
**Neuronale Netzwerke des
Zentralkomplexes und ein
räumliches Arbeitsgedächtnis von
*Drosophila melanogaster***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Kirsa Neuser
geb. am 01.11.1977 in Lahn-Wetzlar

Mainz, 2012

Inhaltsangabe

Einleitung	6 - 16
1 Räumliche Orientierung	6 - 8
2 <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus	8 - 11
3 Der Zentralkomplex von <i>Drosophila melanogaster</i>	11 - 15
4 Lernen und Gedächtnis bei <i>Drosophila melanogaster</i>	15 - 16
Ergebnisse	17 - 78
1 Zusammenfassung der Veröffentlichung zum Orientierungsgedächtnis (Neuser et al. 2008, Nature) und Erklärung der eigenen Anteile	17 - 18
<i>Analysis of a spatial orientation memory in Drosophila</i>	19 - 30
Letter to Nature – Introductory paragraph	19
Main Text	20 - 23
Methods Summary	23 - 24
References	24 - 26
Figure legends	27 - 28
Figures	28 - 29
Full Methods	29 - 30
2 Zusammenfassung der Veröffentlichung zur Rolle der Protocerebralbrücke bei der Schrittlängen-Kontrolle (Poeck et al. 2008, Dev. Biol.) und Erklärung der eigenen Anteile	30 - 32
<i>Locomotor control by the central complex in Drosophila-An analysis of the tay bridge mutant</i>	33 - 46
Abstract	33
Introduction	33 - 34
Materials and methods	34 - 37
Results	37 - 44
Discussion	44 - 45
References	45 - 46
3 Zusammenfassung der Veröffentlichung zur Kontrolle der Kletterrichtung durch die Protocerebralbrücke (Triphan et al. 2010,	47

Curr. Biol.) und Erklärung der eigenen Anteile	
<i>Visual targeting of motor actions in climbing Drosophila</i>	48 - 70
Summary	49
Results and Discussion	49 - 54
Conclusion	54 – 55
Experimental Procedures	56
References	57 – 58
Figure legends	58 – 61
Figures	61 - 63
Supplement	63 - 70
4 Additional unpublished behavioural and neuroanatomical results	71 – 82
4.1 Behavioral characterization of wild-type Canton-S flies in the detour paradigm	71 - 74
4.2 Assessing the role of different structural central complex mutants in the spatial orientation memory	74 - 77
4.3 <i>ignorant</i> null mutant flies but not flies of the P-Element insertion and the precise jump-out line display aberrant spatial memory	77 - 78
4.4 Investigation of possible S6KII interaction partners	78 - 80
4.5 Examination of the role of different neurotransmitters in the spatial orientation memory	80 - 82
Diskussion	83 - 98
Grundlagen eines räumlichen Arbeitsgedächtnisses bei <i>Drosophila melanogaster</i>	83 - 93
Das neuronale Netzwerk visuell stimulierter, zielgerichteter Bewegung	93 - 98
Literatur	99 - 109
Erklärung	110
Summary / Zusammenfassung	111 - 114
Curriculum Vitae	115 - 116

Jeder Tag unseres Lebens ist eine Bühne, die zum guten oder schlechten - in einer Komödie, Farce oder Tragödie - von einer "dramatis persona" beherrscht wird: dem "Selbst".

Sir Scott Charles Sherrington

Einleitung

1 *Räumliche Orientierung*

Die Fähigkeit, sich selbst innerhalb eines Bezugsrahmens auszurichten, nennt man Orientierung. Orientierung ermöglicht Lebewesen flexibel zu sein, sprich in neuen Situationen neue Kurse einzuschlagen. Grundvoraussetzung flexibler Orientierung ist die Wahrnehmung sensorischer Stimuli, wie Duftmoleküle und visuelle Reize. Diese Informationen werden unmittelbar umgesetzt (Chemotaxis), oder auch integriert und eventuell längerfristig gespeichert, um so zielgerichtetes Verhalten zu gestalten. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Grundlagen zielgerichteter, räumlicher Orientierung. Dabei stehen folgende Fragestellungen im Vordergrund. Welche Merkmale in der Umgebung werden genutzt, um zielgerichtete Orientierung zu ermöglichen? Welchen Strategien wird gefolgt, um von A nach B zu kommen? Wo werden die orientierungsrelevanten Informationen integriert und gespeichert? Wie ist das neuronale Netzwerk aufgebaut, welches zielgerichtete Bewegung ermöglicht?

Zielgerichtete, räumliche Orientierung oder Navigation ist ein multisensorischer Prozess, der mit der sensorischen Wahrnehmung beginnt. Dabei werden vor allem visuelle Eindrücke, wie etwa Landmarken (der Bäcker an der Ecke) genutzt, aber auch der Gleichgewichtssinn spielt eine entscheidende Rolle (geht der Weg steil bergab, führt er über glatten Asphalt oder holpriges Kopfsteinpflaster?). Außerdem sind Vertebraten, wie auch Invertebraten in der Lage, sich Bewegungsfolgen zu merken (nach einer Rechtskurve folgt eine Linkskurve). Fehlen diese multisensorischen Eindrücke, ist der Orientierungssinn empfindlich gestört. So zum Beispiel laufen Menschen in der Wüste bei einem Sandsturm tatsächlich im Kreis (Jan et al. 2009).

Generell unterscheidet man zwei Strategien der Orientierung, die idiothetische und die allothetische. Allothetische Orientierung umfasst all jene Orientierungsarten, die sich an äußerlichen Merkmalen ausrichten, wie zum Beispiel die Navigation anhand von visuellen Landmarken, Koordinaten, Sonnenstand, polarisiertem Licht und Duftmarken. Das heißt, wann immer ein externes Referenzsystem für die Eigenorientierung genutzt wird, spricht man von allothetischer Orientierung. Im Gegensatz dazu ist das Referenzsystem bei der idiothetischen Orientierung rein intern, d.h. unabhängig von externen Bezügen. So zum Beispiel misst die Wüstenameise *Cataglyphis fortis* Distanzen anhand der Integration der eigenen Schritte (Wohlgemuth et al. 2001).

Aber wie sieht die neuronale Repräsentation von orientierungsrelevanten sensorischen Reizen aus? Wie wird der Ort eines Objektes oder die vergangene Bewegungsrichtung gespeichert und wie werden diese Informationen integriert und in zielgerichtete Bewegung umgesetzt?

John O'Keefe und John Dostrovsky entdeckten 1971, dass sich im Hippocampus von Mäusen Zellen befinden, welche in Abhängigkeit zur Position des Tieres in der Umgebung feuern. Zu jedem sogenannten Ortsneuron (engl.: place cell) gehört demnach ein Ort mit einem gewissen Umfeld (engl.: place and receptive field), also eine interne Repräsentation des jeweiligen externen Areals. Solche Ortsneurone können monatelang stabil sein und ihre Stabilität scheint abhängig von der Menge an Ca^{2+} /Calmodulin abhängiger Proteinkinase im Hippocampus zu sein. Aber nicht nur die Eigenposition in der Umgebung, sondern auch die Position umgebender Objekte wird im Vertebratengehirn in Referenzmustern kodiert. Neurone im präfrontalen Cortex von Vertebraten feuern in Abhängigkeit von der Position eines visuellen Stimulus im Raum. Interessanterweise können diese Neurone ihre Aktivität über eine gewisse Zeitspanne erhalten und so Positionsinformationen speichern, auch wenn der visuelle Stimulus nicht mehr sichtbar ist. Im Verhaltensversuch messbar wird diese neuronale Eigenschaft in sogenannten „delayed-response tasks“ (Funahashi 2006). Dabei wird z. B. Affen ein visueller Stimulus präsentiert, z. B. ein Punkt auf einem Bildschirm, den sie mit Ihren Augen fixieren. Nun wird ein zweiter visueller Stimulus, z. B. ein Kästchen, an einem anderen Punkt auf dem Bildschirm, also an einem anderen Punkt im visuellen Feld präsentiert und wieder ausgeblendet. Die Präsentation erfolgt nur sehr kurz, so dass zwar eine periphere Wahrnehmung, aber keine Aufmerksamkeitsverschiebung bzw. Augenbewegung zum Stimulus hin erfolgt. Nach einer Wartedauer von ein paar Sekunden wird der fortwährend fixierte Punkt ausgeblendet, woraufhin die Versuchstiere ihre Augen zielgenau auf die Stelle richten, wo sich zuvor das Kästchen befunden hat. Demzufolge muss das Tier in der Lage sein, die Position des kurzzeitig präsentierten zweiten Stimulus neuronal zu speichern. Diese Form des sehr kurzen Kurzzeitgedächtnisses (< 30s) wird gemeinhin als Arbeitsgedächtnis bezeichnet und wurde 1974 konzeptionell von Alan Baddeley eingeführt. Das Arbeitsgedächtnis gilt somit als Speicher temporärer Merkmale, die unmittelbar genutzt werden und scheint mit Neuronen des präfrontalen Cortex als entsprechende Speicherorte assoziiert zu sein. Diese Neurone besitzen neben rezeptiven Feldern in der Aussenwelt sogenannte Gedächtnisfelder (engl. memory fields), welche es ermöglichen, aus gespeichertem Wissen adäquate motorische Handlungen zu initiieren. Die Entdeckung der Platzzellen führte zu der Hypothese, dass Gehirne kognitive „Karten“ (Referenzrahmen)

erstellen, mit deren Hilfe Informationen über Orte und Objekte gespeichert werden. Im Vertebratengehirn werden zum Beispiel Informationen über die räumliche Position eines Objektes und dessen Eigenschaften, wie Form und Farbe getrennt verarbeitet.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob entsprechende Leistungen auch von Insekten und ihren vergleichsweise einfacheren Gehirnen erbracht werden können. Besitzen Invertebraten auch kognitive Karten? Diesen Fragestellungen gehe ich mit Hilfe des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* nach. Welche Strategie der Orientierung nutzen Fruchtfliegen, um sich im Raum zu orientieren. Besitzt die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* die Fähigkeit ein Arbeitsgedächtnis anzulegen? All diese Fragestellungen haben ein gemeinsames Ziel: Die Aufklärung neuronaler Netzwerke für zielgerichtete Navigation. Der nächste Abschnitt versucht deutlich zu machen, warum es sinnvoll ist, sich solchen neurobiologischen Fragestellungen mit Hilfe des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* zu nähern.

2 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Neuronale Netzwerke bestehen aus einer Vielzahl einzelner Neurone, wobei jede einzelne Zelle ihre eigene Gestalt, Verbindungen, molekulare Zusammensetzung, sowie Entwicklungs- und Lerngeschichte haben kann. Idealerweise möchte man, ausgehend von einem bestimmten Reiz bzw. interner Gehirnaktivität, die daraus resultierenden neuronalen Aktivitäten innerhalb eines vollständig charakterisierten Netzwerkes verfolgen.

Die Gehirne von Insekten, insbesondere von *Drosophila melanogaster*, bergen hohes Potenzial für die Beantwortung einer solch umfassenden Fragestellung. Das Zentralhirn der Fruchtfliege besteht aus ca. 100000 Neuronen und liegt so numerisch zwischen denen anderer Modellorganismen, wie *Caenorhabditis elegans* mit 302 Neuronen und der Maus mit ca. tausend mal mehr Neuronen als die Fliege. Im Gegensatz zu *C. elegans* verfügt *Drosophila melanogaster* jedoch über ein erheblich reicheres Verhaltensrepertoire (Pitman et al. 2009; Vosshall 2007) und verglichen mit der Maus sind die deutlich geringere Generationszeit von ca. 10 Tagen bei 25°C Aufzuchttemperatur (Ashburner et al. 2005) neben der numerischen Simplizität hervorstechende Vorteile.

