vom EK. R5 und R6 nicht getestet.

4.5 Cryptochrom ist in einem Subsystem des Ellipsoidkörpers für das idiothetische Orientierungsgedächtnis notwendig

Das initiale Thema meiner Arbeit bestand darin, die von Gegeat et al. nachgewiesene „Magnetotaxis“ von *Drosophila*, auf die darin involvierten Proteine und Strukturen, zu untersuchen. Dazu verwendeten wir einen Versuchsaufbau, ähnlich der verwendeten Apparatur in Gegeats Experiment (siehe Anhang), und maßen die Spontanpräferenz der Tiere auf künstliche, magnetische Felder, sowie den Lerneffekt auf eine Kopplung von Zuckerbelohnung mit dem künstlichen Magnetfeld. Jedoch stellten sich nach kurzer Zeit zum Teil widersprüchliche Ergebnisse ein, oder publizierte Ergebnisse konnten nicht reproduziert werden. Bei genauerer Betrachtung der von Gegeat publizierten Versuchsabläufe, fiel neben einem statistischen Fehler in der Auswertung, auch eine in Frage zu stellende Versuchsdurchführung auf. Die Fliegen wurden in seiner Arbeit nur einmal für zwei Minuten auf der Magnetfeldseite mit Zucker belohnt; im anschließenden Test wurde das Magnetfeld immer auf derselben Seite präsentiert, auf welcher zuvor die Zuckerbelohnung angeboten worden war. Im Gegensatz dazu wurde jede Fliegengruppe in meiner Arbeit auf jeder Seite auf Zucker im Magnetfeld, bzw. keinen Zucker ohne Magnetfeld trainiert und das Magnetfeld wurde im anschließenden Test alternierend auf der zuvor belohnten oder unbelohnten Seite angeboten, wodurch ein signifikant schlechterer Trainingseffekt zu erkennen war.

Somit stellte sich die Frage, ob sich die Fliegen in Gegeats Experiment weniger nach dem künstlichen Magnetfeld orientiert hatten, sondern vielmehr auf die Seite konditioniert waren,

auf welcher sie mit Zucker belohnt worden waren. Daraufhin modifizierten wir unsere Versuchsdurchführung gemäß dem Versuchsdurchlauf von Gegeer und Kollegen (siehe Kapitel 2.4.1 und 3.1) Nach den Untersuchungen von Gegeer et al. 2010, sowie unseren eigenen Experimenten über die CRY-abhängige „Magnetotaxis“, stellte sich die Frage, ob CRY weniger eine Rolle bei der Integration magnetischer Feldinformationen, sondern vielmehr im Orientierungsverhalten in Dunkelheit spielt. Im *IODA* zeigten *cry⁰¹*-mutante Tiere einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Unser Ziel war nun herauszufinden, in welchem Bereich des Zentralkomplexes CRY für die Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses benötigt wird. CRY ist nicht nur in den Uhrengenen-exprimierenden *lateralen Neuronen* (LN)-Gruppen nachgewiesen, sondern auch in Bereichen, welche nicht im bekannten Zusammenhang mit der Regulation der inneren Uhr stehen, wie beispielsweise die Antennen oder eine Subklasse des R4-Ringsystems des Ellipsoidkörpers (Yoshii et al. 2008). Da der Ellipsoidkörper der Hauptspeicherort für Orientierungsinformationen ist, galt dem Ringsystem R4 als Ort der CRY-vermittelten Orientierungsfähigkeit besonderes Interesse. Mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems konnten wir nach Expression von *cry*-cDNA in R4 minus über *ftz-ng*-GAL4 im *cry⁰¹*-mutanten Hintergrund, sowie in einer medialen Subklasse von R4 über VT025526-GAL4, das idiothetische Orientierungsgedächtnis wiederherstellen (Rettungsexperiment), wie auch über *cry*-RNA Interferenz mit *ftz-ng*-GAL4 und VT0436789-GAL4 (R4d), nicht aber mit VT025526-GAL4 (R4m) das Gedächtnis zerstören (Knock-Down Experiment). Daraus lässt sich schließen, dass CRY im Ringsystem R4 für das Orientierungsgedächtnis benötigt wird. In welchem Subsystem von R4 CRY benötigt wird, lässt sich nicht eindeutig nachweisen. Zwar fand eine erfolgreiche Rettung von *cry* in R4m statt, jedoch konnte das Orientierungsgedächtnis nach Knock-Down von *cry*-mRNA nur in R4d, nicht aber in R4m, zerstört werden. Möglicherweise wurde im Knock-Down Experiment mit VT025526-GAL4 nicht ausreichend Genprodukt degradiert. Da über den R4d-Treiber keine GFP-Expression zu erkennen war, konnte folgend keine rekombinante Linie, welche den R4d-Treiber und die *cry⁰¹* -Mutation auf dem dritten Chromosom trägt, hergestellt werden. Somit war ein Rettungsexperiment in diesem Ringsystem nicht möglich.

Für das Rettungsexperiment wurde der Treiber für das Ringsystem R4m mit der *cry⁰¹* -Mutation auf dem dritten Chromosom rekombiniert, um anschließend nach Einkreuzen des UAS-*cry* Transgens die Expression von CRY im Subringsystem von R4m zu erreichen (siehe Anhang). Nach der immunhistologischen Untersuchung und Verhaltensanalyse im *IODA* der rekombinanten Fliegenlinien, etablierten wir eine Linie, welche sowohl den R4m-Treiber VT025526-GAL4, wie auch die *cry⁰¹*-Mutation im Genom inseriert hatte. Nach Einkreuzen des UAS-*cry⁺* Transgens (Rettungsexperiment) konnte das Orientierungsgedächtnis im *IODA* gerettet werden. Eine Expression von CRY in R4m scheint ausreichend zu sein, um das Orientierungsverhalten zu gewährleisten. Nach Degradierung der *cry*-mRNA konnte jedoch kein Verlust des Orientierungsgedächtnisses beobachtet werden (Knock-Down Experiment), was wahrscheinlich auf nicht vollständig degradiertes Genprodukt zurückzuführen war.

Eine Expression von GFP unter der Kontrolle des R4d Treibers VT043679-GAL4 konnte in der immunhistologischen Untersuchung nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich ein Verlust des Orientierungsgedächtnisses im *IODA*, sobald das *cry*-dsRNA Interferenzkonstrukt unter der Kontrolle dieses Treibers exprimiert wurde. Möglicherweise besitzt der Treiber VT043679-GAL4 nur eine schwache Aktivität, welche nicht dazu ausreicht, genügend GFP zu exprimieren, aber hinreichend ist, um so viel *cry*-dsRNA Interferenzkonstrukt zu exprimieren,

dass das Verhalten beeinflusst wird. Möglicherweise ist aber auch die Aktivität dieses Treibers im Laufe der Zeit verloren gegangen. Die Knock-Down Experimente von *cry* unter der Kontrolle von VT043679-GAL4 fanden ein Jahr vor der immunhistologischen Kontrolle statt, sodass es durchaus möglich wäre, dass eine fehlende Expression von GFP (Abbildung 53) über diesen Treiber dem Verlust der Treiberaktivität geschuldet sein könnte. Jedoch widersprechen die Ergebnisse des Knock-Down Experimentes von *cry* in R4d den Ergebnissen des Rettungsversuchs in R4m, denn eine Rettung von *cry* in R4m war ausreichend (s.o.). Der R4m-Treiber VT025526-GAL4 könnte jedoch zusätzliche Expression in R4d besitzen, wodurch eine Rettung unter der Kontrolle dieses Treibers auch in R4d stattgefunden haben könnte. Jedoch wurde im Knock-Down Versuch nicht genug Genprodukt in diesem zusätzlichen Ring degradiert, um das Verhalten zu beeinflussen. Somit wäre es möglich, dass das eigentliche R4 Subsystem, in welchem CRY benötigt wird, nicht R4m, sondern R4d ist. Ohne den aussagekräftigen Rettungsversuch für R4d kann das aber nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Als Negativkontrolle zur Bestätigung, dass CRY nur im Bereich der endogenen Expression benötigt wird, wurde das Protein ebenfalls in einem Ringsystem, in welchem es normalerweise nicht vorkommt, im mutanten Hintergrund, exprimiert (Rettungsexperiment). Hierzu wählten wir den Treiber 189Y-GAL4, welcher die Ringsysteme R3d und R3p adressiert (Omoto et al. 2018). Die Ergebnisse des Rettungsexperiments sind jedoch nicht eindeutig. Es zeigte sich, dass die Tiere während des Trainings keine grenzwertig signifikante Vermeidung der bestraften Seite zeigten ($p = 0,0720$), wodurch normalerweise kein Lerneffekt eintreten dürfte. Jedoch zeigten die Tiere im anschließenden Test eine signifikant längere Aufenthaltsdauer in der zuvor unbestraften Seite, wobei der p-Wert mit 0,0405 ebenfalls nahe der Signifikanzschranke von $p \geq 0,05$ liegt und die Aufenthaltsdauer in der unbestraften Seite sich in der Trainingsphase nicht signifikant von der Testphase unterscheidet. Somit kann nicht eindeutig gesagt werden, ob die Tiere ein Orientierungsgedächtnis ausgebildet haben. Jedoch besteht die Annahme, dass die Expression von *cry*-cDNA im Ringsystem R3d und R3p nicht ausreicht, um das Orientierungsgedächtnis wiederherzustellen.

cryptochrome

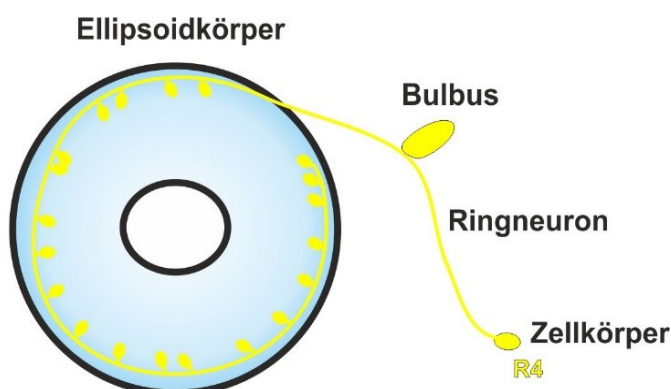


Abbildung 70: Das Genprodukt von *cryptochrome* ist notwendig und hinreichend im Bereich seiner endogenen Expression in R4. Schematische Darstellung einzelner Ringneurone der Ringneuronsysteme im Ellipsoidkörper. Für ein funktionierendes idiothetisches Orientierungsgedächtnis wird *cry* im Ringsystem R4 benötigt und ist hinreichend. Die Neurone des Ringsystems R4 (gelb), besitzen dendritische Eingänge in den Bulbi. Die Zellkörper der Ringneurone liegen weiter distal vom EK.