Die Untersuchung neurobiologischer Fragestellungen verlangt aber vor allem die Möglichkeit, bestimmte Neuronengruppen oder einzelne Neurone gezielt zu adressieren und damit zu identifizieren und zu manipulieren, sowie die daraus resultierenden Phänotypen auf Verhaltens- oder Entwicklungs- oder anatomischer Ebene zu beschreiben. Diese Möglichkeit ist durch die weit fortgeschrittene Entwicklung neurogenetischer Methoden, insbesondere

transgener, binärer Systeme in *Drosophila melanogaster* hervorragend gegeben. Anhand dieser Binärsysteme können in definierten Neuronensets definierte Effektoren oder Reporter exprimiert werden. Abhängig vom gewählten Effektor/Reporter können so gezielt Neurone identifiziert, manipuliert und die resultierenden Phänotypen analysiert werden und zwar isogen und beliebig oft wiederholbar. In *Drosophila melanogaster* finden mittlerweile drei binäre Systeme Anwendung, das auf den bakteriellen Transkriptionsfaktor LexA und dessen Operator LexAop basierende LexA/LexAop System (Lai and Lee 2006), das auf regulatorische Gene der Qualle *Neurospora qa* basierende Q-System (Potter et al. 2010) und das auf den Hefe Transkriptionsfaktor GAL4 und dessen Bindestelle UAS basierende GAL4/UAS System (Brand und Perrimon, 1993, Duffy 2002). Letzteres ist das erfolgreichste und am weitesten verbreitete der existierenden Binärsysteme. So stehen sowohl große Datenbanken von GAL4-Linien - Flybase ([http:// flybase.bio.indiana.edu/](http://flybase.bio.indiana.edu/)), GETDB (<http://kyotofly.kit.jp/stocks/GETDB/getdb.html>), flytrap (<http://fly-trap.org>), die Rorth EP collection (Rorth, 1996) und Gene Search (Toba et al. 1999), als auch eine stetig steigende Zahl an Effektorgen-Konstrukten zur Verfügung. Effektorgene können Reporter kodieren, die der Visualisierung adressierter Neuronengruppen dienen, so wie das grün fluoreszierende Protein (GFP, Yeh et al. 1995). Außerdem kann mit Hilfe von markierten Synapsenproteinen die Polarität von Neuronen identifiziert werden. Zum Beispiel gibt es fluoreszenz-markiertes Synaptobrevin (UAS-nSyb::GFP; Ito et al. 1998), um präsynaptische Verbindungen zu visualisieren und das *Drosophila* Down syndrome cell adhesion molecule (UAS-Dscam::GFP; Wagh et al. 2004), um Dendriten darzustellen. Neben morphologischen Untersuchungen können Effektoren der Manipulation von Neuronen dienen. So ist es zum Beispiel möglich, mit gezielter Expression des Blaulicht sensitiven Kationenkanals Channelrhodopsin (Nagel et al. 2003; Boyden et al. 2005; Schroll et al. 2006) diskrete Neuronengruppen durch Blaulichtbestrahlung zu aktivieren. Alternativ kann das auch mit einem temperatur-sensitiven Kationenkanal dTrpA1 geschehen (Hamada et al. 2008). Im Gegensatz dazu kann die Transmitterausschüttung an den Präsynapsen inhibiert und so die Bildung von Aktionspotentialen verhindert werden. Die Expression der leichten Kette des Neurotoxins Tetanus (TNT) führt zur Spaltung neuronalen Synaptobrevins und damit zur Blockade der Vesikelausschüttung an der Präsynapse (Schiavo et al. 1992; Sweeney et al. 1995). Ein anderer inhibierender Effektor chemischer Synapsen ist das temperatursensitive, dominant-negative Allel des *shibire* Gens (*shi^{ts}*; Kitamoto 2002). *Shibire^{ts}* kodiert eine in der Konformation veränderte GTPase, die die Endocytose von Vesikeln an der Präsynapse verhindert. Aufgrund der Temperatursensitivität dieses Effektors und einer schnellen

Reversibilität der Expression, kann die Inhibierung der Neuronenfunktion auf ein schmales Zeitfenster beschränkt werden (Schwaerzel et al. 2003; Rister et al. 2007). Neben der Inaktivierung chemischer Synapsen können sowohl chemische, als auch elektrische Synapsen durch die Expression des humanen einwärts gerichteten Kalium-Kanals KIR^{2.1} (Baines et al. 2001) inhibiert werden. Außerdem ist es möglich, den durch Aktionspotentiale ausgelösten Ca²⁺-Einfluss in die Präsynapse *in vivo* optisch sichtbar zu machen und so die Aktivität von Neuronen aufzunehmen. Unter anderen finden hier zwei Effektoren Anwendung, UAS-Camaleon2.1 (Diegelmann et al. 2001) und UAS-GcaMP (Nakai et al. 2001).

Neben der Bestimmung des Wo und Was, kann unter Verwendung der temperatursensitiven Form des GAL4 Repressors GAL80^{ts} (McGuire et al. 2003) auch das Wann, also der Zeitpunkt der Expression bestimmt und so entwicklungsabhängige Einflüsse kontrolliert werden. Daneben ermöglicht die Verwendung von GAL80^{ts} (Lee and Luo 1999) auch die Restriktion eines definierten GAL4-Expressionsmusters, wodurch notwendige und hinreichende Neurone innerhalb eines neuronalen Netzwerkes weiter eingegrenzt werden können. Noch einen Schritt weiter gehen Mosaik-Analysen unter Verwendung des FLP/FRT (Golic and Linquist 1989; Xu and Rubin 1993) und des MARCM (Lee and Luo 1999) Systems, welche es ermöglichen, Einzel-Zell Klone zu markieren.

Drosophila melanogaster bietet aber auch die Möglichkeit, auf der Ebene von Signalkaskaden hinreichende und notwendige Analysen durchzuführen. Transgene transposable P-Elemente (Spradling & Rubin, 1982) können mit Hilfe einer Transposase remobilisiert werden; die folgende Exsertion oder Reinsertion des P-Elements kann benachbarte Gene zerstören und so zu Proteinmutanten führen. Zum Beispiel wurde die in dieser Arbeit benutzte *ignorant*^{58/1} Mutante so generiert (Putz et al. 2004). Eine weitere Möglichkeit, die RNA interference (RNAi), ermöglicht es, durch transgene Expression einer bestimmten Haarnadel-Antisense RNA die Menge des betreffenden Proteins in Zellen herunter zu regulieren, da die resultierenden dsRNA durch die Zellmaschinerie abgebaut werden (Fire et al. 1998; Boutros et al. 2004; Dietzl et al. 2007).

Die beschriebenen neurogenetischen Methoden des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* bergen die Möglichkeit, fundamentale Prinzipien neuronaler Netzwerke zu detektieren. Letztendlich können damit Hypothesen aufgestellt werden, die in einem ersten Schritt durch Implementierung in Robotersystemen überprüft werden können (Wessnitzer und Webb, 2006; Webb, 2002; Mronz, 2004) und die zu überprüfbaren Hypothesen für die Funktion von Gehirnen im Allgemeinen führen können.

Aber auch die hypothetische Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse aus einem Arthropoden, wie der Fruchtfliege auf Vertebraten rechtfertigt sich oft durch die hohe Genhomologie zwischen beiden (Rubin et al. 2000). Hinzu kommt, dass die molekulare Maschinerie von Vertebraten und Fruchtfliege häufig über die Evolution konserviert wurde (Yu und Hardin 2006; Hirth und Reichert 1999). Neben der molekularen Maschinerie birgt auch die prinzipielle Organisation neuronaler Netzwerke in Vertebraten und Invertebraten hohe Homologie, da beide mit vielen gemeinsamen Grundprinzipien der Außenwelt und der Entwicklungsbiologie konfrontiert sind. Generelle Prinzipien der Informationsverarbeitung im zentralen Nervensystem sind die Hierarchie und die kolumnäre Organisation der einzelnen, Stimulus verarbeitenden Relay-Stationen. Als Beispiel sei hier das visuelle System erwähnt, dessen Gemeinsamkeiten zwischen Vertebraten und Fliegen erstmals vor einem Jahrhundert von Cajal beschrieben wurden (Cajal und Sanchez 1915). Über die Jahre hat sich dieser Blick gefestigt und es können folgende organisatorische Gemeinsamkeiten beschrieben werden: kleine Zahl an Neuronentypen, die sich in mehrere Subtypen unterteilen; Neurone mit einer Präsynapse und mehreren postsynaptischen Endigungen; multiple Zellschichten/Neuropile mit regelmäßig angeordneten Neuronen; kolumnäre Projektionen der Neurone auf die nächste Relaystation; Segregation von Synapsen und Somata in verschiedenen Schichten (Sanes und Zipursky 2010). Innerhalb solcher neuronaler Netzwerke werden eingehende Stimuli zunehmend komplexeren Analysen unterzogen, was schließlich in der Konvergenz verschiedener Modalitäten in einem Areal mündet. Die Integration verschiedener sensorischer Modalitäten erfolgt bei Vertebraten in den sogenannten multimodalen Assoziationsarealen des Neocortex. So integriert der präfrontale Cortex orientierungsrelevante Informationen, die in zielgerichteter Bewegung münden. Im Invertebratengehirn scheint u.a. der Zentralkomplex ein einem Assoziationsareal vergleichbares Neuropil zu sein. Der nächste Abschnitt gibt deswegen einen Überblick über Anatomie und Funktion des Zentralkomplexes von *Drosophila melanogaster*.

3 *Der Zentralkomplex von Drosophila melanogaster*

Dem Zentralkomplex (ZK, Synonym: Zentralkörper) werden Funktionen in visueller Orientierung, visuellem Lernen und lokomotorischer Kontrolle in laufenden und/oder fliegenden Fliegen zugeschrieben (Heisenberg 1994; Strauss 2002). Er besteht aus einem Verbund von vier Neuropilen, die jeweils von einer dünnen Gliaschicht begrenzt sind: Protocerebralbrücke (PB), Fächerförmiger Körper (FB), Noduli (NO) und Ellipsoidkörper

(EB) (Abb. 1; Hanesch et al. 1989, Renn et al. 1999, Young et al. 2010). Zwei Neuropile sind eng mit dem ZK assoziiert, die Ventralkörper (VBO) und die lateralen Triangel (LTR).

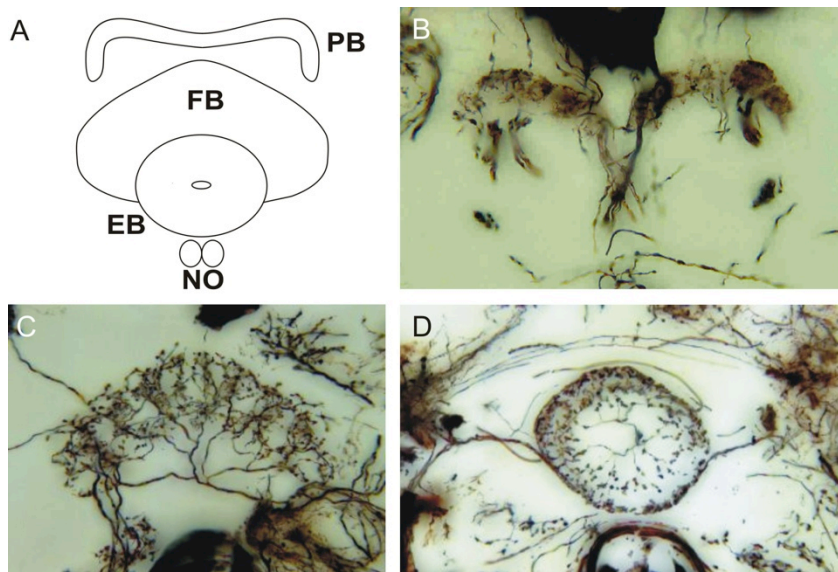


Abb. 1: Der Zentralkomplex

A Schematische Darstellung des ZK; Protocerebralbrücke (PB), Fächerförmiger Körper (FB), Ellipsoidkörper (EB), Noduli (NO). B-D Golgi Färbungen. Die Bilder zeigen die glomeruläre Struktur der PB (B), die vertikalen Segmente des FB (C) und die Arborisationen der R4 und R2 Neurone auf den EB (D). Golgi Bilder stammen von Strausfeld,

N. J., I. Vilinsky, und L. C. Hansen (1996). Flybrain on-line: [<http://www.flybrain.org>] Accession Number: B: AC00020, C: AC00121, D: AA00030.

Die PB liegt sehr exponiert am posterior-dorsalen Ende des Fliegenhirns. Sie besteht aus 16 in einer Reihe entlang der transversen Achse angeordneten Glomeruli, acht pro Hemisphäre (Hanesch et al. 1989), wobei die an den lateralen Enden gelegenen Glomeruli (Nummer 7 und 8) leicht gebogen sind. So erinnert die Anatomie der Brücke an einen Fahrradlenker.

Der FB ist das größte der ZK Neuropile. Er kann in sechs (Golgi Färbungen; Strausfeld 1976; Hanesch et al. 1989) bis acht (Immunofärbungen; Young et al. 2010) horizontale Schichten, vier Halbschalen entlang der rostro-caudalen Achse und acht vertikale Segmente unterteilt werden (Hanesch et al. 1989).

Der EB liegt, teilweise umgeben vom FB, am weitesten anterior. In seiner Mitte befindet sich entlang der anterior-posterioren Achse der EB-Kanal. Golgi Färbungen (Hanesch et al. 1989) ergaben, dass der EB in eine anteriore und eine posteriore Einheit unterteilt werden kann, wohingegen Immunofärbungen mit Hilfe der GAL4 Linie 52Y vier Einheiten erkennen lassen (Young et al. 2010).

Die NO sind die kleinsten unter den ZK Neuropilen, aber die einzigen gepaarten. Sie liegen ventral des FBs und können in drei horizontale Schichten und eine posteriore und anteriore Region unterteilt werden (Hanesch et al. 1989).

Die Neuropile sind symmetrisch organisiert und liegen entlang der sagittalen Mittellinie zwischen den beiden supraoesophagealen Hemisphären des Zentralhirns (Power, 1943). Aufgrund seiner anatomischen Anordnung wurde dem ZK schon früh eine Rolle in der Integration sensorischer Informationen beider Hemisphären zugeschrieben (Homberg 1987) und später durch Verhaltensversuche u. a. im Buridan'schen Paradigma bestätigt (Heisenberg 1994; Strauss 2002). In diesem Paradigma wird das Lauf- und Fixationsverhalten von Fruchtfliegen untersucht, während diese in einer homogenen weißen Umgebung zwei dunkle, sich gegenüberstehende Balken wiederholt ansteuern (Götz 1980; Strauss 2002). Fruchtfliegen mit genetisch bedingt deformiertem ZK (Strauss 1999) sind nicht mehr in der Lage, Bewegungsasymmetrien bei der Fixation von Objekten zu kompensieren, so dass sie in Kreisen laufen (Strauss 2002; Pielage et al. 2002). Des Weiteren haben diese Laufanalysen ergeben, dass der ZK für die Kontrolle visuell gesteuerter Lokomotion wichtig ist. Strukturmutanten mit Läsionen in der PB wie *no bridge*^{KS49} (*nob*^{KS49}), *central complex*^{KS181} (*cex*^{KS181}), *ocelliless*¹ (*oc*¹) und *tay-bridge*¹ (*tay*¹), weisen eine verminderte Laufaktivität und Laufgeschwindigkeit auf (Strauss und Heisenberg, 1993; Strauss 2002; diese Arbeit: Poeck et al. 2008). Die Laufaktivität nimmt in diesen Fliegen über die Zeit hin ab. Die verminderte Laufgeschwindigkeit resultiert scheinbar aus dem Unvermögen, die Schrittlänge an erhöhte Schrittfrequenzen anzupassen. Ergo ist eine intakte Brücke wichtig für die Motivation und die lokomotorische Kontrolle der Fliegen bei der Ansteuerung visueller Objekte. Außerdem zeigen Fliegen mit Brückenläsionen beim Versuch, eine Lücke zu überqueren, eine verminderte Fähigkeit, die Zielplattform korrekt anzusteuern (diese Arbeit: Triphan et al. 2010). Daneben machen Untersuchungen in der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* die Wichtigkeit der PB bei der visuell stimulierten Orientierung zusätzlich deutlich. So konnte mittels intrazellulärer Ableitungen gezeigt werden, dass die Brücke in Locusten eine topographische Karte der E-Vektor Orientierung polarisierten Sonnenlichtes beinhaltet (Vitzhum et al. 2002; Heinze und Homberg 2007, 2009a, 2009b).

Neurone, die den ZK innervieren, können in zwei Gruppen klassifiziert werden, die Kleinfeldneurone und die Großfeldneurone (Hanesch et al. 1989). Die Kleinfeldneurone sind intrinsisch und arborisieren entweder innerhalb eines einzigen ZK Neuropils, wie zum Beispiel die pontinen Neurone innerhalb des FB (Hanesch et al. 1989; Liu et al. 2006), oder sie verbinden mehrere ZK-Neuropile und projizieren in die ZK-assoziierten Areale. Zu ihnen zählen zwei Sets isomorpher Zellen, das vertikale Fasersystem (VFS) und das horizontale Fasersystem (HFS), welche die PB mit anderen Neuropilen verbinden. Das HFS spielt eine Rolle bei der Vermittlung zielgerichteter Orientierung (diese Doktorarbeit: Poeck et al. 2008;

Triphan et al. 2010). Die Großfeldneurone projizieren aus anderen Gehirnregionen in den ZK und innervieren in der Regel ein einziges ZK Neuropil. Zu ihnen zählen die F-Neurone und die Ringneurone. Die F-Neurone innervieren die horizontalen Schichten des FB und spielen eine wichtige Rolle bei der operanten Konditionierung von Attributen visueller Muster (Liu et al. 2006; Wang et al. 2008; Li et al. 2009). Allerdings konnte gezeigt werden, dass parallel zu den F-Neuronen auch Gruppen von Ringneuronen hinreichend für dieses visuelle Gedächtnis sind (Pan et al. 2009). Die Zellkörper der Ringneurone liegen im anterioren Teil des Gehirns lateral zu den VBOs. Die Neurite bilden dendritische Endigungen in den LTRs und ziehen von dort weiter zum EB. Renn et al. (1999) beschrieben fünf Untereinheiten von Ringneuronen (R1, R2, R3, R4m und R4d) entsprechend ihres Arborisationsmusters in fünf konzentrischen Ringen um den EB-Kanal herum. Zusätzlich fanden Young et al. (2010) sieben konzentrische Ringe, die von posterior nach anterior durch folgende Neurone gebildet werden: die Kleinfelneurone fb-eb und die Grossfeldneurone R1, R3, R2, R4d, R4m und ExR1. Während der Fliegenentwicklung können die Ringneurone zuerst in der Puppe detektiert werden und ihre Entwicklung scheint 48h nach der Puppenbildung abgeschlossen zu sein (Renn et al. 1999). Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein intakter EB und Gruppen von Ringneuronen für die Ausbildung eines räumlichen Arbeitsgedächtnisses notwendig sind (Neuser et al. 2008).

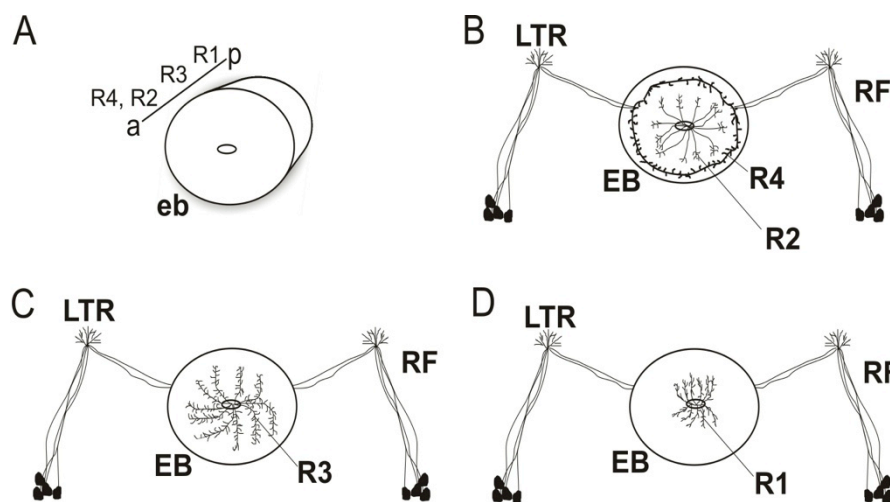


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ringneurone (RN). A Lokalisation der RN-Arborisationen innerhalb des EB; a = anterior, p = posterior. **B-D** Alle Ringneurone projizieren via des RF-Traktes zu den lateralen Triangeln (LTR) und weiter zum EB. Der RF-

Trakt besteht aus Fasern der Ringneurone (R) und Fasern der F-Neurone (F), die den FB innervieren. Die RN bilden dendritische Endigungen in den LTR und präsynaptische Endigungen im EB. **B** Die R4 Neurone projizieren von außen auf den EB und arborisieren in einem äußeren Ring. Die R2 Neurone projizieren durch den EB-Kanal auf den EB und bilden einen mittleren Ring. **C** R3 Neurone projizieren durch den EB-Kanal auf den EB und arborisieren in einem den mittleren und inneren Teil des EB umfassenden Rings. **D** R1 Neurone projizieren durch den EB-Kanal und arborisieren in einem inneren Ring um den EB Radius herum im posterioren Teil des EB.

Fasst man alle erwähnten Funktionen des ZK zusammen, ergibt sich ein Bild: Der ZK scheint als Schaltstelle zwischen visuellen Reizen und motorischem Ausgang zu fungieren. Um ein gegebenes Verhalten zu generieren, müssen die eingehenden sensorischen und motorischen Signale gefiltert und integriert werden. Die hier aufgeführten Erkenntnisse aus Studien der letzten Jahrzehnte weisen darauf hin, dass der ZK als zentraler Mustergenerator (Assoziationsareal) fungiert. So zeigen auch die drei Veröffentlichungen aus dieser Doktorarbeit (Neuser et al. 2008; Poeck et al. 2008; Triphan et al. 2010), dass der ZK entscheidend an der sensomotorischen Integration von visuellen Stimuli beteiligt ist und sie liefern erste Erkenntnisse zu den beteiligten Zellen des neuronalen Netzwerkes.

4 *Lernen und Gedächtnis bei *Drosophila melanogaster**

Drosophila kann klassisch konditioniert werden auf Gerüche (Tully und Quinn 1985) oder auf visuelle Eigenschaften von Objekten (Liu et al. 2006). Belohnungs- und Bestrafungslernen wurden erfolgreich angewandt (Schwärzel et al. 2003; Schroll et al. 2006). Fliegen können auch operant konditioniert werden, z.B. auf einen Ort, wo sie gefährliche Hitze vermeiden können (Wustmann et al. 1996). Fliegen verfügen über verschieden lange Gedächtnisformen mit einer Dauer von nur ein paar Sekunden (z. B. das in dieser Arbeit beschriebene Orientierungsgedächtnis: Neuser et al. 2008), oder auch lebenslänglicher Dauer. Bei kurzzeitigen Gedächtnissen basieren die Prozesse der Gedächtnisbildung auf vorübergehenden Veränderungen an Synapsen, z. B. durch Phosphorylierung von Ionenkanälen. Informationen aus dem Kurzzeitgedächtnis werden durch Wiederholen oder Nutzen verstärkt in die haltbare Form des Gedächtnisses überführt. Langzeitgedächtnisse speichern Informationen für Tage bis Jahre und basieren auf einer dauerhaften Veränderung der morphologischen Plastizität von Synapsen oder deren Neubildung.

Eine grundlegende Rolle bei der Assoziation von Duft und Schock bei der klassischen Konditionierung spielt die doppelt regulierte Adenylylzyklase Typ I, welche einen sekundären Botenstoff, das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) in großen Mengen synthetisiert. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche u.a. K^+ -Hintergrundkanäle phosphoryliert und so die Stärke der Synapse vorübergehend verändert. Die Adenylylzyklase wird durch das Gen *rutabaga* kodiert (Levin et al. 1992). cAMP wird durch die Phosphodiesterase (PDE) abgebaut, welche durch *dunce* kodiert ist. Außerdem kann die

aktivierte Proteinkinase A den Transkriptionsfaktor CREB aktivieren und so die Proteinsynthese für die Bildung eines Langzeitgedächtnisses initiieren (Yin et al. 1995).

Neben der klassischen Konditionierung ist es möglich, *Drosophila melanogaster* operant zu konditionieren. Hierbei wird erst ein Reiz präsentiert, wenn eine bestimmte Reaktion der Fliege eintritt. Das Lernen erfolgt aus den Konsequenzen des eigenen Handelns. In einem Versuch nach Wustmann et al. (1996) wurden *Drosophila* Fliegen in eine kleine Testkammer gesetzt, welche immer dann auf einer Hälfte erhitzt wurde, wenn die Fliege die entsprechende Seite betrat. Hierbei zeigten die Fliegen währenddessen, als auch nach dem Abschalten der Hitze eine Vermeidung der Hitze assoziierten Hälfte. Für diese Gedächtnisleistung notwendig sind sowohl die Phosphodiesterase (PDE), als auch die ribosomale Serinkinase RSKII (Wustmann et al. 1996, Putz et al. 2004). Das Gen *ignorant* kodiert für die RSKII, welche auch in der vorliegenden Doktorarbeit notwendig ist.

Ergebnisse

1 Zusammenfassung der Veröffentlichung zum Orientierungsgedächtnis (Neuser et al. 2008, Nature) und Erklärung der eigenen Anteile

Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, and Strauss R. 2008. Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature*, 453:1244-7.

Die Studie befasst sich mit der Frage, ob *Drosophila melanogaster* in der Lage ist, sich die Position eines visuellen Objektes zu merken und diese Information auch nach dessen Verschwinden und nach einem Umweg in zielgerichtete Lokomotion umzusetzen. Die Arbeit basiert auf der damals bekannten Fähigkeit von Fliegen, den geraden Anlauf auf ein Zielobjekt weiter fortzusetzen, auch wenn dieses Ziel aus dem Blick verschwunden war (Strauss und Pichler 1998).

Als experimentelle Neuerung wurde ein ablenkendes, attraktives Objekt eingeführt, in dem Moment, in dem das ursprüngliche Zielobjekt der Fliege verschwand. Das zweite Objekt führte zu einer Richtungsänderung in der Lokomotion der Fliege. Nach dem Verschwinden dieses zweiten Objektes erinnern sich normale Fliegen in der überwiegenden Zahl der Versuche an ihr ursprüngliches Ziel und laufen auf dessen frühere Position zu, auch wenn es weiterhin unsichtbar blieb.

Dieses Experiment wurde in einer zylindrischen Arena mit einem Panorama aus rund 6000 computergesteuerten Leuchtdioden durchgeführt. Das hiermit erstmals nachgewiesene Orientierungsgedächtnis für Richtungen hält für wenige Sekunden. Trotzdem verbessert es das Lokomotionsverhalten entscheidend: Fliegen, die dieses Gedächtnis mutationsbedingt nicht zeigen, verlieren sofort die Richtung, nachdem das Ablenkungsobjekt abgeschaltet worden ist.

Zur Kartierung des Orientierungsgedächtnisses wurden zunächst Strukturmutanten des ZK eingesetzt, von denen die mit EB-Defekt nach dem Verlust des Sichtkontaktes die Laufrichtung nur noch zufällig wählten. Die Feinkartierung gelang mit dem GAL4/UAS-System. Es wurden GAL4-Treiber für alle bekannten Ringneuronenklassen des EB (R1-R3, R4m, R4d) mit UAS-TNT verkreuzt, um die chemischen Präsynapsen zu blockieren. Durch zusätzliches Einkreuzen des temperatursensitiven Transkriptionsfaktors GAL80^{ts} konnten die Kontroll- und Inaktivierungsexperimente in denselben Individuen durchgeführt werden. Die bei 18°C aufgezogenen Tiere zeigten alle ein normales Orientierungsgedächtnis, wohingegen nach Inkubation bei 33°C für 12 Stunden und anschließender Messung bei Zimmertemperatur

das Orientierungsgedächtnis in R1, R3 und R4d gestört war. Die Rolle der Ringneuronenklasse R2 wurde nicht evaluiert, da die Treiberlinie starke Expression im Ventralganglion aufweist und so die Lokomotion der Fliegen stark beeinträchtigt war.

Die Biochemie des Orientierungsgedächtnisses wurde anhand der *ignorant*-Nullmutante (*ign^{58/1}*) analysiert. *ign^{58/1}* Fliegen verlieren die Richtung, sobald keine Objekte mehr sichtbar sind. Die partielle Rettung des *ign^{58/1}* Defektes ausschließlich in den Ringneuronenklassen R3 und/oder R4d war notwendig und hinreichend, um das Gedächtnis wieder herzustellen. Dabei ist die adulte IGN-Expression hinreichend, wie GAL80^{ts} Experimente zeigen. Umgekehrt ergab die Herunterregulation der Translation von IGN in den Ringneuronengruppen R3 und R4d mittels RNA-Interferenz eine partielle aber signifikante Verschlechterung der Gedächtnisleistung.