4.6 Die Bedeutung kolumnärer Neurone für die visuelle und idiothetische Orientierung

Es ist bekannt, dass die kolumnären Neurone der P-EN und E-PG-Neuronenklassen für die Bereitstellung und Modifikation einer, für ein visuelles Objekt kodierenden, neuronalen Aktivität in Bereichen des Ellipsoidkörpers zuständig sind (Seelig und Jayaraman 2015; Turner-Evans et al. 2017; Green et al. 2017; Green und Maimon 2018). Es stellte sich die Frage, ob diese Neuronenklassen auch in die Ausbildung eines nicht-visuellen idiothetischen Orientierungsverhaltens eingebunden sind. Für die Beibehaltung der korrekten Bewegungsrichtung im Flug (Guo et al. 2014), sowie im Lauf (Seelig und Jayaraman 2015; Turner-Evans et al. 2017; Kuntz 2015), ist der Ellipsoidkörper neben der Protozerebralbrücke, eine entscheidende Schaltstelle. Seelig und Jayaraman konnten mittels Kalziumimaging nachweisen, dass ein Objekt in einer bestimmten Position zur Fliege, ein neuronales Aktivitätssignal in einem definierten Bereich des Ellipsoidkörpers zur Folge hat, welches über eine Klasse kolumnärer Neurone vermittelt wird (E-PG) und das jenes Signal für mehr als 40 Sekunden erhalten bleibt, selbst wenn das Objekt verschwindet (Seelig und Jayaraman 2015). Drehte sich die Fliege hierbei, so wurde das Signal über eine weitere Klasse kolumnärer Neurone (P-EN) auf dem Ellipsoidkörper, relativ zur Bewegung der Fliege, verschoben (Turner-Evans et al. 2017; Green et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Treiberlinien für die Unterdrückung der synaptischen Transmission über Expression von TNT in den E-PG, sowie den P-EN Neuronen verwendet. Zur Adressierung der E-PG Neurone fanden die Treiber R26B12-GAL4, R26C04-GAL4, R19G02-GAL4 sowie R60D05-GAL4, für die P-EN Neurone R37F06-GAL4, R12D09-GAL4, R13D05-GAL4 und R41G11-GAL4 Verwendung (Wolff et al. 2015).

Zur Überprüfung der Fähigkeit der Fliegen, sich an visuellen Objekten orientieren zu können, wurde zunächst das *Buridan* Paradigma verwendet. In diesem Versuchsaufbau patrouilliert die Fliege zwischen zwei für sie unerreichbaren Landmarken. Die Genauigkeit, mit welcher die Fliege die Landmarken anläuft, wird über den *medianen absoluten Fehlerwinkel*, d.h., die Abweichung zur Ideallinie zur winkelmäßig näheren der beiden Landmarken ermittelt (Strauss und Pichler 1998). Wildtypische CS Fliegen laufen die Landmarken typischerweise in einem Schwankungswinkel von $22^\circ \pm 3^\circ$ an [14° bei Thran, 2013 (Thran 2013)]. Um ein Orientierungsgedächtnis ausbilden zu können, ist es notwendig, Landmarken gezielt anlaufen zu können. Daher wurde das *Buridan* Paradigma als Vortest zur Überprüfung dieser Fähigkeit verwendet. Es zeigte sich, dass sich die absoluten, medianen Fehlerwinkel weder der Treiber-, noch der Effektorkontrollen signifikant von denen des Wildtyps CS unterscheiden; lediglich zwei Versuchsgruppen weichen in ihrem Fehlerwinkel signifikant vom Wildtyp CS ab. Die Treiberkontrolle für R26C04-GAL4 und die experimentelle Gruppe des Genotyps $w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III$, wiesen einen zum Wildtyp unterschiedlichen medianen Fehlerwinkel auf. Während die Kontrollgruppe $+/Y;;R26C04-GAL4/III$ einen kleineren, also „korrekteren“ absoluten, medianen Fehlerwinkel, vermutlich aufgrund des Heterosiseffekts, verglichen mit dem Wildtyp aufweist, läuft die experimentelle Gruppe $w/Y;UAS-TNT/II;R12D09-GAL4/III$ die Landmarken in einem signifikant schlechteren absoluten medianen Fehlerwinkel an. Betrachtet man die immunhistologischen Gehirnpräparate, in welchen GFP unter der Kontrolle von R12D09-GAL4 exprimiert wird, so fällt auf, dass dieser P-EN Neuronen spezifische Treiber als zusätzliche Struktur auch einen Teil der Anterioren Optischen Tuberkel (AOTU) anspricht (Abbildung 60). Die AOTUs agieren als Schaltstelle zwischen Medulla/Lobulareingängen in das Zentralhirn und Ausgängen in die Bulbi des

Ellipsoidkörpers und integrieren räumliche Informationen aus den optischen Loben in den Zentralkomplex. Hierbei bedienen unterschiedliche Strukturen der AOTUs über die Bulbi unterschiedliche Ringsysteme des Ellipsoidkörpers. Die *posterioere lateral small unit* (SU) projiziert hierbei auf das distale vierte Ringsystem ($SU-I_{\text{post}} > R4d$), die *anteriore central small unit* auf das zweite Ringsystem ($SU-c_{\text{ant}} > R2$) (Timaeus et al. 2017). Der signifikant schlechtere mediane Fehlerwinkel dieser Gruppe könnte mit der Stilllegung des, von diesem Treiber zusätzlich angesprochenen Teils der AOTUs und damit dem Verlust der korrekten Verarbeitung visueller Informationen, zusammenhängen. Überraschenderweise zeigte die experimentelle Gruppe, in welcher über den Treiber $R49E09-GAL4 > UAS-TNT$ nur in der intermedialen medianen Domäne (Omoto et al. 2017) der AOTUs (AOTU_{im}) TNT exprimiert wird, keine Verschlechterung in den Anläufen der Landmarken. Von Bienen ist bekannt, dass verschiedene Subkompartimente des AOTUs für die Verarbeitung unterschiedlicher visueller Stimuli zuständig sind (Mota et al. 2011). Möglicherweise ist der Unterschied in den medianen absoluten Fehlerwinkeln zwischen diesen beiden Gruppen mit der Stilllegung unterschiedlicher Subkompartimente der AOTUs zu erklären.

Während die Stilllegung der P-EN, bzw. E-PG Neurone keine Auswirkung auf das Orientierungsverhalten bei permanent sichtbaren Landmarken zeigt, zeigen die Tiere mit blockierten P-EN oder E-PG Ausgangsynapsen aber einen Verlust des visuellen und des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Die vektoriellen Laufstrecken hin zur verschwundenen Landmarke im *Persistenz*-Paradigma, sowie die Anläufe der zuerst gezeigten Landmarke im *Detour*-Paradigma waren signifikant schlechter, verglichen mit dem Wildtyp CS. Im *Persistenz*-Paradigma oszillieren wildtypische Fliegen auf einer runden Plattform zwischen zwei Landmarken. Das Paradigma ähnelt dem *Buridan*-Paradigma, jedoch verschwindet die angesteuerte Landmarke, sobald die Fliege die imaginäre Mittellinie der Arena überquert hat. Die Beibehaltung der Laufrichtung hin zur verschwundenen Landmarke wird als *Nachfixation* bezeichnet (Strauss und Pichler 1998). Die Länge der zurückgelegten Strecke wird als vektorielle Ausdehnung in x-Richtung hin zur verschwundenen Landmarke gemessen.

Selbst wenn nach der verschwundenen Landmarke für kurze Zeit eine Ablenkungslandmarke gezeigt wird, sind wildtypische Fliegen aufgrund ihres visuellen Arbeitsgedächtnisses in der Lage, wieder die Richtung der zuerst angesteuerten Landmarke einzunehmen. Voraussetzung hierbei ist, dass die Ablenkungslandmarke nur kurz zu sehen ist, sonst wird sie ab etwa 4s zur neuen Ziellandmarke im Gedächtnis. Das Vorhandensein dieses visuellen Orientierungsgedächtnisses kann mit Hilfe des *Detour*-Paradigmas untersucht werden. Nachdem die Fliege eine Landmarke ansteuert, wird im 90° Winkel zu jener eine Ablenklandmarke für ein bis zwei Sekunden präsentiert, welche die Fliege daraufhin anläuft. Dann verschwindet auch diese. Fliegen mit einem funktionierenden visuellen Arbeitsgedächtnis wenden sich in über 80% der Anläufe wieder der zuerst gezeigten Landmarke zu (Mronz 2004; Neuser et al. 2008). Während fast alle experimentellen Gruppen, in denen die synaptische Transmission der P-EN oder E-PG Neurone unterbunden wurde, sich zwar nicht signifikant für die zuerst gezeigte Landmarke entschieden, jedoch zumindest zufällige Entscheidungen zeigten, war diese Fähigkeit in den Gruppen nicht vorhanden, in welchen die verwendeten Treiber nicht nur in den P-EN Neuronen, sondern auch oder ausschließlich in den AOTU exprimierten (siehe Kapitel 3.7.3). Da die AOTUs für die Verarbeitung räumlicher Informationen benötigt werden (Timaeus et al. 2017), kann offenbar die Lage der Landmarken relativ zum Raum nicht korrekt abgespeichert werden, was das fehlende visuelle Arbeitsgedächtnis erklären würde.

Auch im *IODA* zeigten die Tiere ohne P-EN oder E-PG Aktivität einen Verlust des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses in der Testphase, während die Orientierungsfähigkeit durch Vibrationsvermeidung während dem Training erhalten blieb. Überraschenderweise konnte auch hier lediglich die experimentelle Gruppe, in welcher TNT mit Hilfe des Treibers R37F06-GAL4 in den P-EN Neuronen ohne AOTU-Expression getrieben wurde, im *IODA* getestet werden. Ähnlich wie in den visuellen Paradigmen, führte die Expression von TNT in den AOTUs, welche ebenfalls von den P-EN-Treibern R12D09-GAL4 und R13D05-GAL4 adressiert werden, sowie unter Verwendung des AOTU-Treibers R49E09-GAL4, zu einer nicht-Testbarkeit der Tiere im *IODA*. Eine Beteiligung der AOTUs an der Fähigkeit, sich ohne visuelle Stimuli zu orientieren, war bis heute nicht bekannt.

E-PG Neurone geben der Fliege über einen Anstieg der neuronalen Aktivität auf dem Ellipsoidkörper die Lage eines Zielobjektes im Raum wieder, während P-EN Neurone das Signal auf dem Ellipsoidkörper nach Zielobjektbewegung oder Eigendrehung der Fliege verschieben. Selbst wenn das Zielobjekt verschwindet, wird die neuronale Aktivität noch für > 40s aufrechterhalten (Seelig und Jayaraman 2015). Ohne visuelle Stimuli kann ein Richtungswechsel der laufenden Fliege erreicht werden, indem die neuronale Aktivität einiger E-PG Neurone künstlich induziert wird (Timaeus et al. 2017). Somit ist es wahrscheinlich, dass die Fliege das P-EN/E-PG Neuronensystem auch für die Orientierung in der Dunkelheit nutzt. Dabei scheint die unangenehme Vibration im *IODA* die visuelle Landmarke zu ersetzen.

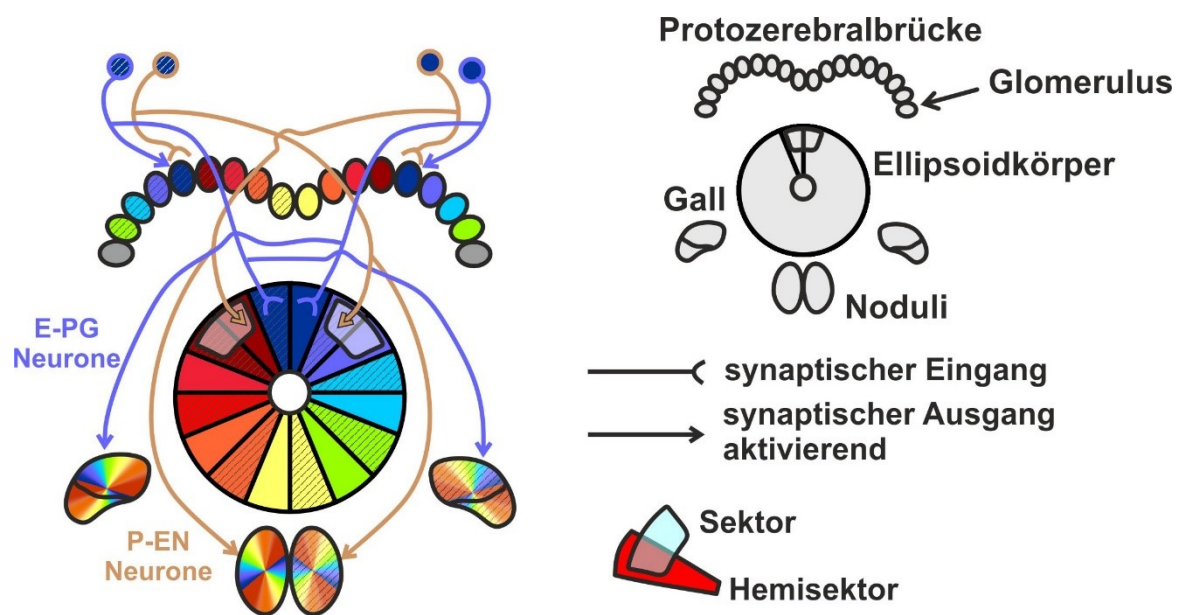


Abbildung 71: Beteiligte kolumnäre Neuronenklassen an der Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses. Sowohl E-PG Neurone, wie auch P-EN Neurone werden für die nicht-visuelle Orientierung benötigt. E-PG Neuronaktivität markiert ein Ziel im Raum auf distinkten Hemisektoren des EK. Die mit demselben Glomerulus der PB verschalteten P-EN Neurone sorgen über Innervierung der benachbarten Sektoren für ein stabiles Signal auf dem EK. Nach Eigenbewegung der Fliege wird über P-EN Neuronenaktivität das Signal entlang des EK verschoben, was zu einer Aktivierung der mit demselben Glomerulus verschalteten E-PG Neuronen führt und die neue, relative Lage des Ziels im Raum kodiert.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Aufklärung der Strukturen und Signalwege für die Ausbildung eines nicht-visuellen Orientierungsgedächtnisses in der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Diese Fähigkeit zur idiothetischen Orientierung ist nicht nur höheren Lebewesen, wie Mäusen oder Ratten vorbehalten, auch von Insekten, wie der Wüstenameise und der Biene, ist bekannt, dass sie über das Mittel der Vektorverrechnung einen Idealkurs einhalten können. Seit einiger Zeit steht auch *Drosophila* im Fokus der Forschung zur nicht-visuellen Orientierung.

Wir konnten über ein neu entwickeltes Paradigma (*Idiothetic Orientation in the Dark Assay*) neuronale Strukturen und Signalwege im Zentralkomplex der Taufliege bestimmen, welche für die Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses benötigt werden. Folgende Thesen können anhand der Ergebnisse bewiesen werden.

Die Fliege besitzt ein idiothetisches Orientierungsgedächtnis, welches ihr ermöglicht, sich ohne visuelle Landmarken, bzw. in völliger Dunkelheit im Raum zu orientieren. Dieses Verhalten ist unabhängig von magnetischen Feldern oder olfaktorischen Orientierungspunkten. Dabei wird das System der Pfadintegration verwendet, was es der Fliege ermöglicht, eine zuvor bestrafte Hälfte eines lichtfreien, homogenen Röhrchens für mindestens drei Minuten zu vermeiden. Für die Ausbildung dieses Orientierungsgedächtnisses wird die Durchleitungsfunktion des Ellipsoidkörpers in den Ringen R1, R2, R3d mit R3p, sowie wahrscheinlich R4d benötigt. Die Untersuchung der 2018 entdeckten Systeme R5 und R6 (Omoto et al. 2018) steht noch aus. Für die Orientierung im *IODA* unter Lichtbedingungen wird R3d zusammen mit R3p nicht benötigt. Die Genprodukte von *amnesiac*, *radish*, *ellipsoid body open*, *no receptor potential A*, *cryptochrome*, *rutabaga* und *dunce* sind in die nicht-visuelle Signalkaskade involviert. Nicht benötigt werden hingegen *period* und *ignorant*, wobei auch *amnesiac* keinen Einfluss auf die Orientierung im *IODA* unter Lichtbedingungen ausübt. Demnach ist es wahrscheinlich, dass sich idiothetisches und visuelles Orientierungsgedächtnis in ihren Signalwegen unterscheiden. Das idiothetische Orientierungsgedächtnis wird wahrscheinlich über den cAMP/PKA (zyklisches Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A) -Signalweg vermittelt, welcher *rut*-Adenylylzyklase und *dnc*-Phosphodiesterase 4 beinhaltet, während das visuelle Orientierungsgedächtnis zusätzlich den cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat)-Signalweg benötigt (Kuntz et al. 2017). Der sekundäre Botenstoff cGMP aktiviert die *foraging* Proteinkinase G (PKG) und die *ignorant* Ribosomale S6 Kinase II (RSKII). Da jedoch *ign*^{58/1} nicht für die idiothetische Orientierung benötigt wird, ist auch eine Involvierung des cGMP-Signalweges unwahrscheinlich. Die Modifizierung des cAMP-Spiegels zur Signaltransduktion findet über die *rut*-AC im Ringsystem R3m und R2, und der *dnc*-PDE4 im Ringsystem R3m oder R3d und R3p statt. *cryptochrome* ist essentiell in einem Subsystem des Ringsystems R4. CRY ist akut in die lichtunabhängige Etablierung des idiothetischen Orientierungsgedächtnisses eingebunden. Die kolumnären Neuronenklassen P-EN und E-PG (Protozerebralbrücke-zu-Ellipsoidkörper und Noduli bzw. Ellipsoidkörper-zu-Protozerebralbrücke und Gall) Neurone, sowie die AOTU, sind nicht nur im visuellen Arbeitsgedächtnis, sondern auch im nicht-visuellen Orientierungsgedächtnis entscheidend beteiligt. In der visuellen Orientierung nach Landmarken scheint jedoch nur ein Teil der AOTU eine Rolle zu spielen, die P-EN und E-PG Neurone werden dabei nicht benötigt.

6. Summary

The present study elucidates structures and signaling pathways involved in establishing a non-visual orientation memory in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. The ability for idiothetic orientation is not restricted to vertebrates, like mice and rats, but also insects, like desert ants or bees, use vector calculation for determining their heading. Recently, *Drosophila* came into the focus of research on non-visual orientation.

By developing a new paradigm (*Idiothetic Orientation in the Dark Assay*), we were able to determine neuronal structures and signaling pathways in the central complex of the fruit fly, that are needed for establishing an idiothetic orientation memory. The following theses can be substantiated.

The fly possesses an idiothetic orientation memory facilitating orientation without visual landmarks and in complete darkness. This behavior is independent of magnetic fields or olfactory cues. The fly uses the system of path integration to avoid the previously punished half of a featureless, dark tube, in which it resides for at least three minutes. For establishing this kind of orientation memory, signal transmission within the ellipsoid body is required by ring neuron systems R1 R2, R3d as well as R3p, and possibly by R4d.

The gene products of *amnesiac*, *radish*, *ellipsoid body open*, *no receptor potential A*, *cryptochrome*, *rutabaga* and *dunce* are involved in the signaling cascade for non-visual orientation. *period* and *ignorant* are not involved in idiothetic orientation in the *IODA*, nor is *amnesiac* in orientation under full-light conditions. Therefore, it is likely, that idiothetic and visual orientation memory differ in their signaling pathways. Evidence is provided, that the idiothetic orientation memory is mediated by the cAMP/PKA (cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A) -signaling pathway, which comprises *rut-Adenylyl cyclase* and *dnc-Phosphodiesterase 4*, whereas the visual orientation requires additionally cGMP (cyclic guanosine monophosphate) -signaling. The second messenger cGMP activates *foraging* protein kinase G (PKG) and *ignorant* ribosomal S6 kinase II (RSKII). However, since *ign^{58/1}* is not involved in idiothetic orientation memory, a contribution of the entire cGMP-pathway is unlikely. The modification of cAMP-level for signal transduction is achieved by *rut-AC* in the ringneuron systems R3m and R2 and by *dnc-PDE4*; in the ring systems R3m or R3d and R3p, *cryptochrome* is essential in one of the subsystems of R4. CRY is critically involved in the acute and light- independent establishment of the idiothetic orientation memory. Two classes of columnar neurons, P-EN and E-PG neurons, as well as the AOTU, are not only crucial for the visual working memory, but also for the non-visual orientation memory. For visual orientation towards visible landmarks, just one part of the AOTU seems to play a role, whereas P-EN, E-PG neurons, or other parts of the AOTU, are not required.

7. Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

- Ahmad M, Cashmore AR (1993) *HY4* gene of *A. thalia* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366:162–166
- Anagnostou E, Skarlatou V, Mergner T, Anastasopoulos D (2018) Idiopathic signal processing and spatial orientation in patients with unilateral hippocampal sclerosis. *J Neurophysiol* 120:1256–1263. doi: 10.1152/jn.00016.2018
- Armstrong JD, Belle JSd, Wang Z (1998) Metamorphosis of the Mushroom Bodies; Large-Scale Rearrangements of the Neural Substrates for Associative Learning and Memory in *Drosophila*. *Learn Mem*:102–114
- Ashmore LJ, Sehgal A (2003) A Fly's Eye View of Circadian Entrainment. *J Biol Rhythms* 18:206–216
- Benzer S (1967) Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Genetics* 58:1112–1119
- Beugnon G, Campan R (1989) Homing in the field cricket, *Gryllus campestris*. *Journal of Insect Behavior* 2:187–198
- Bloomquist BT, Shortridge RD, Schneuwly S, Perdew M, Montell C, Steller H, Rubin GM, Pak WL (1988) Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell* 54:723–733
- Brand A, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:404–415
- Bundel D de, Gangarossa G, Biever A, Bonnefont X, Valjent E (2013) Cognitive dysfunction, elevated anxiety, and reduced cocaine response in circadian clock-deficient *cryptochrome* knockout mice. *Front Behav Neurosci* 7:e152. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00152
- Busza A, Emery-Le i, Rosbash M, Emery P (2004) Roles of the two *Drosophila* cryptochrome structural domains in circadian photoreception. *Science* 304:1503–1506. doi: 10.1126/science.1096973
- Calton JL, Stackman RW, Goodridge JP, Archey WB, Dudchenko PA, Taube J (2003) Hippocampal Place Cell Instability after Lesions of the Head Direction Cell Network. *The Journal of Neuroscience* 23:9719–9731
- Ceriani MF (1999) Light-Dependent Sequestration of timeless by cryptochrome. *Science* 285:553–556. doi: 10.1126/science.285.5427.553
- Ceriani MF, Hogenesch JB, Yanovsky M, Panda S, Straume M, Kay SA (2002) Genome-Wide Expression Analysis in *Drosophila* reveals Genes Controlling Circadian Behavior. *The Journal of Neuroscience* 22:9305–9319
- Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen L-O, van der Horst, G. T. J., Batschauer A, Ahmad M (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol* 62:335–364. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103759
- Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499:295–300. doi: 10.1038/nature12354