Erklärung der eigenen Anteile

Kirsa Neuser, Burkhard Poeck und Roland Strauss konzipierten die Fragestellung der Arbeit und entwickelten die Experimente zu deren Beantwortung. Markus Mronz und Kirsa Neuser entwickelten das Ablenkexperiment. Markus Mronz und Tilman Triphan programmierten die automatische Videoaufnahme und –auswertung der Laufspuren. Kirsa Neuser führte alle Verhaltensexperimente und histologische Arbeiten durch und analysierte alle Daten. Kirsa Neuser, Burkhard Poeck und Roland Strauss schrieben die Veröffentlichung.

Analysis of a spatial orientation memory in Drosophila

Kirsa Neuser^{1,2}, Tilman Triphan¹, Markus Mronz¹, Burkhard Poeck¹ and Roland Strauss^{1,2}

1) Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie, Biozentrum, Universität Würzburg; Am Hubland; D-97074 Würzburg; Germany

2) Current address: Institut für Zoologie III - Neurobiologie, Universität Mainz; Col.-Kleinmann-Weg 2; D-55099 Mainz; Germany

Corresponding author: R.Strauss

e-mail: rstrauss@uni-mainz.de

phone: +49-(0)6131 3925034

fax: +49-(0)6131 3925443

Letter to Nature – Introductory Paragraph

Flexible goal-driven orientation requires that the position of a target be stored, especially in case the target moves out of sight. The capability to retain, recall and integrate such positional information into guiding behaviour has been summarized under the term spatial working memory¹. This kind of memory contains specific details of the presence that are not necessarily part of a long-term memory. Neurophysiological studies in primates² indicate that sustained activity of neurons encodes the sensory information even though the object is no longer present. Furthermore they suggest that dopamine transmits the respective input to the prefrontal cortex, and simultaneous suppression by GABA spatially restricts this neuronal activity³. Here we show that *Drosophila melanogaster* possess a similar spatial memory during locomotion. Using a new detour setup, we show that flies can remember the position of an object for several seconds after it has been removed from their environment. In this setup, flies are temporarily lured away from the direction towards their hidden target, yet they are thereafter able to aim for their former target. Furthermore, we find that the GABAergic (stainable with antibodies against GABA) ring neurons⁴ of the ellipsoid body in the central brain are necessary and their plasticity sufficient for a functional spatial orientation memory in flies. We also find that the protein kinase S6KII (*ignorant*)⁵ is required in a distinct subset of ring neurons to display this memory. Conditional expression of S6KII in these neurons only in adults can restore the loss of the orientation memory of the *ignorant* mutant. The S6KII signalling pathway therefore seems to be acutely required in the ring neurons for spatial orientation memory in flies.

Main Text

Previous studies have shown that walking flies heading for an object maintain their direction even when the target disappears⁶. This persistence of orientation can last for several seconds, indicating that flies store the position of, or the path towards, the hidden object for further targeting. We therefore proposed that flies form a spatial memory for objects that is similar to the working memory in vertebrates. To investigate this putative memory in *Drosophila* we established a detour paradigm for walking flies (Fig. 1a-f). Single flies were put into a cylindrical virtual-reality arena⁷, in which two dark vertical stripes were presented at opposite sites (Fig. 1a). Normally, flies patrol between the two visual objects for a considerable length of time⁸. In our new paradigm, the stripes disappeared when the fly crosses the invisible midline of the circular walking platform, and a new target appeared laterally at a 90° angle to the fly. In most cases wild-type flies turned towards this new target if it was presented for more than 500 ms (Fig. 1b). After the fly had orientated itself towards the new object (deviation of the fly's longitudinal body axis from the ideal course to the stripe below $\pm 15^\circ$), this target also disappeared within one second and no objects were visible to the fly. We then determined, whether the fly turned back to continue its approach to its initial, but still invisible, target (Fig. 1c-1f; see Methods and Supplementary Video). The walking traces (Fig. 1d) reveal a direct course towards the former location of the first target. The flies therefore retained positional information on the former object, although it was no longer present in the environment.

Wild-type (Canton-S) flies recall the old target and integrate it into a guided behaviour with a median frequency of 80 % (Fig. 1e) as measured in ten consecutive trails for each fly. Longer presentation of the distracter stripe did not significantly change the percentage of positive choices (Fig. 1e). These data strongly suggest that flies stored the relative position of the first target in a spatial orientation memory for at least four seconds. To exclude the possibility that flies used chemical traces of former runs for their orientation we randomly changed the absolute positions of the stripes after each trail. As a result of this randomization, flies had to update their memory continuously. Moreover, we could not observe any training effect, because the frequency of positive turns did not change during the ten consecutive trails (Fig. 1f). Similar performances were observed when two opposing distracters were presented to the fly (data not shown). We consider this orientation memory for vanished objects to be idiothetic. Because no visible landmarks were presented to the fly after the distracter disappeared, the fly could not use a stored reference picture of the environment for its guidance. We therefore suggest that the fly uses online stored information of its own angle

towards the former target, a strategy known as path integration. Path integration has been shown to be used by other insects, such as ants and bees, to navigate through a familiar landscape⁹.

In an attempt to localize this type of memory to discrete parts of the insect brain, several mutant lines with structural central-complex defects of *Drosophila* were analyzed¹⁰. The central complex is composed of four different neuropils (Fig. 2g) and has been implicated in supervising motor output during locomotion^{10, 11}. First tests showed that the persistence of orientation towards a removed target is reduced or lost whenever the ellipsoid body of the central complex was defective (Supplementary Fig. S1). We therefore tested the *ellipsoid body open* mutant (*ebo*^{KS263})¹⁰ in the detour paradigm; these flies did not show a preference for the first target after the detour, suggesting that an intact ellipsoid body is required for establishing a spatial orientation memory. In contrast, the use of hydroxyurea to ablate the mushroombodies, which are important in olfactory memory¹², did not disturb the orientation memory (Fig. 1g).

One prominent type of neuronal cells of the ellipsoid body is the group of GABAergic ring neurons⁴. The fibres of these neurons run in a prominent tract, the RF-tract (ring-neuron and tangential fan-shaped-body neuron tract), and form bushy thin endings in the ipsilateral lateral triangle and bleb-like endings in the ellipsoid body (Fig. 2g). Four different kinds of ring neuron (R1-R4) can be distinguished by their arborization pattern around the ellipsoid body canal. R1-R3 neurons project outwards from the ellipsoid body canal, whereas the arborization of R1 is restricted to the inner zone (Fig. 2f), that of R2 to the outer zone, and that of R3 to both zones (Fig. 2e). R4-neurons project from the periphery inwards and arborize in the outermost zone (Fig. 2d)¹³. We next proposed that the ring neurons might be necessary for the orientation memory. We used the GAL4/UAS system¹⁴ to silence distinct subsets of ring neurons through the expression of tetanus toxin (TNT)¹⁵ by using the GAL4 driver lines c232, c481 and c105 (ref. 13) (Fig. 2d-f and Supplementary Fig. S2). For temporal control, we induced TNT conditionally by using the temperature-sensitive GAL4 repressor GAL80^{ts} under the control of the ubiquitous *Tubulin* promoter (*tub*-GAL80^{ts})¹⁶. Experimental and control flies were raised at 18°C, tested within the detour paradigm, and retested after the induction of TNT. Pairwise comparison revealed that the preference for the original target was lost, whenever the toxin was expressed in ring neurons of the ellipsoid body (Fig. 2). This finding confirms our hypothesis that the ellipsoid-body ring neurons are necessary components of the orientation memory.

To investigate which molecular pathways are involved in this kind of memory, we first focused on the cyclic-AMP signalling pathway. Variable levels of cAMP have been shown to have a crucial function in memory formation during associative learning in *Drosophila*^{17, 18}. cAMP levels are modulated by the opposing actions of adenylyl cyclases and cAMP phosphodiesterases. Mutants for the adenylyl cyclase gene *rutabaga* (*rut*¹ and *rut*²⁰⁸⁰) were unable to target visual objects and could not be tested in our paradigm. We therefore tested mutants of the *dunce* gene (*dnc*), which encodes a cAMP phosphodiesterase, in the detour paradigm. The *dnc*¹ mutant is a hypomorph and displays about half of the enzyme activity in the wild type¹⁹. *dnc*¹ mutant flies show deficits in several paradigms of associative classical learning²⁰ and operant conditioning²¹. In contrast, *dnc*¹ mutants showed no defects in the detour paradigm (Fig. 3a), indicating that a tight modulation of cAMP levels might not be critically required for spatial orientation memory.

Another molecule involved in memory formation in *Drosophila* is a member of the ribosomal serine kinase (RSK) family. *ignorant* (*ign*) encodes the S6 kinase II (S6KII), which interacts with mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling in *Drosophila*²² and vertebrates²³. S6KII does not seem to be involved in cAMP signalling pathways. The null allele *ign*^{58/1} has been shown to be defective in classical aversive conditioning and operant learning⁵. We therefore tested *ign*^{58/1} flies in the detour paradigm. Although the mutants readily targeted visible objects, they showed no directional preference for the position of the original target after it disappeared, suggesting that they had lost their memory (Fig. 3a). In contrast, walking speed, walking activity and orientation towards visual objects were similar to those of the wild type (Supplementary Fig. 3). Next we examined whether *ign* is required in the ring neurons targeted by c232-GAL4 with the use of a UAS-*ign* RNA-mediated interference (RNAi) effector line²⁴. RNAi silencing in these ring neurons decreased the performance by half. This decrease in memory constitutes only a partial phenocopy of the null mutant, because the performance was not significantly different from that of the wild type or *ign*^{58/1} (Fig. 3b). Nevertheless, we interpret this result to suggest that *ign* is required in the ring neurons for spatial orientation memory.

To address the question, of whether restoring S6KII levels is sufficient to regain memory, we performed neuron-specific rescue experiments in the *ign*^{58/1} mutant background. S6KII was expressed pan-neuronally with *Appl*-GAL4 (ref. 25) and *elav*-GAL4 (ref. 26), and also specifically in the R3 and R4 ring neurons with c232-GAL4. In all three cases we observed a complete rescue (Fig. 4a). Next we examined whether *ign* function in the R3 and R4 ring neurons is acutely required for orientation memory. We therefore again made use of the

GAL80^{ts} transgene to rescue the *ign* phenotype only in the adult. Conditional expression of S6KII only in the R3 and R4 ring neurons resulted in a perfect rescue of the *ign* mutant (Fig. 4b). Our result-that acute S6KII expression in the R3 and R4 ring neurons accomplished a complete rescue-reveals that this very narrow subset of cells is sufficient for regaining a functional orientation memory. It has been reported that *Drosophila* S6KII negatively regulates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) by acting as a cytoplasmic anchor of the MAP kinase²². Further studies will determine whether the MAP kinase signalling pathway is required for this kind of memory task.

The relevant ring neurons use the inhibitory neurotransmitter GABA. Their circuitry and interconnections within the ellipsoid body are not yet known. Expression of the dDA1 dopamine receptor in the ellipsoid body has recently been shown²⁷. It is therefore possible that the same neurotransmitter systems as those used for visual-spatial memory in the monkey prefrontal cortex³ are used to establish orientation memory in the central complex of flies.

Methods Summary:

Fly Strains. Fly strains were raised on standard medium under a 14 h/10 h light/dark cycle. GAL4 strains c232, c481, and c105 were provided by D. Armstrong, and the UAS-*ign* and the *ign*^{58/1} strains by M. Heisenberg. *dnc*¹, *Appl*-GAL4, *elav*-GAL4, UAS-TNT, *Tub*-GAL80^{ts} and UAS-tau-GFP stocks were obtained from the Bloomington stock centre, and the UAS-*ign*-RNAi line from the Vienna Drosophila RNAi Center. Wild-type Canton-S flies served as control.

Statistics. Ten approaches of at least ten flies per genotype were recorded; the percentage of choices towards the vanished object was calculated for each fly, and the median frequency of positive choices was determined. Random behaviour would result in a preference value of 58% because there is a greater probability that a right turn will follow a left turn, and vice versa²⁸. Box-Whisker plots show the median (bold line), the mean (square), 25% and 75% quartiles (box), 10% and 90% quantiles (whiskers) and extreme values (stars). Because some data were not normally distributed (Shapiro-Wilks *W*-Test), we used the Kruskal-Wallis analysis of variance test for multiple comparisons, the Mann-Whitney *U*-test for independent comparisons and the sign test for dependent pairwise comparisons. The one-sample sign test was used to compare groups with the random value. Statistical analyses were performed with STATISTICA 7.0 (α -level 0.05 in all cases). See Supplementary Table 1 for all statistical calculations.

Histology. Ablations of the mushroom bodies with hydroxyurea were performed as described¹². Completeness of ablation was assessed with paraffin histology²⁹ for each test fly. Expression analysis of the GAL4 driver lines with a monoclonal anti-bovine TAU antibody (1:200 dilution; Sigma) on paraffin sections was conducted as described³⁰.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature

Received 18 February; accepted 15 April 2008.

Published online 28 May 2008.

References:

1. Postle, B. R. Working memory as an emergent property of the mind and brain. *Neuroscience* **139**, 23-38 (2006).
2. Chafee, M. V. & Goldman-Rakic, P. S. Matching patterns of activity in primate prefrontal area 8a and parietal area 7ip neurons during a spatial working memory task. *J. Neurophysiol.* **79**, 2919-2940 (1998).
3. Williams, G. V. & Castner, S. A. Prefrontal cortex and working memory processes. *Neuroscience* **139**, 251-261 (2006).
4. Hanesch, U., Fischbach, K.-F. & Heisenberg, M. Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* **257**, 343-366 (1989).
5. Putz, G., Bertolucci, F., Raabe, T., Zars, T. & Heisenberg, M. The S6KII (*rsk*) gene of *Drosophila melanogaster* differentially affects an operant and a classical learning task. *J. Neurosci.* **24**, 9745-9751 (2004).
6. Strauss, R. & Pichler, J. Persistence of orientation toward a temporarily invisible landmark in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. [A]* **182**, 411-423 (1989).
7. Strauss, R., Schuster, S. & Götz, K. G. Processing of artificial visual feedback in the walking fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **200**, 1281-1296 (1997).
8. Bülthoff, H., Götz, K. G. & Herre, M. Recurrent inversion of visual orientation in the walking fly, *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A.* **148**, 471-481 (1982).
9. Collett, T.S. & Collett, M. Memory use in insect visual navigation. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 542-552 (2002).
10. Strauss, R. & Heisenberg, M. A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* **13**, 1852-1861 (1993).

11. Strauss, R. The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr Opin Neurobiol.* **12**, 633-638 (2002).
12. De Belle, J. S. & Heisenberg, M. Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* **263**, 692-695 (1994).
13. Renn, S. C., Armstrong, J. D., Yang, M., Wang, Z., An, X., Kaiser, K. & Taghert, P. H. Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex. *J. Neurobiol.* **41**, 189-207 (1999).
14. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415 (1993).
15. Sweeney, S. T., Brodie, K., Keane, J., Niemann, H. & O'Kane, C. J. Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* **14**, 341-351 (1995).
16. McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. & Davis, R. L. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-8 (2003).
17. McGuire, S.E. Deshazer, M., Davis, R.L. Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Prog Neurobiol.* **76**, 328-347 (2005)
18. Liu, G., Seiler, H., Wen, A., Zars, T., Ito, K., Wolf, R., Heisenberg, M. & Liu, L. Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* **439**, 551-556 (2006).
19. Davis, R.L. & Kiger J.A. Jr. *Dunce* mutants of *Drosophila melanogaster*: mutants defective in the cyclic AMP phosphodiesterase enzyme system. *J Cell Biol.* **90**, 101-107 (1981).
20. Dudai, Y., Jan, Y. N., Byers, D., Quinn, W. G. & Benzer, S. *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 1684-1688 (1976).
21. Wustmann, G., Rein, K., Wolf, R. & Heisenberg, M. A new paradigm for operant conditioning of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A.* **179**, 429-436 (1996).
22. Kim, M., Lee, J. H., Koh, H., Lee, S. Y., Janq, C., Chunq, C. J., Sunq, J. H., Blenis, J. & Chung J. Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during *Drosophila* development. *EMBO J.* **25**, 3056-3067 (2006).
23. Myers, A. P., Corson, L. B., Rossant, J. & Baker, J. C. Characterization of mouse Rsk4 as an inhibitor of fibroblast growth factor-RAS-extracellular signal-regulated kinase signaling. *Mol. Cell Biol.* **24**, 4255-4266 (2004).
24. Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B. Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., & Dickson

- B.J. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448, 151-156 (2007).
25. Torroja, L., Chu, H., Kotovsky, I. & White, K. Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol.* **9**, 489-492 (1999).
26. Luo, L. Liao, Y.J., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila Drac1* is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* **8**, 1787-1802 (1994).
- 27 Kim, Y. C., Lee, H. G., Seong, C. S. & Han, K. A. Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr. Patterns* **3**, 237-245 (2003).
28. Mronz, M. Die visuell motivierte Objektwahl laufender Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) – Verhaltensphysiologie, Modellbildung und Implementierung in einem Roboter. PhD Thesis: University Würzburg (2004).
29. Heisenberg, M. & Boehl, K. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z. Naturforsch.* **34**, 143-147 (1979).
30. Botella, J. A., Kretschmar, D., Kiermayer, C., Feldmann, P., Hughes, D. A. & Schneuwly, S. Dereglulation of the Egfr/Ras signaling pathway induces age-related brain degeneration in the *Drosophila* mutant *vap*. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 241-250 (2003).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank M. Heisenberg for discussions and continuous support, D. Kretschmar for reading the manuscript, and E. Stepien-Bötsch for experimental contributions. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 554-B7, GRK 1156).

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.S. (rstrauss@uni-mainz.de).

Figure Legends:**Figure 1 Orientation memory in the detour-paradigm.**

a, A fly patrols between two vertical stripes shown on a cylindrical screen. On crossing the midline, the stripes disappear while simultaneously another one appears laterally to the fly. **b**, After the fly has turned toward the distracter for 1s this stripe disappears as well. **c**, Subsequently, it is determined whether the fly turns back towards its original target. **d**, Walking traces of four wild-type males. **e**, Prolonged distraction does not change the orientation memory ($p=0.22$). **f**, Percentage of positive choices for each of ten consecutive trails ($N=73$; $r^2=0.08$). **g**, Mushroom-body ablation (HU) does not impair the memory as compared to mock treatment ($p=0.25$). In contrast, *ebo*^{KS263} mutants show a reduced performance compared to wild-type flies ($p<10^{-3}$).

Figure 2 The ellipsoid-body ring neurons are necessary for orientation memory.

Conditional induction of tetanus toxin in **a**, R4 and R3 ring neurons (driver line c232), **b**, R3 ring neurons (line c481) and **c**, R1 ring neurons (line c105) leads to total memory loss [pair-wise comparisons non-induced (18°C) vs. induced (33°C), $p=0.004$, $p=0.01$, $p=0.05$]. All experimental groups chose randomly ($p=0.18$, $p=0.43$, $p=0.15$) whereas all control groups preferred the former target (full statistical account in Supplementary Table S1). **d**, **e**, **f**, Frontal paraffin sections of adult fly heads showing the expression patterns of the driver lines (UAS-tau-GFP reporter; scale bars 50µm). **d**, Line c232: strong staining of distal R4 and R3 ring neurons. **e**, Line c481: exclusive expression in R3 ring neurons. **f**, Line c105: R1 ring neurons and the ocellar nerve (arrow head). **g**, Frontal drawing of the *Drosophila* central complex (pb, protocerebral bridge, fb, fan-shaped body, eb, ellipsoid body, no, noduli). Localization of ring-neuron type R4 is shown. Ring neurons have their perikarya ventral to the eb. Their axons project via the RF-tract to the lateral triangles (ltr), where they form spiny arborisation, and on to the eb.

Figure 3 S6KII activity is necessary for the orientation memory. **a**, *dnc*¹ mutant flies do not differ in their memory performance from wild-type flies ($p=0.34$), whereas *ign*^{58/1} mutant flies show a complete memory loss ($p=0.012$). **b**, *ign*-RNAi silencing in the R3 and R4 ring neurons leads to a partially reduced orientation memory (RNAi vs. *ign*^{58/1} $p=0.27$; CS vs. RNAi $p=0.09$).

Figure 4 S6KII activity in the ring neurons is sufficient to restore the orientation memory. **a**, The memory loss of the *ign*^{58/1}; UAS-*ign* mutant (p=0.04) can be rescued by expressing S6KII protein either pan-neuronally (*Appl*-GAL4: p=0.58, *elav*-GAL4: p=0.63) or exclusively in R3 and R4 ring neurons (*c232*-GAL4: p=0.83). **b**, Conditional expression of *ign* in the R3 and R4 ring neurons is sufficient to restore the memory in the adult (p=0.001).

Figures

Figure 1

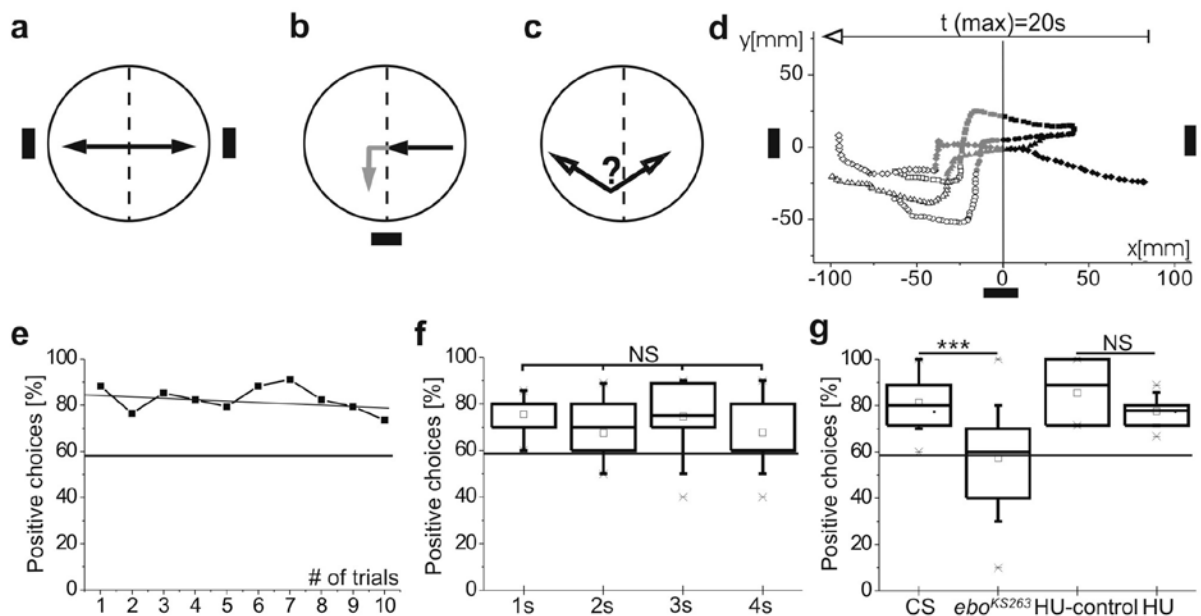


Figure 2

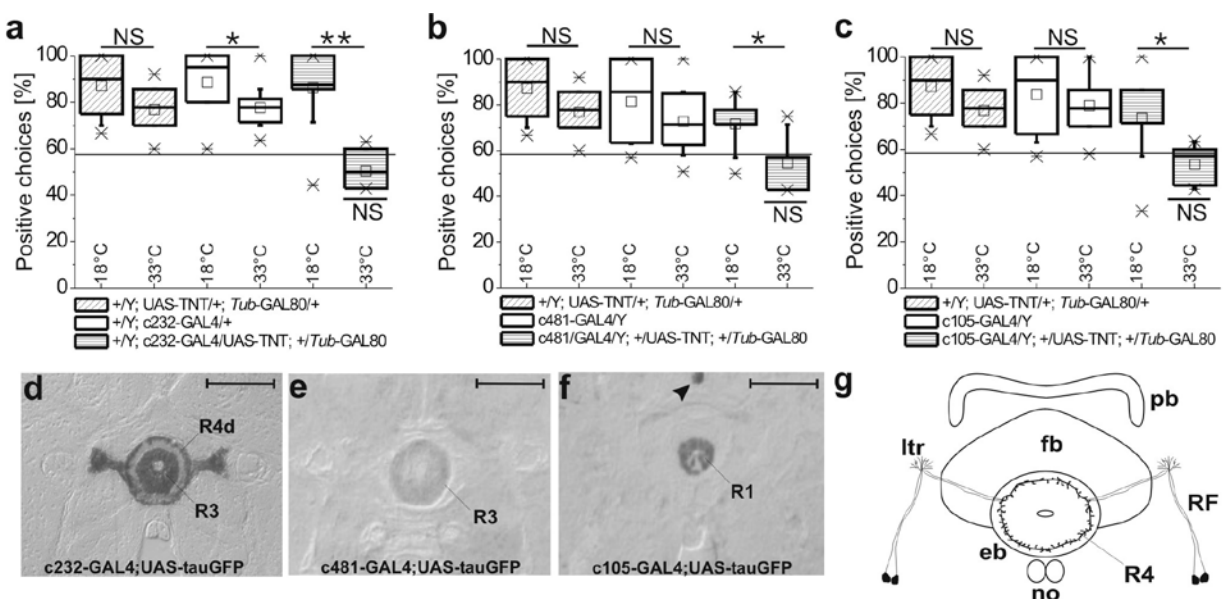


Figure 3

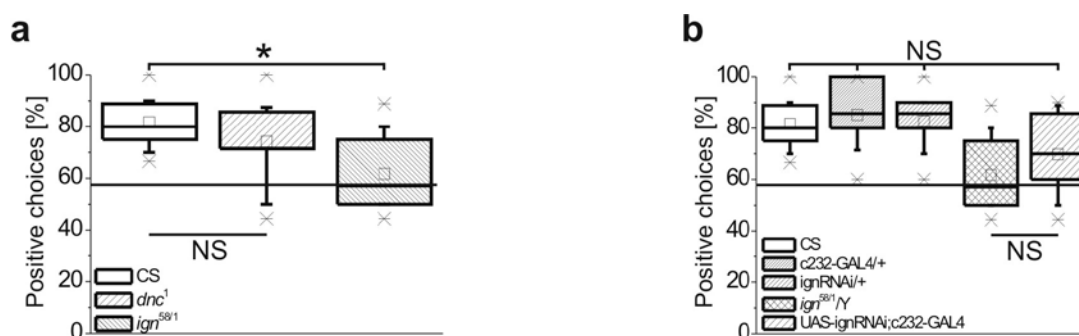
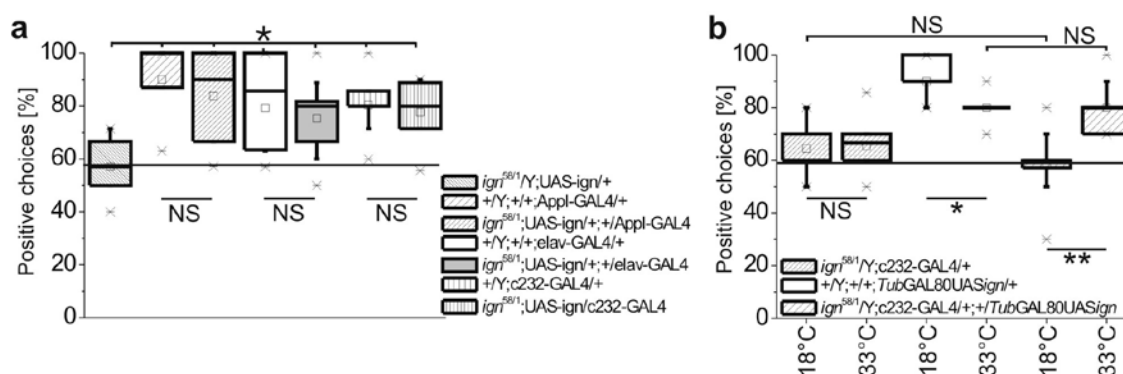


Figure 4



Full Methods

Detour paradigm: In all experiments three-to-five-days old male flies were used. One day prior to the experiment their wings were shortened under cold anaesthesia. Flies were kept individually over night on filter paper soaked with pure water. Experiments were carried out in a cylindrical LED-panorama on a 160-mm-diameter walking platform, surrounded by a water-filled moat to prevent flies from escaping. CCD video camera pictures taken from above were processed by a PC at 20Hz and reduced to 5Hz for noise reduction by a computer program¹⁰ modified by T. Triphan.