- Chittka L, Kunze J, Shipman C, Buchmann SL (1995) The Significance of Landmarks for Path Integration in Homing Honeybee Foragers. *Naturwissenschaften* 82:341–343. doi: 10.1007/s001140050195
- Chittka L, Williams NM, Rasmussen H, Thomson J.D. (1999) Navigation without vision: bumblebee orientation in complete darkness. *Proceedings of the Royal Society of London B* 266:45–50
- Clark R, Reinagel P, Broadbent NJ, Flister ED, Squire LR (2011) Intact performance on feature-ambiguous discriminations in rats with lesions of the perirhinal cortex. *Neuron* 70:132–140. doi: 10.1016/j.neuron.2011.03.007
- Collett M, Chittka L, Collett TS (2013) Spatial Memory in Insect Navigation. *Curr Biol* 23:789–800. doi: 10.1016/j.cub.2013.07.020
- Dahmann C (2008) *Drosophila*- Methods and Protocols. Human Press (Springer Science and Business Media)
- Daiker V, Häder D-P, Richter PR, Lebert M (2011) The involvement of a protein kinase in phototaxis and gravitaxis of *Euglena gracilis*. *Planta* 233:1055–1062. doi: 10.1007/s00425-011-1364-5
- Damulewicz M, Mazzotta GM, Sartori E, Rosato E, Costa R, Pyza EM (2017) Cryptochrome Is a Regulator of Synaptic Plasticity in the Visual System of *Drosophila melanogaster*. *Front Mol Neurosci* 10:e265. doi: 10.3389/fnmol.2017.00165
- Davis RL (2005) Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci* 28:275–302
- Davis RL (2011) Traces of *Drosophila* memory. *Neuron* 70:8–19. doi: 10.1016/j.neuron.2011.03.012
- Davis RL, Kiger JA (1981) *dunce* mutants of *Drosophila melanogaster*: mutants defective in the cyclic AMP phosphodiesterase enzyme system. *The Journal of Cell Biology* 90:101–107
- Davis GW, Schuster CM, Goodman CS (1996) Genetic Dissection of Structural and Functional Components of Synaptic Plasticity. III. CREB Is Necessary for Presynaptic Functional Plasticity. *Neuron* 17:669–679. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80199-3
- de Belle J, Heisenberg M (1996) Biological Sciences Expression of *Drosophila* mushroom body mutations in alternative genetic backgrounds: a case study of the mushroom body miniature gene (*mbm*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9875–9880
- Delgado R, Davis R, Bono MR, Latorre R, Labarca P (1998) Outward Currents in *Drosophila* Larval Neurons: *dunce* Lacks a Maintained Outward Current Component Downregulated by cAMP. *Journal of Neuroscience* 18:1399–1407
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su K-C, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448:151–156. doi: 10.1038/nature05954
- Dissel S, Codd V, Fedic R, Garner KJ, Costa R, Kyriacou CP, Rosato E (2004) A constitutively active cryptochrome in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* 7:834–840. doi: 10.1038/nn1285
- Dolezelova E, Dolezel D, Hall JC (2007) Rhythm Defects Caused by Newly Engineered Null Mutations in *Drosophila*'s *cryptochrome* Gene. *Genetics* 177:329–345. doi: 10.1534/genetics.107.076513
- Drain P, Folkers E, Quinn WG (1991) cAMP-Dependent Protein Kinase and the Disruption of Learning in Transgenic Flies. *Neuron* 6:71–82

- Dudai Y (1983) Mutations affect storage and use of memory differentially in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A 80:5445–5448
- Dudai Y (2002) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. Curr Opin Neurobiol 12:211–216
- Dudai Y, Yuh-Nuhg Y, Byers D, Quinn WG, Benzer S (1976) *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. Proc Natl Acad Sci U S A 73:1684–1688
- Duffy J (2002) GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. Genesis 34:1–15
- Durier V, Ruvault C (1999) Path integration in cockroach larvae, *Blattella germanica* (L.) (insect: Dictyoptera): Direction and distance estimation. Animal Learning and Behavior 27:108–118
- Edery I, Zwiebel LJ, Dembinska M, Rosbash M (1994) Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. Proc Natl Acad Sci U S A 91:2260–2264
- El Jundi B, Pfeiffer K, Heinze S, Homberg U (2014) Integration of polarization and chromatic cues in the insect sky compass. Journal of Comparative Physiology. A 200:575–589. doi: 10.1007/s00359-014-0890-6
- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M (1998) CRY, a *Drosophila* Clock and Light-Regulated Cryptochrome, Is a Major Contributor to Circadian Rhythm Resetting and Photosensitivity. Cell 95:669–679. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81637-2
- Emery P, Rosbash M, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall J (2000) *Drosophila* CRY Is a Deep Brain Circadian Photoreceptor. Neuron 26:493–504. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81181-2
- Feany MB, Quinn WG (1995) A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. Science 268:869–873
- Fischer J, Giniger E, Maniatis T, Ptashne M (1988) GAL4 activates transcription in *Drosophila*. Nature 332:853–856
- Flethe S (2018) Analyse von Aufmerksamkeit und Entscheidungsprozessen als Eigenschaften eines visuellen Kurzzeitintegrators bei *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Johannes Gutenberg Universität
- Folkers E, Waddell S, Quinn WG (2006) The *Drosophila radish* gene encodes a protein required for anesthesia-resistant memory. Proc Natl Acad Sci U S A 103:17496–17500.
- Foucaud J, Burns JG, Mery F (2010) Use of spatial information and search strategies in a water maze analog in *Drosophila melanogaster*. Public Library of Science (PloS ONE) 5:e15231. doi: 10.1371/journal.pone.0015231
- Frankel R (1983) Heterosis: Reappraisal of Theory and Practice. Springer Verlag, Berlin
- Gallistel CR (1990) The Organization of Learning. Animal Behaviour 43:e357
- Gegear RJ, Casselman A, Waddell S, Reppert SM (2008) Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. Nature 454:1014–1018. doi: 10.1038/nature07183
- Gegear RJ, Foley LE, Casselman A, Reppert SM (2010) Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. Nature 463:804–807. doi: 10.1038/nature08719
- Gong ZF, Xia SZ, Liu L, Feng CH, Guo AK (1998) Operant visual learning and memory in *Drosophila* mutants *dunce*, *amnesiac* and *radish*. Journal of Insect Physiology 44:1149–1158
- Götz K (1980) Visual Guidance in *Drosophila*. Basic life science 16:391–407

- Green J, Maimon G (2018) Building a heading signal from anatomically defined neuron types in the *Drosophila* central complex. *Curr Opin Neurobiol* 52:156–164. doi: 10.1016/j.conb.2018.06.010
- Green J, Adachi A, Shah KK, Hirokawa JD, Magani PS, Maimon G (2017) A neural circuit architecture for angular integration in *Drosophila*. *Nature* 546:101–106. doi: 10.1038/nature22343
- Guan Z, Buhl LK, Quinn WG, Littleton JT (2011) Altered gene regulation and synaptic morphology in *Drosophila* learning and memory mutants. *Learn Mem* 18:191–206. doi: 10.1101/lm.2027111
- Guo C, Du Y, Yuan D, Li M, Gong H, Gong Z, Liu L (2014) A conditioned visual orientation requires the ellipsoid body in *Drosophila*. *Learn Mem* 22:56–63. doi: 10.1101/lm.036863.114
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M-B, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801–806. doi: 10.1038/nature03721
- Hanai S, Ishida N (2009) Entrainment of *Drosophila* circadian clock to green and yellow light by Rh1, Rh5, Rh6 and CRY. *Neuroreport* 20:755–758. doi: 10.1097/WNR.0b013e32832a7c4e
- Hanesch U, Fischbach K-F, Heisenberg M (1989) Neuronal Architecture of the Central Complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 257:343–366
- Hartmann G, Wehner R (1995) The ant's path integration system: a neural architecture. *Biological Cybernetics* 73:483–497
- Hawkins RD, Kandel ER, Siegelbaum SA (1993) Learning to Modulate Transmitter Release: Themes and Variations in Synaptic Plasticity. *Annu Rev Neurosci* 16:625–666. doi: 10.1146/annurev.neuro.16.1.625
- Hebb DO (1949) *Organisation of Behavior*, 1st edn. Psychology Press
- Heisenberg M (2003) Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature Reviews Neuroscience* 4:266–275. doi: 10.1038/nrn1074
- Helfrich-Förster C (2002) The circadian system of *Drosophila melanogaster* and its light input pathways. *Zoology (Jena)* 105:297–312. doi: 10.1078/0944-2006-00074
- Hironaka M, Nomakuchi S, Filippi L, Tojo S, Horiguchi H, Hariyama T (2003) The directional homing behaviour of the subsocial shield bug, *Parastrachia japonensis* (Heteroptera: Cydnidae), under different photic conditions. *Zool Sci* 20:423–428. doi: 10.2108/zsj.20.423
- Hironaka M, Filippi L, Nomakuchi S, Horiguchi H, Hariyama T (2007) Hierarchical use of chemical marking and path integration in the homing trip of a subsocial shield bug. *Animal Behaviour* 73:739–745. doi: 10.1016/j.anbehav.2006.06.009
- Homberg U, Hofer S, Pfeiffer K, Gebhardt S (2003) Organization and neural connections of the anterior optic tubercle in the brain of the locust, *Schistocerca gregaria*. *J Comp Neurol* 462:415–430. doi: 10.1002/cne.10771
- Jenett A, Rubin GM, Ngo T-TB, Shepherd D, Murphy C, Dionne H, Pfeiffer BD, Cavallaro A, Hall D, Jeter J, Iyer N, Fetter D, Hausenfluck JH, Peng H, Trautman ET, Svirskas RR, Myers EW, Iwinski ZR, Aso Y, DePasquale GM, Enos A, Hulamm P, Lam SCB, Li H-H, Lavery TR, Long F, Qu L, Murphy SD, Rokicki K, Safford T, Shaw K, Simpson JH, Sowell A, Tae S, Yu Y, Zugates CT (2012) A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell Rep* 2:991–1001. doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.011
- Kandel ER, Abrams T, Bernier L, Carew TJ, Hawkins RD, Schwartz JH (1983) Classical conditioning and sensitization share aspects of the same molecular cascade in *Aplysia*. *Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology* 48:821–830