At the beginning of an experiment the virtual-reality arena displayed two dark opposing stripes with 12° horizontal and 50° vertical viewing angles as seen from the centre. An experiment started by placing a single fly into the centre of the arena. As soon as the fly had travelled once between these two stripes and crossed the midline again, these stripes disappeared. Simultaneously a vertical distracter stripe appeared laterally to the fly. Whenever the orientation of the fly's actual path increment towards this distracting stripe deviated less than $\pm 15^\circ$ from the direct path to the distracter, it disappeared after one second and no stripes were visible any more at this time point. We used the 1-second presentation of

the distracter in all experiments except for those in Fig. 1e. Linking the time of disappearance to the $\pm 15^\circ$ criterion guarantees that the fly actually fixates that novel object. Subsequently, it had been determined whether the fly turned back to its previous, still invisible, target. To detect such a turn the computer program first calculates the average angular deviation from the direct path to the distracter from the fly's three latest path increments before the distracter had disappeared. By definition, a choice was made as soon as a subsequent path increment deviated from this latter mean by more than $\pm 45^\circ$, either towards (termed a positive choice) or away from the initial target stripe (negative choice). After such a decision had been detected the two opposing stripes appeared again at a new, randomized position and the next of overall ten consecutive trials started whenever the fly crossed the midline again.

Conditional expression via the GAL80^{ts} system: For the conditional expression of UAS-TNT (ref. 15) or UAS-*ign* (ref. 5), a double homozygous stock with UAS-TNT; *Tub*-GAL80^{ts} (ref. 16) and a recombinant chromosome *Tub*-GAL80^{ts}, UAS-*ign* were established, respectively. Experimental and control flies were reared at 18°C and three-to-five-days old males, with clipped wings, were tested in the detour paradigm at room temperature. The individual flies were then incubated over night at the restrictive temperature (33°C). After a minimum recovery time of 3 hours at room temperature these flies were tested again.

2 Zusammenfassung der Veröffentlichung zur Rolle der Protocerebralbrücke bei der Schrittlängen-Kontrolle (Poeck et al. 2008, Dev. Biol.) und Erklärung der eigenen Anteile

Poeck B, Triphan T, Neuser K and Strauss R. 2008. Locomotor control by the central complex in *Drosophila* - an analysis of the *tay bridge* mutant. *Dev Neurobiol*, 68:1046-58.

In dieser Studie wurde die Rolle der PB mit Hilfe von genetischen Konstrukten des Gens *tay bridge* (*tay*) erforscht. Eine intakte *tay* Funktion wird für die Entwicklung der PB gebraucht; *tay*^l mutante Tiere weisen eine sagittale Einschnürung der PB auf. Sie laufen langsamer als Tiere des genetischen Hintergrunds WTB und mit stark verminderter Aktivität. Dadurch wurden sie in einem Laufmutanten-Screen isoliert. Sie strecken die Flügel im Laufen aus. Ihre optomotorische Kompensation im Laufen ist eingeschränkt.

Die Mutation wurde im Genom identifiziert. Die genomische Rettung führte zu einer vollständigen Rettung, das richtige Gen war gefunden. Eine cDNA des Gens wurde hinter UAS kloniert. Im mutanten Hintergrund *tay^l* konnte UAS-*tay⁺* nun genutzt werden, um differenzielle Rettungsexperimente mit verschiedenen GAL4-Treibern durchzuführen und notwendige Neuronengruppen für die Rettung der Verhaltensdefekte zu identifizieren. Die panneurale Expression mit *elav*-GAL4 oder *Appl*-GAL4 war zu schwach, um Verhaltens- und anatomische Phänotypen zu retten. Eine Rettung wurde mit 007y-GAL4 erreicht, das die Anatomie der PB, die Laufgeschwindigkeit und die optomotorische Kompensation ganz und die Aktivität partiell rettete. Das Expressionsmuster von 007y-GAL4 wurde mit immunhistologischen Präparaten charakterisiert. Die Linie treibt Expression in Bereichen der PB, des EB, des FB, der NO, der Ventralloben und der Pilzkörper. Das Expressionsmuster im ZK und den Ventralloben ließ den Schluss zu, dass das Horizontale Fasersystem adressiert wird. Da 007y-GAL4 auch in den Pilzkörpern exprimiert, wurde mit dem Pilzkörpertreiber mb247-GAL4 dessen Beteiligung an der Rettung kontrolliert. mb247-getriebene *tay*-cDNA im *tay^l* Hintergrund rettete unerwarteter Weise die optomotorische Kompensation, ohne die Struktur der PB wiederherzustellen. Eine weitere Kontrolle, bei der in den mit mb247 geretteten Tieren die Pilzkörper mit einem Zytostatikum ablatiert wurden, zeigten ebenfalls eine normale optomotorische Kompensation. Die Pilzkörper konnten also nicht für die Rettung verantwortlich sein. Der genaue Vergleich der Expressionsmuster von mb247 und 007y ergab in beiden Linien eine weitere, sehr schwache Expression in einer Schicht des FB, sowie in einem Paar absteigender Neurone aus dem Suboesophagealganglion.

Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, dass die PB für die differentielle Kontrolle der Schrittlänge gebraucht wird, wenn Objekte angelaufen werden sollen. Die Beeinflussung der Schrittlänge für die optomotorische Kompensation bedarf keiner *tay*-intakten PB und die Kompensation läuft entweder über den FB oder es werden die absteigenden Neurone gebraucht.

Mit Hilfe von GAL80^{ts} kontrollierter Expression von Tetanustoxin zur Inaktivierung chemischer Synapsen nur im Adultstadium wurde die Notwendigkeit des horizontalen Fasersystems für die akute Funktion der Schrittlängenkontrolle bestätigt.

Erklärung der eigenen Anteile

Burkhard Poeck und Roland Strauss konzipierten die Forschungsarbeit und entwickelten die Experimente. Burkhard Poeck führte alle molekularen Untersuchungen durch. Tilman

Triphan und Kirsa Neuser führten die Verhaltensexperimente durch und analysierten die Daten. Kirsa Neuser (Fig. 4 und Fig. 5) und Burkhard Poeck (Fig. 1) führten die anatomischen Untersuchungen durch und analysierten die anatomischen Daten. Kirsa Neuser führte alle statistischen Analysen aus. Burkhard Poeck und Roland Strauss schrieben die Veröffentlichung.

Locomotor Control by the Central Complex in *Drosophila* – An Analysis of the *tay bridge* Mutant

Burkhard Poeck, Tilman Triphan, Kirscha Neuser,* Roland Strauss*

Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie, Biozentrum, Universität Würzburg, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany

Received 6 December 2007; revised 11 February 2008; accepted 15 March 2008

ABSTRACT: Several aspects of locomotor control have been ascribed to the central complex of the insect brain; however, the role of distinct substructures of this complex is not well known. The *tay bridge*¹ (*tay*¹) mutant of *Drosophila melanogaster* was originally isolated on the basis of reduced walking speed and activity. In addition, *tay*¹ is defective in the compensation of rotatory stimuli during walking and histologically, *tay*¹ causes a mid-sagittal constriction of the protocerebral bridge, a constituent of the central complex. Cloning of the *tay* gene revealed that it encodes a novel protein with no significant homology to any known protein. To associate the behavioral phenotypes with the anatomical defect in the protocerebral bridge, we used different driver lines to express the *tay* cDNA in various neuronal subpopulations of the central brain in *tay*¹-

mutant flies. These experiments showed an association of the aberrant walking speed and activity with the structural defect in the protocerebral bridge. In contrast, the compensation of rotatory stimuli during walking was rescued without a restoration of the protocerebral bridge. The results of our differential rescue approach are supported by neuronal silencing experiments using conditional tetanus toxin expression in the same subset of neurons. These findings show for the first time that the walking speed and activity is controlled by different substructures of the central brain than the compensatory locomotion for rotatory stimuli. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *Develop Neurobiol* 68: 1046–1058, 2008
Keywords: *Drosophila*; locomotion; insect brain; insect behavior; functional brain analysis

INTRODUCTION

The central complex of the insect brain is located amid the protocerebral hemispheres and comprises four interconnected neuropilar regions: the fan-shaped body, the ellipsoid body, the protocerebral bridge, and the paired noduli [Fig. 1(A); Hanesch et al., 1989]. The central complex has been associ-

ated with functions in visual orientation, visual learning, and locomotor control. In locusts, it has been connected with sky-compass orientation, based on the identification of central complex neurons that carry the information on the E-vector orientation of polarized light (Vitzthum et al., 2002; Heinze and Homberg, 2007). Liu et al. (2006) have shown that the central complex plays a role in visual learning in *Drosophila* by locating the memory traces of different attributes of a particular object to different layers of the fan-shaped body. The walking analyses of *Drosophila* mutants that affect distinct brain structures associated the central complex with functions in the higher control of locomotion (Strauss and Heisenberg, 1993). In several behavioral paradigms, these mutant fly lines walked slowly, showed altered orientation behavior toward visual objects, and reacted less quickly to changing stimuli during flight,

*Present address: Institut für Zoologie III-Neurobiologie, Universität Mainz, Col.-Kleinmann-Weg 2, D-55099 Mainz, Germany.

Correspondence to: R. Strauss (rstrauss@uni-mainz.de).

Contract grant sponsor: German Federal Ministry of Research (BMBF; BioFuture grant); contract grant number: FKZ 03118550.

Contract grant sponsor: German Science Foundation (DFG grant); contract grant number: STR590/2-3.

© 2008 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 29 April 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/dneu.20643

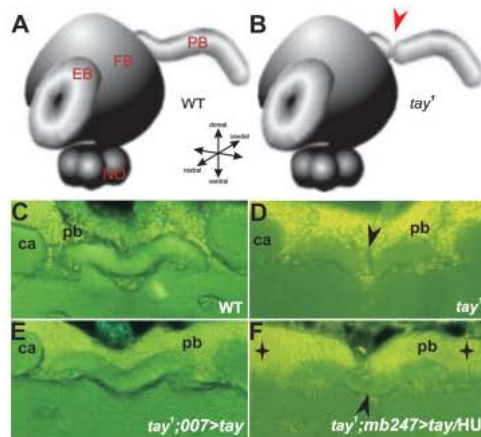


Figure 1 Structure of the central complex and morphology of the protocerebral bridge in wild-type and *tay*¹ mutant flies. (A) Schematic representation of the central complex of *Drosophila melanogaster*. eb, ellipsoid body; fb, fan-shaped body; no, noduli; pb, protocerebral bridge. (B) Schematic representation of the *tay*¹ phenotype. The arrowhead indicates a mid-sagittal constriction of the protocerebral bridge. (C–F) Horizontal paraffin sections through the protocerebral bridge. Perikarya emit bright yellow light and the neuropil emits green light due to their auto-fluorescence using short wavelength blue light (ca, calyx of the mushroom body). (C) Wild-type. (D) The protocerebral bridge of *tay*¹ mutant flies is interrupted at the sagittal midplane (arrowhead). (E) Rescued protocerebral bridge in *tay*¹/*Y*; UAS-*tay*/*II*; 007Y-GAL4/*III* flies. (F) The protocerebral bridge (arrowhead) in *tay*¹/*Y*; UAS-*tay*/*II*; mb247-GAL4/*III* rescue flies is still constricted. Hydroxyurea treatment results in an absence of the mushroom body calyces (asterisks).

respectively. Some of them were less active or lost activity quickly, others failed to start walking or flying under circumstances in which wild-type flies would readily do so (review Strauss, 2002). Several mutant lines with a partially split central complex (e.g., *single-minded* which has a divided fan-shaped body; Pielage et al., 2002) walked in circles indicating that the central complex is required to integrate visual input from both sides during orientation behavior (review Strauss, 2002).