- Kim S, Rouault H, Druckmann S, Jayaraman V (2017) Ring attractor dynamics in the *Drosophila* central brain. *Science* 356:849–853. doi: 10.1126/science.aal4835
- Kim IS, Dickinson MH (2017) Idiopathic Path Integration in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 27:2227–2238. doi: 10.1016/j.cub.2017.06.026
- Kimchi T, Etienne AS, Terkel J (2004) A subterranean mammal uses the magnetic compass for path integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1105–1109
- Kirschvink J, Walker M, Diebel CE (2001) Magnetite-based magnetoreception. *Curr Opin Neurobiol* 11:462–467
- Krause T (2015) Physiologie eines erlernten Körpermodells in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Johannes Gutenberg Universität
- Krause T, Spindler L, Poeck B, Strauss R (2019) *Drosophila* Acquires a Long-Lasting Body-Size Memory from Visual Feedback. *Curr Biol* 29:1833–1841
- Krause HM, Klemenz R, Gehring WJ (1988) Expression, modification, and localization of the *fushi tarazu* protein in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 2:1021–1036
- Kropff E, Carmichael JE, Moser M-B, Moser EI (2015) Speed cells in the medial entorhinal cortex. *Nature* 523:419–424. doi: 10.1038/nature14622
- Kuntz S (2015) Analyse biochemischer Signalwege eines visuellen Orientierungsgedächtnisses von *Drosophila*. Dissertation, Johannes Gutenberg Universität
- Kuntz S, Poeck B, Sokolowski MB, Strauss R (2012) The visual orientation memory of *Drosophila* requires Foraging (PKG) upstream of Ignorant (RSK2) in ring neurons of the central complex. *Learn Mem* 19:337–340. doi: 10.1101/lm.026369.112
- Kuntz S, Poeck B, Strauss R (2017) Visual Working Memory Requires Permissive and Instructive NO/cGMP Signaling at Presynapses in the *Drosophila* Central Brain. *Curr Biol* 27:613–623
- Lagercrantz H, Hanson MA, Ment LR, Peebles DM (eds) (2010) *The Newborn Brain: Neuroscience and Clinical Applications*. Cambridge University Press, Cambridge
- Lee T, Luo L (1999) Mosaic Analysis with a Repressible Neurotechnique Cell Marker for Studies of Gene Function in Neuronal Morphogenesis. *Neuron* 22:451–461
- Lee P-T, Lin H-W, Chang Y-H, Fu T-F, Dubnau J, Hirsh J, Lee T, Chiang A-S (2011) Serotonin-mushroom body circuit modulating the formation of anesthesia-resistant memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13794–13799. doi: 10.1073/pnas.1019483108
- Lendor AJ, Walcott C (1983) Homing pigeon navigation: The effect of in flight exposure to a varying magnetic field. *Comparative Biochemic Physiology* 76A:665–671
- Levin LR, Han P-L, Hwang PM, Feinstein PG, Davis RL, Reed RR (1992) The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* 68:479–489
- Liedvogel M, Maeda K, Henbest K, Schleicher E, Simon T, Timmel CR, Hore PJ, Mouritsen H (2007) Chemical Magnetoreception: Bird Cryptochrome 1a is Excited by Blue Light and Forms Long-Lived Radical-Pairs. *Public Library of Science (PloS ONE)* 2:e1106. doi: 10.1371/journal.pone.0001106
- Lin J-M, Schroeder A, Allada R (2005) In vivo circadian function of casein kinase 2 phosphorylation sites in *Drosophila* PERIOD. *The Journal of Neuroscience* 25:11175–11183. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2159-05.2005
- Lin C-Y, Chuang C-C, Hua T-E, Chen C-C, Dickson BJ, Greenspan RJ, Chiang A-S (2013) A comprehensive wiring diagram of the protocerebral bridge for visual information

- processing in the *Drosophila* brain. *Cell Rep* 3:1739–1753. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.022
- Lin DM, Goodman CS (1994) Ectopic and increased expression of fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* 13:507–523
- 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. doi: 10.1038/nature04381
- Livingstone MS, Tempel BL (1983) Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. *Nature* 303:67–70
- Maeda K, Robinson A, Henbesta K, Hogbenb H, Biskupb T, Ahmadd A, Hore P (2012) Magnetically sensitive light-induced reactions in cryptochrome are consistent with its proposed role as a magnetoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4774–4779
- Markowitsch, H.-J. (2005) *Dem Gedächtnis auf der Spur*, 2nd edn. Primus, Darmstadt
- Martin J-R, Raabe T, Heisenberg M (1999) Central complex substructures are required for the maintenance of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 185:277–288. doi: 10.1007/s003590050387
- Martín-Peña A, Acebes A, Rodríguez J-R, Chevalier V, Casas-Tinto S, Triphan T, Strauss R, Ferrús A (2014) Cell types and coincident synapses in the ellipsoid body of *Drosophila*. *Eur J Neurosci* 39:1586–1601. doi: 10.1111/ejn.12537
- Masse NY, Turner GC, Jefferis, G. S. X. E. (2009) Olfactory information processing in *Drosophila*. *Curr Biol* 19:700–713. doi: 10.1016/j.cub.2009.06.026
- Matsumoto H, O'Tousa JE, Pak WL (1982) Light-induced modification of *Drosophila* retinal polypeptides in vivo. *Science* 217:839--841
- Mazzotta G, Rossi A, Leonardi E, Mason M, Bertolucci C, Caccin L, Spolaore B, Martin AJM, Schlichting M, Grebler R, Helfrich-Förster C, Mammi S, Costa R, Tosatto SCE (2013) Fly cryptochrome and the visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6163–6168. doi: 10.1073/pnas.1212317110
- Miller CA, Sweatt JD (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53:857–869. doi: 10.1016/j.neuron.2007.02.022
- Moore M, DeZazzo J, Luk AY, Tully T, Singh CM, Heberlein U (1998) Ethanol Intoxication in *Drosophila*: Genetic and Pharmacological Evidence for Regulation by the cAMP Signaling Pathway. *Cell* 93:997–1007
- Morris M (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 11:47–60
- Moser EI, Roudi Y, Witter MP, Kentros C, Bonhoeffer T, Moser M-B (2014) Grid cells and cortical representation. *Nature Reviews Neuroscience* 15:466--481
- Mota T, Yamagata N, Giurfa M, Gronenberg W, Sandoz J-C (2011) Neural Organization and Visual Processing in the Anterior Optic Tubercle of the Honeybee Brain. *J Neurosci* 31:11443–11456. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0995-11.2011
- Mronz M (2004) Die Untersuchung der visuell motivierten Objektwahl von laufenden Taufliiegen - Modellbildung und Implementierung auf einem Roboter. Dissertation, Julius-Maximilians Universität
- Müller M, Wehner R (1988) Path integration in desert ants, *Cataglyphis fortis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5287–5290
- Müller, Werner, Frings (eds) (2015) *Tier- und Humanphysiologie: Eine Einführung*, 5th edn. Springer Verlag, Berlin Heidelberg

- Neuser K (2012) Neuronale Netzwerke des Zentralkomplexes und ein räumliches Arbeitsgedächtnis in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Johannes Gutenberg Universität
- Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R (2008) Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* 453:1244–1247. doi: 10.1038/nature07003
- Ni J-Q, Markstein M, Binari R, Pfeiffer B, Liu L-P, Villalta C, Booker M, Perkins L, Perrimon N (2008) Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nature Methods* 5:49–51
- Ni J-Q, Liu L-P, Binari R, Hardy R, Shim H-S, Cavallaro A, Booker M, Pfeiffer BD, Markstein M, Wang H, Villalta C, Lavery TR, Perkins LA, Perrimon N (2009) A *Drosophila* resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics. *Genetics* 182:1089–1100. doi: 10.1534/genetics.109.103630
- Ni JD, Baik L, Holmes TC, Montell C (2017) A rhodopsin in the brain functions in circadian photoentrainment in *Drosophila*. *Nature* 545:340–344. doi: 10.1038/nature22325
- Nighorn A, Healy MJ, Davis RL (1991) The Cyclic AMP Phosphodiesterase Encoded by the *Drosophila dunce* Gene is Concentrated in the Mushroom Body Neuropil. *Neuron* 6:455–567
- Ofstad TA, Zuker CS, Reiser MB (2011) Visual place learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 474:204–207. doi: 10.1038/nature10131
- Okano S, Kanno S, Takao M, Eker APM, Isono K, Tsukahara Y, Yasui A (1999) A Putative Blue-Light Receptor From *Drosophila melanogaster*. *Photochemistry and Photobiology* 69:108–113
- O'Keefe J (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology* 51:78–109
- O'Keefe J., Nadel L (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press, Oxford
- Omoto JJ, Keleş MF, Nguyen B-CM, Bolanos C, Lovick J, Frye MA, Hartenstein V (2017) Visual Input to the *Drosophila* Central Complex by Developmentally and Functionally Distinct Neuronal Populations. *Curr Biol* 27:1098–1110. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.063
- Omoto JJ, Nguyen B-CM, Kandimalla P, Lovick J, Donlea JM, Hartenstein V (2018) Neuronal Constituents and Putative Interactions Within the *Drosophila* Ellipsoid Body Neuropil. *Frontiers in Neural Circuits* 12. doi: 10.3389/fncir.2018.00103
- Osorio D, Vorobyev M (2008) A review of the evolution of animal colour vision and visual communication signals. *Vision Res* 48:2042–2051. doi: 10.1016/j.visres.2008.06.018
- Ozturk N, VanVickle-Chavez SJ, Akileswaran L, van Gelder RN, Sancar A (2013) Ramshackle (*Brwd3*) promotes light-induced ubiquitylation of *Drosophila* Cryptochrome by DDB1-CUL4-ROC1 E3 ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4980–4985. doi: 10.1073/pnas.1303234110
- Pawlow I (1923) New researches on conditioned reflexes. *Science* 58:359–361
- Pereanu W, Younossi-Hartenstein A, Lovick J, Spindler S, Hartenstein V (2011) Line-age-based analysis of the development of the central complex of the *Drosophila* brain. *J Comp Neurol* 519:661–689. doi: 10.1002/cne.22542.
- Pfeiffer BD, Jenett A, Hammonds AS, Ngo T-TB, Misra S, Murphy C, Scully A, Carlson JW, Wan KH, Lavery TR, Mungall C, Svirskas R, Kadonaga JT, Doe CQ, Eisen MB, Celniker SE, Rubin GM (2008) Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9715–9720. doi: 10.1073/pnas.0803697105
- Pfeiffer BD, Ngo T-TB, Hibbard KL, Murphy C, Jenett A, Truman JW, Rubin GM (2010) Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics* 186:735–755

- Picot M, Cusumano P, Klarsfeld A, Ueda R, Rouyer F (2007) Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock. Public Library of Science (PloS biology) 5:e315. doi: 10.1371/journal.pbio.0050315
- Pooam M, Arthaut L-D, Burdick D, Link J, Martino CF, Ahmad M (2019) Magnetic sensitivity mediated by the *Arabidopsis* blue-light receptor cryptochrome occurs during flavin reoxidation in the dark. *Planta* 249:319–332. doi: 10.1007/s00425-018-3002-y
- Putz G, Heisenberg M (2002) Memories in *Drosophila* Heat-box Learning. *Learn Mem* 9:349–359. doi: 10.1101/lm.50402
- 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. *The Journal of Neuroscience* 24:9745–9751. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3211-04.2004
- Qin S, Yin H, Yang C, Dou Y, Liu Z, Zhang P, Yu H, Huang Y, Feng JH, Junfeng H, Jia H, Deng L, Yan X, Dong X, Zhao Z, Jiang T, Wang H-W, Luo S-J, Xie C (2015) A magnetic protein biocompass. *Nat Mater* 15:217-226. doi: 10.1038/nmat4484
- Quinn W, Sziber PP., Booker R. (1979) The *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Nature* 277:212–214
- Rank JB (1984) Head direction cells in the deep cell layer of dorsal presubiculum in freely moving rats. *Journal of Neuroscience*
- Renn S, Yang M, Wang Z, Kaiser K (1999) Genetic Analysis of the *Drosophila* Ellipsoid Body Neuropil: Organization and Development of the Central Complex. *Journal of Neurobiology* 41:198–207
- Ries A (2011) Einflussparameter auf Kletterentscheidungen der Taufliege *Drosophila melanogaster*, Johannes Gutenberg Universität
- Ritz T, Wiltschko R, Hore P, Rodgers C, Stapput K, Thalau P, Wiltschko W (2009) Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophysical Journal* 96:3451–3457
- Ronacher B (2008) Path integration as the basic navigation mechanism of the desert ant *Cataglyphis fortis* (Forel, 1902)(Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News* 11:53–62
- Rosato E., Codd V., Mazzotta G., Piccin A., Zordan M., Costa R., Kyriacou CP. (2001) Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Curr Biol* 11:909–917
- Sakai T, Tamura T, Kitamoto T, Kidokoro Y (2004) A clock gene, *period*, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16058–16063
- Sancar A (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical Reviews* 103:2203–2237
- Sathyanarayanan S, Zheng X, Kumar S, Chen C-H, Chen D, Hay B, Sehgal A (2008) Identification of novel genes involved in light-dependent CRY degradation through a genome-wide RNAi screen. *Genes Dev* 22:1522–1533. doi: 10.1101/gad.1652308
- Schlichting M, Rieger D, Cusumano P, Grebler R, Costa R, Mazzotta GM, Helfrich-Förster C (2018) Cryptochrome Interacts With Actin and Enhances Eye-Mediated Light Sensitivity of the Circadian Clock in *Drosophila melanogaster*. *Front Mol Neurosci* 11:e238. doi: 10.3389/fnmol.2018.00238
- Scholz H, Ramond J, Singh CM, Heberlein U (2000) Functional Ethanol Tolerance in *Drosophila*. *Neuron* 28:261–271. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00101-X
- Seelig JD, Jayaraman V (2013) Feature detection and orientation tuning in the *Drosophila* central complex. *Nature* 503:262–266. doi: 10.1038/nature12601

- Seelig JD, Jayaraman V (2015) Neural dynamics for landmark orientation and angular path integration. *Nature* 521:186–191. doi: 10.1038/nature14446
- Seyffert W (2003) Lehrbuch der Genetik. In: Seyffert W (ed) Lehrbuch der Genetik. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin
- Shieh BH, Niemeyer B (1995) A novel protein encoded by the *InaD* gene regulates recovery of visual transduction in *Drosophila*. *Neuron* 14:201–210
- Shiozaki HM, Kazama H (2017) Parallel encoding of recent visual experience and self-motion during navigation in *Drosophila*. *Nat Neurosci* 20:1395–1403. doi: 10.1038/nn.4628
- Skaggs W, Knierim J, Kudrimoti H, McNaughton B (1995) A model of the neural basis of the rat's sense of direction. *Advances in neural information processing systems* 7:173–180
- Skinner BF (1958) Teaching Machines. *Science* 3330:969–977
- Solstad T, Boccara CN, Kropff E, Moser M-B, Moser EI (2008) Representation of Geometric Borders in the Entorhinal Cortex. *Science* 322:1865–1868
- Srinivasan MV (2015) Where paths meet and cross: navigation by path integration in the desert ant and the honeybee. *Journal of Comparative Physiology. A* 201:533–546. doi: 10.1007/s00359-015-1000-0
- Stackman RW., Taube J (1997) Firing Properties of Rat Lateral Mammillary Single Units: Head Direction, Head Pitch, and Angular Head Velocity. *The Journal of Neuroscience* 17:4349–4358
- Stackman RW., Taube J (1998) Firing properties of rat lateral mammillary single units: head direction, head pitch, and angular head velocity. *The Journal of Neuroscience* 18:9020–9037
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC (1998) The *cry^b* Mutation Identifies Cryptochrome as a Circadian Photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95:681–692
- Steiof N (2018) Automatisierung eines Verhaltensparadigmas zur Analyse des visuellen Ortsgedächtnisses von *Drosophila melanogaster* und Untersuchungen der Rolle des Ellipsoidkörpers für diesen. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität
- Stoleru D, Peng Y, Nawathean P, Rosbash M (2005) A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature* 438:238–242. doi: 10.1038/nature04192
- Strauss R (2002) The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 12:633–638. doi: 10.1016/S0959-4388(02)00385-9
- Strauss R, Heisenberg M (1993) A Higher Control Center of Locomotor Behavior in the *Drosophila* Brain. *The Journal of Neuroscience* 13:1852–1861. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-05-01852.1993
- Strauss R, Pichler J (1998) Persistence of orientation toward a temporarily invisible landmark in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology. A* 182:411–423. doi: 10.1007/s003590050190
- Strauss R, Hanesch U, Kinkelin M, Wolf R, Heisenberg M (1992) No-bridge of *Drosophila melanogaster*: portrait of a structural brain mutant of the central complex. *Journal of Neurogenetics* 8:125–155
- Stüven T, Hartmann E, Görlich D (2003) Exportin 6: A novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes. *The European Molecular Biology Organisation* 22:5928–5940

- Sweeney ST, Broadie K, Keane J, Niemann H, O'Kane CJ (1995) Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14:341–351
- Szular J, Sehadova H, Gentile C, Szabo G, Chou WH, Britt SG, Stanewsky R (2012) Rhodopsin 5- and Rhodopsin 6-Mediated Clock Synchronization in *Drosophila melanogaster* Is Independent of Retinal Phospholipase C- β Signaling. *J Biol Rhythms* 27:25–36
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly W, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Mello C (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99:123–132
- Tang S, Juusola M (2012) A magnetic protein biocompass. *Public Library of Science (PloS ONE)* 5
- Taube J, Muller R, Ranck JB. Jr (1990) Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. Effects of environmental manipulations. *The Journal of Neuroscience* 10:436–447
- Taube JS (2007) The head direction signal: origins and sensory-motor integration. *Annu Rev Neurosci* 30:181–207. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112854
- Tempel BL, Bonini N, Dawson DR, Quinn WG (1983) Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1482–1486
- Thran J (2013) Ein räumliches Orientierungsgedächtnis im Zentralkomplex von *Drosophila melanogaster* und die spezifische Rolle von *ellipsoid-body-open*. Dissertation, Johannes Gutenberg Universität
- Timaevs L, Geid L, Hummel T (2017) A topographic visual pathway into the central brain of *Drosophila*. *bioRxiv*. doi: 10.1101/183707
- Triphan T, Poeck B, Neuser K, Strauss R (2010) Visual targeting of motor actions in climbing *Drosophila*. *Curr Biol* 20:663–668. doi: 10.1016/j.cub.2010.02.055
- Tully T, Quinn WG (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A* 157:263–277. doi: 10.1007/BF01350033
- Turner-Evans DB, Wegener S, Roualt H, Franconville R, Wolff T, Seelig JD, Druckmann S, Jayaraman V (2017) Angular velocity integration in a fly heading circuit. *eLife* 6:e23496
- van Huizen R, Miller K, Chen DM, Li Y, Lai ZC, Raab RW, Stark WS, Shortridge RD, Li M (1998) Two distantly positioned PDZ domains mediate multivalent INAD-phospholipase C interactions essential for G protein-coupled signaling. *The European Molecular Biology Organisation* 17:2285--2297
- Waddell S, Quinn WG (2001) What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends in Genetics* 17:719–726
- Walker M, Diebel CE, Haugh CV, Pankhurst PM, Montgomery JC, Green CR (1997) Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature* 390:371–376. doi: 10.1038/37057
- Wehner R, Wehner S (1986) Path Integration in Desert Ants. Approaching a Long-Standing Puzzle in Insect Navigation. *Monitore Zoologico Italiano - Italian Journal of Zoology* 20:309–331
- Wiltschko W (1972) The influence of magnetic total intensity and inclination on directions preferred by migrating European robins (*Erithacus rubecula*). *NASA Technical Reports Server*:569–578
- Wiltschko R, Wiltschko W (2006) Magnetoreception. *Bioessays* 28:157–168. doi: 10.1002/bies.20363

- Winter SS, Mehlman ML, Clark BJ, Taube JS (2015) Passive Transport Disrupts Grid Signals in the Parahippocampal Cortex. *Curr Biol* 25:2493–2502. doi: 10.1016/j.cub.2015.08.034
- Wolff T, Iyer NA, Rubin GM (2015) Neuroarchitecture and neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: A GAL4-based dissection of protocerebral bridge neurons and circuits. *J Comp Neurol* 523:997–1037. doi: 10.1002/cne.23705
- Wustmann G, Rein K, Wolf R, Heisenberg M (1996) A new paradigm for operant conditioning of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A* 179:429–436. doi: 10.1007/BF00194996
- Xie X, Tabuchi M, Brown M, Mitchell S, Wu M, Kolodkin A (2017) The laminar organization of the *Drosophila* ellipsoid body is semaphorindependent and prevents the formation of ectopic synaptic connections. *eLife* 6:e25328. doi: 10.7554/eLife.25328.001
- Yang C, Li L (2017) Hormonal Regulation in Shade Avoidance. *Front Plant Sci* 8:e1527. doi: 10.3389/fpls.2017.01527
- Yoshii T, Todo T, Wülbeck C, Stanewsky R, Helfrich-Förster C (2008) Cryptochrome is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila's* clock neurons. *J Comp Neurol* 508:952–966. doi: 10.1002/cne.21702
- Yoshii T, Ahmad M, Helfrich-Förster C (2009) Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of *Drosophila's* circadian clock. *Public Library of Science (PloS biology)* 7:813-819. doi: 10.1371/journal.pbio.1000086
- Yoshii T, Hermann C, Helfrich-Förster C (2010) Cryptochrome-positive and -negative clock neurons in *Drosophila* entrain differentially to light and temperature. *J Biol Rhythms* 25:387–398. doi: 10.1177/0748730410381962
- Young JM, Armstrong JD (2010) Building the central complex in *Drosophila*: The generation and development of distinct neural subsets. *J Comp Neurol* 518:1525–1541. doi: 10.1002/cne.22285
- Yuan Q, Lin F, Zheng X, Sehgal A (2005) Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. *Neuron* 47:115–127. doi: 10.1016/j.neuron.2005.05.027
- Zars T, Fischer M, Schulz R, Heisenberg M (2000) Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288:672–675. doi: 10.1126/science.288.5466.672
- Zhu L, McKay RR, Shortridge RD (1993) Tissue-specific expression of phospholipase C encoded by the *norpA* gene of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* 268:15994--16001.