In particular, the protocerebral bridge has been associated with the control of step length. Structural mutants like *no bridge* (Strauss et al., 1992), with a mid-sagittal lesion of the protocerebral bridge, and *eyeless* (*ey^{TD}*; Callaerts et al., 2001), which has a fragmented protocerebral bridge, are slower in walking speed than wild-type flies. This is because of their inability to increase step length concomitantly with stepping frequency. Because their swing phases are

of normal duration, it has been hypothesized that an intact protocerebral bridge and central complex are required to increase the leg swing speed with stepping frequency (Strauss et al., 1992). To extend our knowledge of the behavioral significance of the protocerebral bridge, we studied a newly isolated *tay bridge*¹ (*tay*¹) mutant. *tay*¹ was isolated because of its slow walking speed and its defective compensation of rotatory stimuli. For an in-depth structure-function analysis of the *tay* phenotype, we have identified the gene and established transgenic lines for partial rescue experiments of the structural phenotype. To verify that the protocerebral bridge is required for proper walking speed and activity, we used several GAL4 driver lines (Brand and Perrimon, 1993) to induce *tay* expression during development in defined substructures of the central complex. This result is confirmed by the expression of tetanus toxin (Sweeney et al., 1995) in columnar neurons of the protocerebral bridge, which reduced the locomotion speed and activity. In contrast, the optomotor compensation during walking is restored by expression of *tay* in a yet unknown part of the central brain.

MATERIALS AND METHODS

Flies

Flies were raised on standard medium (water, commeal, soy bean, agar, molasses, yeast, preservative methyl-4-hydroxybenzoate) at 25°C, 60% humidity, and 14 h/10 h light-dark cycles. Behavioral tests were performed on three-day-old males with Canton-S as wild-type control. The two lethal alleles *tay*¹ and *tay*² (EM26 and EM34 in Katzen, 1990) were tested as heterozygous females over *tay*¹. Wings were cut under cold anesthesia (+4°C) to 1/3 of their length on the evening prior to a behavioral experiment. Flies were kept individually on filter paper soaked with pure water over night. Experimental and control flies were tested in parallel at the same time of the day. The driver lines 007Y-GAL4, c232-GAL4, 210Y-GAL4, c819-GAL4 (Renn et al., 1999), NP2320-GAL4, NP3124-GAL4 (Liu et al., 2006), mb247-GAL4 (Tettamanti et al., 1997), and *elav*-GAL4 (Luo et al., 1994) are on the wild-type Canton-S genetic background (O'Dell et al., 1995). The mb247-DsRed line was provided by A. Fiala, Würzburg; (Riemensperger et al., 2005). *C(1)DX*, *y w f*, *y cv v f car*, *w¹¹¹⁸*, *ax¹ un⁴*, UAS-mCD8-GFP, and UAS-tau-GFP were obtained from the Bloomington stock center (Bloomington, IN).

Walking Speed in Fast Phototaxis

Benzer's countercurrent apparatus was used as described (Benzer, 1967); however, flies were given only 6 s in each trial to reach from the far end of the starting vials to the

row of relocatable vials. Five consecutive tests were used to determine the performance index. Flies were tested in groups of 50 males. They were food deprived for 6 h but had access to water before testing.

Walking Speed in Negative Geotaxis

Single flies with clipped wings were tested in clear, cylindrical polystyrene vials of 100 mm height and 49 mm diameter with black lids. Tests were performed on a black table in ambient light. The fly was gently shaken down to the bottom of the vial and the time taken from reaching the vertical wall to crossing a marker ring 82 mm above the bottom of the vial. When a fly jumped onto the wall, paused during upward walking, or walked spirally the "run" was discarded. Because flies still not always walk straight up the vertical path but sometimes obliquely to the gravitational force vector, we scored each individual fly 10 times and used only the fastest run from each fly (Strauss and Heisenberg, 1993). Those runs were then averaged for a mean maximum strain value.

Buridan's Paradigm

Walking and orientation behavior was analyzed using Buridan's paradigm as described (Strauss et al., 1992; Strauss and Pichler, 1998). Dark vertical stripes of 12° horizontal and 50° vertical viewing angle were shown on opposite sides of a translucent Perspex cylinder illuminated by four Tungsten ring lights from behind. Flies with clipped wings walked on an 85-mm diameter platform, which is placed in the center of the cylinder. The following parameters were extracted for each fly; total track length, track length per 3-min time interval, mean walking speed taken from all transitions of a fly between the visual objects, and total time spent in walking.

Optomotor Compensation During Walking

Single flies were stimulated two times for 5 min and in randomized order by the clockwise or counterclockwise rotation of a striped pattern around their circular walking platform. This platform (diameter 85 mm) was surrounded by water and the wings of the freely walking flies were clipped. The flies were tested two times for 5 min with 60 revolutions of the surrounding panorama per test. The striped pattern was generated on a cylindrical screen made of 5760 light-emitting diodes (virtual-reality arena, Strauss et al., 1997; spatial wavelength 36°, angular speed 72° s⁻¹, contrast frequency 2 Hz, luminance of the bright stripes 60 cd m⁻², luminance contrast 0.94). Tracks were recorded with a video scanning device described earlier (Strauss and Pichler, 1998).

Statistical Analysis

At least 10 flies per genotype were recorded in Buridan's paradigm and for optomotor compensation during walking,

Developmental Neurobiology

respectively. All data, with the exception of the Tetanus-toxin silencing experiments in Figure 5, were normally distributed (Shapiro-Wilks-*W*-Test; α -level 0.05 in all cases). Pair-wise *t*-tests (α -level 0.05) and Bonferroni corrections were performed using STATISTICA 7.0. For the data in Figure 5, we used the Kruskal-Wallis-ANOVA test for multiple comparisons, the Mann-Whitney-*U*-test for independent pair-wise comparisons and the Sign-test for dependent pair-wise comparisons. The One-Sample-Sign-test was used to compare groups to the random value. Box-Whisker plots represent the median (bold line), the mean (square), 25% and 75% quartiles (box), 10% and 90% quartiles (whiskers) and extreme values (stars).

Histology

After each behavioral experiment, experimental flies were analyzed for structural brain defects. Following fixation in Camoy's fixative, 7 μ m frontal serial paraffin sections were prepared and investigated under a fluorescence microscope using short wavelength blue light for stimulation. Under this condition, perikarya emit bright yellow light whereas the neuropil appears green without further staining. The collar technique was used to process up to 15 flies at the same time (Heisenberg and Böhl, 1979). For an expression analysis, all GAL4 driver lines were crossed to a UAS-tau-GFP effector line (Brand, 1995) and the pattern determined using a monoclonal antibody against the bovine TAU protein (Sigma T-5530) in a 1:100 dilution and the Vectastain Elite Kit, as described in Mühlig-Versen et al. (2005). For the coexpression analysis of 007Y-GAL4/UAS-mCD8-GFP and mb247-DsRed, antibody staining against GFP was performed as described in Thum et al. (2006), whereas DsRed was recorded during confocal microscopy on the basis of its auto-fluorescence.

Ablation of the Mushroom Bodies

Mushroom bodies were ablated in *tay¹/Y*; UAS-*tay/II*; mb247-GAL4/III flies by feeding the cytostatic substance hydroxyurea to larvae following the procedure of de Belle and Heisenberg (1994). For controls, larvae underwent the same handling and washing procedures without the addition of hydroxyurea.

Conditional Silencing Experiments

The protocol for conditional silencing is based on a study of tetanus toxin efficiency by Thum et al. (2006). All flies were raised at 18°C during the entire development up to the adult stage. Two-day-old flies were analyzed as described earlier for walking speed, activity and optomotor behavior, respectively. Individual flies were then incubated for 12–16 h at 33°C in a water bath and retested after 3 h of recovery at room temperature. The UAS-TNT; *Tub*-GAL80^{ts} line was kindly provided by H. Tanimoto (Würzburg).

row of relocatable vials. Five consecutive tests were used to determine the performance index. Flies were tested in groups of 50 males. They were food deprived for 6 h but had access to water before testing.

Walking Speed in Negative Geotaxis

Single flies with clipped wings were tested in clear, cylindrical polystyrene vials of 100 mm height and 49 mm diameter with black lids. Tests were performed on a black table in ambient light. The fly was gently shaken down to the bottom of the vial and the time taken from reaching the vertical wall to crossing a marker ring 82 mm above the bottom of the vial. When a fly jumped onto the wall, paused during upward walking, or walked spirally the "run" was discarded. Because flies still not always walk straight up the vertical path but sometimes obliquely to the gravitational force vector, we scored each individual fly 10 times and used only the fastest run from each fly (Strauss and Heisenberg, 1993). Those runs were then averaged for a mean maximum strain value.

Buridan's Paradigm

Walking and orientation behavior was analyzed using Buridan's paradigm as described (Strauss et al., 1992; Strauss and Pichler, 1998). Dark vertical stripes of 12° horizontal and 50° vertical viewing angle were shown on opposite sides of a translucent Perspex cylinder illuminated by four Tungsten ring lights from behind. Flies with clipped wings walked on an 85-mm diameter platform, which is placed in the center of the cylinder. The following parameters were extracted for each fly; total track length, track length per 3-min time interval, mean walking speed taken from all transitions of a fly between the visual objects, and total time spent in walking.

Optomotor Compensation During Walking

Single flies were stimulated two times for 5 min and in randomized order by the clockwise or counterclockwise rotation of a striped pattern around their circular walking platform. This platform (diameter 85 mm) was surrounded by water and the wings of the freely walking flies were clipped. The flies were tested two times for 5 min with 60 revolutions of the surrounding panorama per test. The striped pattern was generated on a cylindrical screen made of 5760 light-emitting diodes (virtual-reality arena, Strauss et al., 1997; spatial wavelength 36°, angular speed 72° s⁻¹, contrast frequency 2 Hz, luminance of the bright stripes 60 cd m⁻², luminance contrast 0.94). Tracks were recorded with a video scanning device described earlier (Strauss and Pichler, 1998).

Statistical Analysis

At least 10 flies per genotype were recorded in Buridan's paradigm and for optomotor compensation during walking,

Developmental Neurobiology

respectively. All data, with the exception of the Tetanus-toxin silencing experiments in Figure 5, were normally distributed (Shapiro-Wilks-*W*-Test; α -level 0.05 in all cases). Pair-wise *t*-tests (α -level 0.05) and Bonferroni corrections were performed using STATISTICA 7.0. For the data in Figure 5, we used the Kruskal-Wallis-ANOVA test for multiple comparisons, the Mann-Whitney-*U*-test for independent pair-wise comparisons and the Sign-test for dependent pair-wise comparisons. The One-Sample-Sign-test was used to compare groups to the random value. Box-Whisker plots represent the median (bold line), the mean (square), 25% and 75% quartiles (box), 10% and 90% quartiles (whiskers) and extreme values (stars).

Histology

After each behavioral experiment, experimental flies were analyzed for structural brain defects. Following fixation in Carnoy's fixative, 7 μ m frontal serial paraffin sections were prepared and investigated under a fluorescence microscope using short wavelength blue light for stimulation. Under this condition, perikarya emit bright yellow light whereas the neuropil appears green without further staining. The collar technique was used to process up to 15 flies at the same time (Heisenberg and Böhl, 1979). For an expression analysis, all GAL4 driver lines were crossed to a UAS-*tau*-GFP effector line (Brand, 1995) and the pattern determined using a monoclonal antibody against the bovine TAU protein (Sigma T-5530) in a 1:100 dilution and the Vectastain Elite Kit, as described in Mühlig-Versen et al. (2005). For the coexpression analysis of 007Y-GAL4/UAS-mCD8-GFP and mb247-DsRed, antibody staining against GFP was performed as described in Thum et al. (2006), whereas DsRed was recorded during confocal microscopy on the basis of its auto-fluorescence.

Ablation of the Mushroom Bodies

Mushroom bodies were ablated in *tay*¹/*Y*; UAS-*tay*/*II*; mb247-GAL4/*III* flies by feeding the cytostatic substance hydroxyurea to larvae following the procedure of de Belle and Heisenberg (1994). For controls, larvae underwent the same handling and washing procedures without the addition of hydroxyurea.

Conditional Silencing Experiments

The protocol for conditional silencing is based on a study of tetanus toxin efficiency by Thum et al. (2006). All flies were raised at 18°C during the entire development up to the adult stage. Two-day-old flies were analyzed as described earlier for walking speed, activity and optomotor behavior, respectively. Individual flies were then incubated for 12–16 h at 33°C in a water bath and retested after 3 h of recovery at room temperature. The UAS-TNT; *Tub*-GAL80^{ts} line was kindly provided by H. Tanimoto (Würzburg).

Molecular Techniques

Sequence analysis of the *tay* alleles was done by direct sequencing of genomic PCR products and genomic fragments in the case of *tay*^{EM26}. P{*tay*}: A genomic fragment containing 1 kb up- and 1.3 kb downstream sequences of the annotated *tay* gene (CG9056, The FlyBase Consortium, 2003) was cloned via linker PCR (Expand Hi-Fidelity, Roche, Mannheim, Germany) using wild-type Berlin DNA and inserted into the transformation vector pUAST (Brand and Perrimon, 1993). UAS-*tay*: For differential rescue experiments cDNA fragment of clone LD22609 [obtained from the Berkeley Genome Project, Berkeley, CA; (Stapleton et al., 2002)] was cloned into pUAST and transformed into the *w*¹¹¹⁸ strain following standard protocols (Spradling and Rubin, 1982).

RESULTS

The *tay bridge*¹ (*tay*¹) mutant line was identified in a behavioral screen of chemically induced, X-linked locomotor mutants. The male offspring of ethylmethane-sulfonate-treated (EMS) males were pre-screened in groups of 50 flies for their performance in a fast phototaxis test. If startled in a narrow environment, flies run toward a light source in order to initiate an escape flight. Originally developed by Benzer (1967) to isolate fast phototaxis mutants, we modified the paradigm to identify walking speed mutants, by giving the flies only 6 s to reach from the end of the starting vial to the relocatable tube. Flies were separated with regard to their reaction time and walking speed in five consecutive steps. We tested 10,750 flies and retained about 2000 flies which showed suboptimal performance in this first test. From these male flies, a stable *C(1)DX, y w f* balancer stock was generated in about 1200 cases. These lines were then rescreened for fast phototaxis in groups of 50 flies per line. If the mean number of successful transitions toward the light was at least 20% below the wild-type score, we measured the walking speed in negative geotaxis and the ability to orient and walk toward visible objects in Buridan's paradigm, to separate lines with visual-system defects from lines with locomotor-system defects. With these screening procedures, we were able to establish 230 lines with consistent walking defects which were kept for further analysis.