7.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gehirns von <i>Drosophila</i> | 3 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung von Protozerebralbrücke, Ellipsoidkörper, Gall und Noduli | 6 |
| Abbildung 3: Synaptische Ein- und Ausgänge kolumnärer Neurone | 7 |
| Abbildung 4: Laterale und globale Inhibition | 8 |
| Abbildung 5: Die über P-EN Neurone vermittelte Rotation des Kurssignals auf dem EK. | 10 |
| Abbildung 6: Die Koinzidenzdetektion..... | 13 |
| Abbildung 7: Schematischer Aufbau von dCRY | 15 |
| Abbildung 8: Das GAL4/UAS-System | 17 |
| Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Simulation des Experiments von Gegear | 23 |
| Abbildung 10: Versuchsdurchführung zur Simulation des Experiments von Gegear. | 24 |
| Abbildung 11: <i>Buridan</i> Paradigma | 26 |
| Abbildung 12: <i>Persistenz</i> Paradigma | 27 |
| Abbildung 13: <i>Detour</i> Paradigma | 28 |
| Abbildung 14: <i>IODA</i> | 29 |
| Abbildung 15: Versuchsablauf <i>IODA</i> | 31 |
| Abbildung 16: Seitenpräferenz von CS und WTB bei Versuchsdurchführung gemäß Gegear, jedoch ohne künstliches Magnetfeld..... | 37 |
| Abbildung 17: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> von Wildtyp <i>Canton Spezial</i> | 40 |
| Abbildung 18: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> bei klassischen Lernmutanten | 45 |
| Abbildung 19: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> bei Mutanten der inneren Uhr sowie blinden Fliegen | 46 |
| Abbildung 20: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Silencing einzelner Ringsysteme des EK..... | 51 |
| Abbildung 21: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>dnc^l</i> in R1..... | 55 |
| Abbildung 22: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung oder Knock-Down von <i>dnc^l</i> in R1 plus..... | 57 |
| Abbildung 23: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung oder Knock-Down von <i>dnc^l</i> in R2 und R2 plus | 59 |
| Abbildung 24: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung oder Knock-Down von <i>dnc^l</i> in R3d & R3p, sowie R3m | 61 |
| Abbildung 25: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>dnc^l</i> oder Knock-Down von <i>dnc</i> in R3plus/minus | 62 |
| Abbildung 26: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>dnc^l</i> oder Knock-Down von <i>dnc</i> in R4 minus | 64 |
| Abbildung 27: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>rut</i> in R1 im <i>rut^l</i> -mutanten Hintergrund..... | 68 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 28: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>rut^l</i> oder Knock-Down von <i>rut</i> in R1 plus | 70 |
| Abbildung 29: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>rut^l</i> oder Knock-Down von <i>rut</i> in R2 | 72 |
| Abbildung 30: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>rut^l</i> oder Knockdown von <i>rut</i> in R2 plus..... | 74 |
| Abbildung 31: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>rut^l</i> oder Knockdown von <i>rut</i> in R3m und R3d & R3p..... | 76 |
| Abbildung 32: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>rut^l</i> oder Knockdown von <i>rut</i> in R3 plus/minus..... | 78 |
| Abbildung 33: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>rut^l</i> oder Knockdown von <i>rut</i> in R4 minus | 79 |
| Abbildung 34: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Rettung von <i>cry</i> in R4 minus, R4m und R3d & R3p im <i>cry⁰¹</i> mutanten Hintergrund..... | 84 |
| Abbildung 35: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Knockdown von <i>cry</i> in R4 minus, R4m und R4d. | 85 |
| Abbildung 36: Medianer Fehlerwinkel im <i>Buridan</i> - Paradigma nach Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone, sowie der AOTU mit TNT | 89 |
| Abbildung 37: Vektorielle Laufstrecke in Landmarkenrichtung im <i>Persistenz</i> Paradigma nach Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone, und/oder der AOTU mit TNT. | 91 |
| Abbildung 38: Positive Entscheidungen im <i>Detour</i> Paradigma nach Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone, und/oder der AOTU mit TNT | 93 |
| Abbildung 39: Idiothetische Orientierung im <i>IODA</i> nach Inaktivierung der E-PG, P-EN Neurone und AOTU mit TNT | 96 |
| Abbildung 40: Tabellarische Zusammenfassung der Auswirkung auf das Verhalten nach Verhinderung der synaptischen Transmission an Synapsen der E-PG Neurone | 97 |
| Abbildung 41: Tabellarische Zusammenfassung der Auswirkung auf das Verhalten nach Verhinderung der synaptischen Transmission an Synapsen der P-EN Neurone und/oder AOTU | 98 |
| Abbildung 42: Expressionsmuster des Treibers R31A12-GAL4..... | 101 |
| Abbildung 43: Expressionsmusters des Treibers 198Y-GAL4102 | |
| Abbildung 44: Expressionsmuster des Treibers EB1-GAL4 | 103 |
| Abbildung 45: Expressionsmuster des Treibers R19C08-GAL4..... | 104 |
| Abbildung 46: Expressionsmuster des Treibers VT49921-GAL4..... | 105 |
| Abbildung 47: Expressionsmuster des Treibers 189Y-GAL4 | 106 |
| Abbildung 48: Expressionsmuster des Treibers R28D01-GAL4..... | 107 |
| Abbildung 49: Expressionsmuster des Treibers R54B05-GAL4..... | 108 |
| Abbildung 50: Expressionsmuster des Treibers VT42759-GAL4..... | 109 |
| Abbildung 51: Expressionsmuster des Treibers <i>ftz-ng</i> -GAL4 | 110 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 52: Expressionsmuster des rekombinanten Treibers <i>ftz-ng-GAL4</i> im <i>cry⁰¹</i> - mutanten Hintergrund..... | 110 |
| Abbildung 53: Expressionsmuster des Treibers VT043679-GAL4..... | 111 |
| Abbildung 54: Expressionsmuster des Treibers VT025526-GAL4..... | 112 |
| Abbildung 55: Expressionsmuster des Treibers R19G02-GAL4..... | 113 |
| Abbildung 56: Expressionsmuster des Treibers R26C04-GAL4..... | 114 |
| Abbildung 57: Expressionsmusters des Treibers R26B12-GAL4..... | 115 |
| Abbildung 58: Expressionsmuster des Treibers R60D05-GAL4..... | 116 |
| Abbildung 59: Expressionsmuster des Treibers R37F06-GAL4..... | 117 |
| Abbildung 60: Expressionsmuster des Treibers R12D09-GAL4..... | 118 |
| Abbildung 61: Expressionsmuster des Treibers R13D05-GAL4..... | 119 |
| Abbildung 62: Expressionsmuster des Treibers R41G11-GAL4..... | 120 |
| Abbildung 63: Expressionsmuster des Treibers R49E09-GAL4..... | 121 |
| Abbildung 64: Expressionsmuster der Treiber R28D01-LexA und EB1-GAL4..... | 123 |
| Abbildung 65: Expressionsmuster der Treiber R19C08-LexA und R28D01-GAL4..... | 124 |
| Abbildung 66: Expressionsmuster der Treiber R28D01-LexA und 189Y-GAL4..... | 126 |
| Abbildung 67: Expressionsmuster der Treiber R54B05-LexA und R28D01-GAL4..... | 128 |
| Abbildung 68: Für das idiothetische Orientierungsgedächtnis benötigte Ringneuronsysteme für die Informationsleitung..... | 138 |
| Abbildung 69: Notwendigkeit der Genprodukte von <i>rutabaga</i> und <i>dunce</i> in den einzelnen Ringsystemen R1 bis R4..... | 141 |
| Abbildung 70: Das Genprodukt von <i>cryptochrome</i> ist notwendig und hinreichend im Bereich seiner endogenen Expression in R4..... | 143 |
| Abbildung 71: Beteiligte kolumnäre Neuronenklassen an der Ausbildung eines idiothetischen Orientierungsgedächtnisses..... | 146 |
| Abbildung 72: Strahlstärke der verwendeten Rotlichtlampe..... | 164 |
| Abbildung 73: Durchführung Magnetfeldvibration nach Mendel..... | 166 |

7.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Fliegenstämme unter Berücksichtigung des betroffenen Chromosom, der Bezugsquelle, sowie der Referenz. Chr.=Chromosom | 19 |
| Tabelle 2: Anfertigung von <i>Whole Mounts</i> der Fliegengehirne | 32 |
| Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper..... | 33 |
| Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Lösungen. Herstellung der verwendeten Stammlösungen | 33 |
| Tabelle 5: Seitenpräferenz ohne künstliches Magnetfeld berechnet mit PI_{Mendel} | 37 |
| Tabelle 6: Seitenpräferenz ohne künstliches Magnetfeld berechnet mit PI_{Gear} | 38 |
| Tabelle 7: Statistische Werte des Wildtyps <i>Canton Spezial</i> im <i>IODA</i> unter verschiedenen Versuchsbedingungen..... | 41 |
| Tabelle 8: Statistische Werte verschiedener mutanter Stämme im <i>IODA</i> unter verschiedenen Versuchsbedingungen | 47 |
| Tabelle 9: Statistische Werte nach Silencing einzelner Ringe des EK mit <i>Tetanustoxin</i> (TNT)..... | 52 |
| Tabelle 10 (nächste Seite): Statistische Werte nach Rettungsversuchen von <i>dnc^l</i> in den verschiedenen Ringen des EK im <i>IODA</i> | 64 |
| Tabelle 11: Statistische Werte nach Knock-Down von <i>dnc</i> mittels RNA-Interferenz in den verschiedenen Ringen des EK im <i>IODA</i> | 66 |
| Tabelle 12: Statistische Werte nach Rettungsversuchen von <i>rut^l</i> in den verschiedenen Ringen des EK im <i>IODA</i> | 80 |
| Tabelle 13: Statistische Werte nach Knock-Down von <i>rut</i> mittels RNA-Interferenz in den verschiedenen Ringen des EK im <i>IODA</i> | 81 |
| Tabelle 14: Statistische Werte nach Rettungsversuchen von <i>cry</i> in den Ringen R4, R4m plus und R3d & R3p des EK von <i>cry⁰¹</i> defekten Tieren im <i>IODA</i> | 86 |
| Tabelle 15: Statistische Werte nach Knock-Down von <i>cry</i> mittels RNA-Interferenz in den Ringen R4, R4m und R4d des EK im <i>IODA</i> | 87 |
| Tabelle 16: Statistische Werte nach Inaktivierung der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU mit <i>Tetanustoxin</i> (TNT) für die Orientierungsfähigkeit im <i>Buridan</i> -Paradigma..... | 90 |
| Tabelle 17: Statistische Werte nach Inaktivierung der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU mit <i>Tetanustoxin</i> (TNT) im <i>Persistenz</i> -Paradigma. | 91 |
| Tabelle 18: Statistische Werte nach Inaktivierung der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU mit <i>Tetanustoxin</i> (TNT) im <i>Detour</i> Paradigma..... | 94 |
| Tabelle 19: Statistische Werte nach Inaktivierung der E-PG und P-EN Neurone, sowie der AOTU mit <i>Tetanustoxin</i> (TNT) im <i>IODA</i> | 98 |

7.4 Anhang

7.4.1 Messung der Strahlstärke der verwendeten Rotlichtlampe

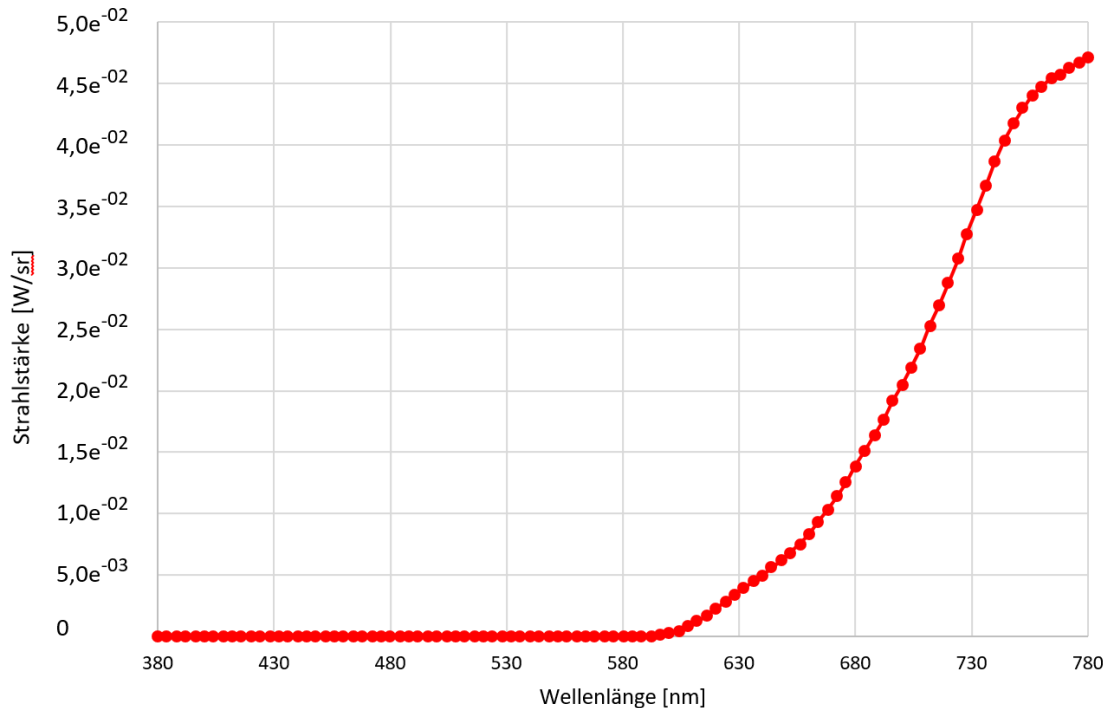


Abbildung 72: Strahlstärke der verwendeten Rotlichtlampe. Angegeben ist die Strahlstärke in Watt pro Steradian für die entsprechenden emittierten Wellenlängen. Gemessen mit Optical Spectrum Analyzer, Spektro 100 (zur Verfügung gestellt von Lehrstuhl Strauß), mit Unterstützung von Dr. Jürgen Schramme.

7.4.2 Durchführung der Rekombination von VT025526-GAL4 und cry^{01}

G₀: $w/w;;cry^{01}/cry^{01}$ x $w/Y;;VT025526-GAL4/VT025526-GAL4$

F₁: $w/w;;cry^{01}/VT025526-GAL4$ selektieren

G₁: $w/w;;cry^{01}/VT025526-GAL4$ x $w/Y;;Ser/TM3,Sb$

F₁: $w/Y;;cry^{01} VT025526-GAL4/TM3,Sb$ selektieren

G₂: $w/w;;Ser/TM3,Sb$ x $w/Y;;cry^{01} VT025526-GAL4/TM3,Sb$

F₁: $w/w;;cry^{01} VT025526-GAL4/TM3,Sb$ selektieren

$w/Y;;cry^{01} VT025526-GAL4/TM3,Sb$ selektieren

weiter inzüchten!

7.4.3 Rückkreuzung von R54B05-GAL4

G₀: w^{1118}/w^{1118} x $w^{1118}/Y;;R54B05-GAL4/ R54B05-GAL4$

F₁: $w^{1118}/w^{1118};; R54B05-GAL4/III$ selektieren

G₁: $w^{1118}/w^{1118};; R54B05-GAL4/III$ x w^{1118}/Y

F₁: $w^{1118}/w^{1118};; R54B05-GAL4/III$ selektieren

G₂: $w^{1118}/w^{1118};; R54B05-GAL4/III$ x w^{1118}/Y

F₁: $w^{1118}/w^{1118};; R54B05-GAL4/III$ selektieren

G₃: $w^{1118}/w^{1118};; R54B05-GAL4/III$ x $w/Y;;Ser/TM3,Sb$

F₁: $w^{1118}/w;; R54B05-GAL4/TM3,Sb$ selektieren

$w^{1118}/Y;; R54B05-GAL4/TM3,Sb$ selektieren

weiter inzüchten!

7.4.4 Schema Durchführung Magnetfeldvibration nach Mendel (nächste Seite)

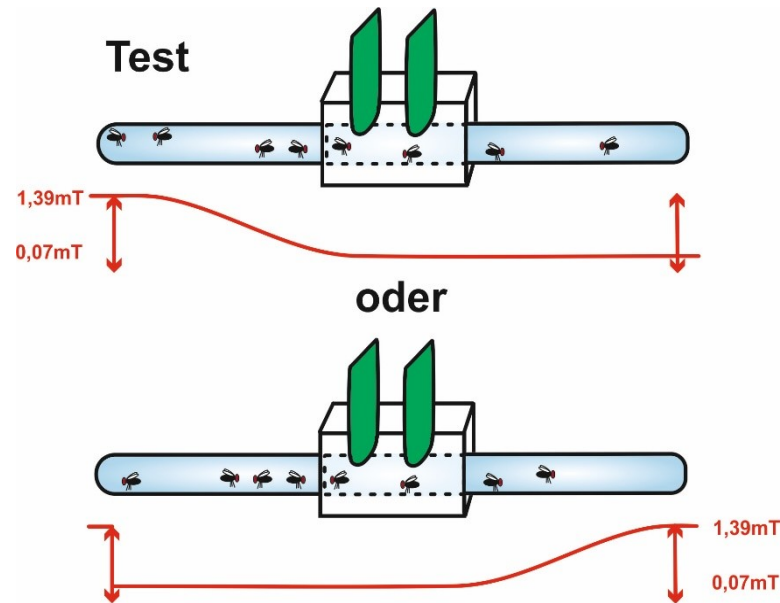
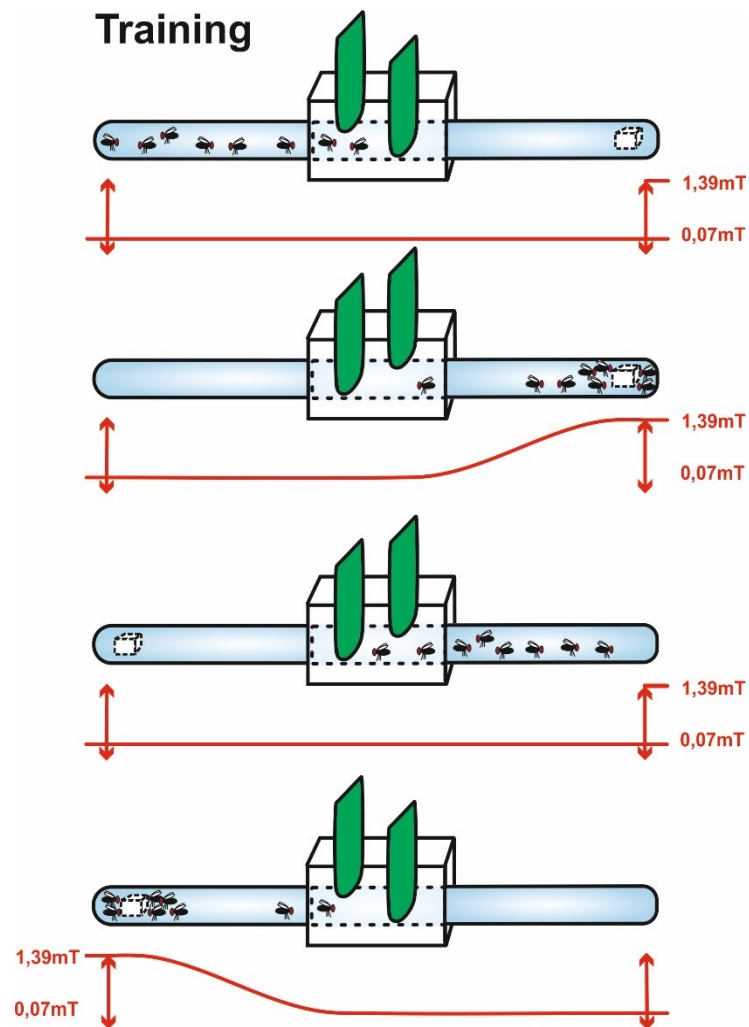


Abbildung 73: Durchführung Magnetfeldvibration nach Mendel. Für die Trainingseinheit werden Gruppen von 5-26 männlichen, vorgehungerten, 2-6d alte Fliegen in das Mittelstück eingesetzt. Nach 1min Gewöhnungszeit wird der linke Schieber geöffnet, die Tiere verbleiben für 1min im linken Röhrchen ohne Zuckerbelohnung und künstlichem Magnetfeld. Die Tiere werden in das Mittelstück zurückgeschoben, der linke Schieber geschlossen, auf der rechten Seite das künstliche Magnetfeld aktiviert (1,39mT am proximalen Ende des Röhrchens, gemessen mit digitalem Amperemeter Voltcraft M-3850), die Tiere können sich 1min in der rechten Seite mit Zuckerbelohnung aufhalten. Nachdem sie wieder zurück in das Mittelstück geschoben wurden, werden die Röhrchen vertauscht und die Trainingsdurchläufe auf der jeweils anderen Seite durchgeführt. Im anschließenden Test werden die künstlichen Magnetfelder für jede Gruppe alternierend auf einer Seite präsentiert, die Tiere haben die Möglichkeit, sich in beiden Röhrchen zu bewegen. Der Test der naiven Gruppen findet nach demselben Schema statt.


7.4.5 Genehmigung zur Verwendung Abbildung Kristallstruktur von Cryprochrom

Thank you for your order with RightsLink / Elsevier

Von: no-reply@copyright.com

An: anne.mendel@gmx.de

Datum: 14.10.2019 13:50:27



Thank you for your order!

Dear Anne Mendel,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.



Order Summary

| | |
|---------------|---|
| Licensee: | Johannes Gutenberg University |
| Order Date: | Oct 14, 2019 |
| Order Number: | 4687610792785 |
| Publication: | Cell |
| Title: | Structures of Drosophila Cryptochrome and Mouse Cryptochrome1 Provide Insight into Circadian Function |
| Type of Use: | reuse in a thesis/dissertation |
| Order Total: | 0.00 EUR |

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,
Copyright Clearance Center

Tel: +1-855-239-3415 / +1-978-646-2777
customercare@copyright.com
<https://myaccount.copyright.com>



This message (including attachments) is confidential, unless marked otherwise. It is intended for the addressee(s) only. If you are not an intended recipient, please delete it without further distribution and reply to the sender that you have received the message in error.

7.4.6 Rohdaten

Die Rohdaten befinden sich auf dem beigelegten Datenträger

7.4.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Ann-Kathrin Mendel
Geburtsdatum 05.10.1984
Geburtsort Hofgeismar
E-Mail ann.kathrin-mendel@gmx.de
Staatsangehörigkeit deutsch



Berufserfahrung

19/02/2014-
31/12/2019

Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

- Planung und Durchführung von wissenschaftlichen Versuchen und deren statistischer Auswertung
- Verwendung gängiger Laborverfahren und molekularbiologischer Techniken zur Analyse genetischer Expressionsmuster in Modellorganismen
- Zucht und Haltung gentechnisch veränderter Insekten
- Routiniertes Arbeiten im S1-Labor
- Rechercheerfahrung in gentechnischen Datenbanken (FlyBase, FlyLight)
- Einzelbetreuung von Diplom-, Master- und Bachelorstudierenden
- Organisation und Betreuung von Studierendenpraktika im Team
- Koordinationsstelle zwischen Professor und Studierenden
- Aufarbeiten und Präsentieren wissenschaftlicher Fachartikel

01/04/2012-
31/02/2014

Hilfswissenschaftlerin an der Johannes Gutenberg-Universität in den Fachbereichen Zoologie und Botanik

- Planung und Durchführung von wissenschaftlichen Studierendenpraktika im Team

Ausbildung

19/02/2014-
31/12/2019

Promotion am Institut für Neurobiologie an der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz EQR-Niveau 8

- Thema der aktuellen Dissertation: „Analyse der Orientierungsstrategien bei *Drosophila melanogaster* mit Hilfe molekulargenetischer Methoden“

01/10/2006-
19/02/2014

Diplomstudiengang am Institut für Biologie an der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz EQR-Niveau 7
Schwerpunkt: Neurobiologie

- Thema der Diplomarbeit: „Analyse der Magnetfeldorientierung bei *Drosophila melanogaster*“
- Abschlussnote: „sehr gut“ (1,4)
- Pharmakologie, Toxikologie und Rechtsmedizin als zusätzliche, erfolgreich absolvierte, nicht-biologische Fächer

04/08/2001-
21/06/2004

Erwerb der allgemeinen Hochschulreife an der Albert-Schweitzer-
Schule in Hofgeismar EQR-Niveau 4

- Abschlussnote: 2,2