Behavioral Defects of *tay*¹

*tay*¹ mutant flies showed a more than 70% reduction in their transitions toward the light source in the fast phototaxis paradigm compared to wild-type (data not

shown). To distinguish between a visual-system defect and a motor-system or motor-control-system defect, *tay*¹ flies were next tested in a negative geotaxis paradigm. This allows the measurement of the mean maximum walking speed when climbing up the vertical wall. *tay*¹ flies reached an average speed of just one ninth of the wild-type speed (*tay*¹: 2.7 ± 0.3 mm s⁻¹; CS: 24.0 ± 0.7 mm s⁻¹) indicating a motor defect. However, the most informative walking test turned out to be the Buridan's paradigm (Götz, 1980; Strauss et al., 1992), in which wild-type flies continuously walk on their own accord between two inaccessible visual objects. In this paradigm, the tracks are recorded by an overhead video tracking device which allows determining walking speed, walking activity, time course, and orientation capacity of the flies towards visual objects. These recordings revealed, that the mean time that *tay*¹ flies actively walked during the 15-min recording time was drastically reduced ($12.2 \pm 2.3\%$) in comparison to the wild-type CS [$48 \pm 5.0\%$; $p = 3.6 \times 10^{-8}$; Fig. 2(A)]. The walking speed of *tay*¹ flies is less than half of that of normal flies [Fig. 2(B); *tay*¹: 7.5 ± 1.0 mm s⁻¹; CS: 14.1 ± 0.9 mm s⁻¹; $p = 3.9 \times 10^{-4}$]. Although the tracks of *tay*¹ flies are somewhat less straight than those of wild-type flies [Fig. 2(D–F)] they clearly walk towards the visual objects and are therefore able to see and approach stationary objects.

Next we asked whether *tay*¹ is affected in optomotor compensation during walking (Strauss et al., 1997). When presented with a surrounding rotating grating, wild-type flies start turning in the sense of the rotation of the pattern. Such optomotor compensation requires motion vision and the ability to walk in curves or to turn on the spot. Although all *tay*¹ flies showed a certain degree of compensation in this assay and were able to turn and walk in curves, none of the mutants could compensate to a wild-type degree. To quantify this behavior, we determined an "overall gain" which is defined as the sum of the recorded angular displacements of a fly, divided by the 60 full revolutions of the grating they have seen during the 5-min test period. The mean overall gain of CS flies amounted to 0.73 ± 0.03 , whereas *tay*¹ flies showed only 0.41 ± 0.04 [$p = 2.24 \times 10^{-6}$; Fig. 2(C)].

Neuroanatomical Defects of *tay*¹

The protocerebral bridge consists of 16 glomeruli arranged in a linear row of latero-lateral orientation. The ends of the bridge are bent ventrally so that its overall appearance is reminiscent of a bicycle's handlebar. Nerve fibers running horizontally along the

Developmental Neurobiology

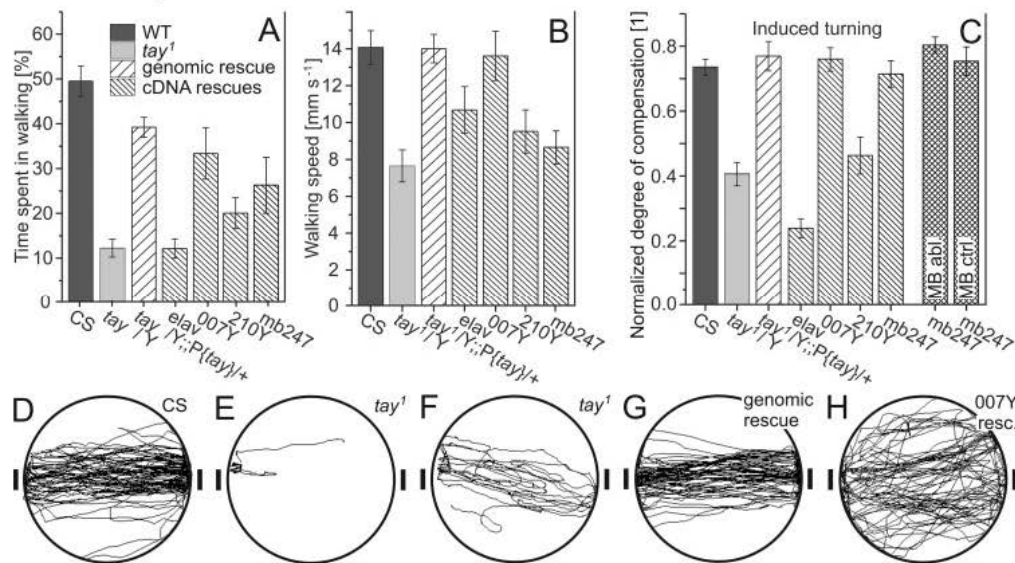


Figure 2 Walking behavior in Buridan's paradigm and optomotor compensation. In Buridan's paradigm flies keep walking back and fro between two inaccessible landmarks. (A–C) The behavior of *tay¹* mutant flies was compared to wild-type CS, the genomic rescue *tay¹/Y; P{tay}^{DI}/III* and various cDNA rescues using the different driver lines: *elav-GAL4*, *007Y-GAL4*, *210Y-GAL4*, and *mb247-GAL4* (*tay¹/Y; UAS-tay/+; P{GAL4}*). (A) Mean fraction of time spent in walking during a 15 min test period. (B) Mean walking speed. (C) Optomotor compensation while walking. The bars indicate the mean fractions of compensation of the flies by turning with a surrounding striped pattern. In two times 5 min this pattern completed 60 clockwise and 60 counterclockwise rotations (order randomized). "MB abl.": *tay¹/Y; UAS-tay/+; mb247-GAL4/+* with ablated mushroom bodies; "MB ctrl.": handling control with intact mushroom bodies. Ten to 12 male flies per genotype were used in all three assays. Bars represent means and all error bars indicate SEMs (for details see material and methods). (D–H) Typical examples of 15-min walking traces recorded in the Buridan paradigm.

glomeruli give the bridge a smooth appearance. In gross morphological preparations the boundaries between the glomeruli are therefore invisible—even at the sagittal midplane [Fig. 1(A,C)]. In contrast, the protocerebral bridge of *tay¹* flies shows a constriction at the sagittal midplane or, rarely, several constrictions between more lateral, adjacent glomeruli on both sides of the brain [Fig. 1(B,D)]. This phenotype suggests a reduction of contra-lateral projections connecting the glomeruli from both sides of the brain. No other structural defects were evident on the light microscopic level.

Identification of the *tay* Gene

Classical recombination mapping using the protocerebral bridge phenotype of *tay¹* and the five recessive, visible marker mutations *yellow*, *crossveinless*,

vermillion, *forked*, and *carnation* (*y cv v f car*) localized the *tay* gene to map position 50 ± 2 cM (57 flies). Subsequent complementation analysis with several chromosomal aberrations placed the *tay* gene to an interval of roughly 200 kb on the basis of non-complementing the deletion *Df(1)19* (13F2-14E; Walch, 2002) and the duplication *Dp(1;4)r⁺f⁺ medium* (14A2-16A7; Rauskolb et al., 1993). In addition, we identified two EMS induced lethal mutations (EM26 and EM34; Katzen, 1990) mapping to this area, as alleles of the *tay* gene and hence they were called *tay²* and *tay³*, respectively. To confine the *tay* region further, we performed a recombination mapping based on restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) by crossing the vital *tay¹* allele to a line carrying the two neighboring recessive mutations *scalloped* (*sd¹*, 13F1-2) und *uneven* (*un⁴*, 14C5-15A4). *sd* is located distally (right next) to *tay*, whereas *un* maps about 3 cM proximally to *sd* (Lindsley and

third chromosome reverted all known anatomical and behavioral phenotypes of the three alleles when analyzed in mutant males (Fig. 2 and data not shown).

Differential Rescues of the *tay* Mutant

For differential rescue experiments, the cDNA (LD22609; Stapleton et al., 2002) of *tay* was cloned into the pUAST vector (Brand and Perrimon, 1993) and several independent transgenic lines (*UAS-tay*) were established. We then induced expression of *tay* in different neuronal subpopulations using the *UAS/GAL4* system. In a first experiment, we induced *tay* expression pan-neuronally using the driver line *elav-GAL4* (Luo et al., 1994) which, however, did not rescue the gross morphological defect of the protocerebral bridge observed in *tay¹*. In addition, when *tay¹/Y; UAS-tay/II; elav-GAL4/III* males were tested in the Buridan's paradigm these flies had no more inclination to walk than *tay¹* flies [Fig. 2(A); *elav* rescue: $12.9 \pm 2.7\%$ of time; CS: $48.0 \pm 5.0\%$; *tay¹*: $12.2 \pm 2.3\%$; difference rescue/*tay¹*: $p = 4.2 \times 10^{-7}$] although they showed a normal orientation behavior towards the vertical stripes (data not shown). However, after initiating walking, these flies were able to walk faster than *tay¹* mutant flies and were not significantly different from CS flies [Fig. 2(B); *elav* rescue: $10.6 \pm 1.6 \text{ mm s}^{-1}$; CS: $14.1 \pm 0.9 \text{ mm s}^{-1}$; rescue/CS $p = 0.36$]. However, this constitutes only a partial rescue because the overall walking speed of the rescued flies was also not significantly different from *tay¹* ($7.55 \pm 0.97 \text{ mm s}^{-1}$; rescue/*tay¹* $p = 0.6$). We also found no improvement of the poor optomotor compensation of walking *tay¹* flies after expression of *tay* via *elav-GAL4* [Fig. 2(C); degree of compensation *elav* rescue: 0.24 ± 0.03 ; rescue/CS $p = 3.5 \times 10^{-10}$; rescue/*tay¹* $p = 0.016$]. In summary, *elav* driven *tay* expression slightly improved the walking speed and orientation but none of the other behavioral defects, nor was the normal structure of the protocerebral bridge restored (data not shown). Similar results were obtained using another pan-neuronal driver (*Appl-GAL4*; data not shown) and these results are most likely due to the weak expression level of these *GAL4* lines (e.g., Kretschmar et al., 2005). Therefore, we used additional *GAL4* lines which resulted in higher expression levels, especially in the protocerebral bridge.

Rescue Experiments With 007Y-GAL4

The driver line 007Y-GAL4 (Renn et al., 1999) was chosen for further rescue experiments because of its

Developmental Neurobiology

strong expression in the protocerebral bridge. In addition, expression is seen in the ellipsoid body, in a dorsal and a ventral-to-middle layer of the fan-shaped body, in the noduli, and in most parts of the mushroom bodies [using *UAS-tau-GFP* and staining with an anti-TAU antibody; Fig. 4(A)]. The weakly stained middle layer of the fan-shaped body is connected to the stained outer ring of the ellipsoid body. 007Y-GAL4 is also expressed in the w-, x-, y-, and z-bundles which are formed by columnar projection systems between the bridge and the fan-shaped body (Hanesch et al., 1989). We cannot exclude that there might be additional staining in bridge intrinsic neurons as described in Hanesch et al. (1989). Induction of *tay* using 007Y-GAL4 in the *tay¹* mutant rescued the protocerebral bridge phenotype because no signs of constriction in the sagittal midplane were seen in these rescue flies [Fig. 1(E)]. In Buridan's paradigm, the overall walking activity of *tay¹/Y; UAS-tay/II; 007Y-GAL4/III* flies was significantly improved ($33.4 \pm 5.7\%$) compared to *tay¹* [rescue/*tay¹*: $p = 0.024$; Fig. 2(A)] and not different from wild-type (rescue/CS $p = 0.075$). Similarly, the walking speed of 007Y-GAL4 rescue flies ($13.6 \pm 1.4 \text{ mm s}^{-1}$) was indistinguishable from wild-type CS [Fig. 2(B)] while it is clearly faster than the walking speed of *tay¹* ($p = 0.010$). The orientation capacity of the rescued flies towards landmarks is markedly increased compared to that of *tay¹* flies and only slightly worse than that of CS flies [Fig. 2(H)]. Moreover, the 007Y-GAL4 rescue flies are perfectly able to compensate for optomotor stimuli by turning with the pattern in a wild-type fashion [Fig. 2(C); degree of compensation: 0.76 ± 0.04 ; rescue/*tay¹*: $p = 1.6 \times 10^{-5}$]. In summary, 007Y-GAL4 induced expression of the *tay* cDNA rescues the neuroanatomical defects and all behavioral deficits that we studied. These results suggest that the rescue capability of 007Y-GAL4 is due to the expression of *tay* in the protocerebral bridge. To test this hypothesis, we performed similar rescue experiments with another *GAL4* line that is also expressed in the protocerebral bridge.

Rescue Experiments With 210Y-GAL4

To verify our results with 007Y-GAL4, we used another driver line (210Y-GAL4; Renn et al., 1999), which also expresses strongly in the protocerebral bridge. In addition, this line induces expression in the fan-shaped body and in the median bundle [Fig. 4(B)]. Weak expression is found in the noduli, in a boundary layer of glia around the entire mushroom bodies, in the entire dorsal protocerebrum, and in the

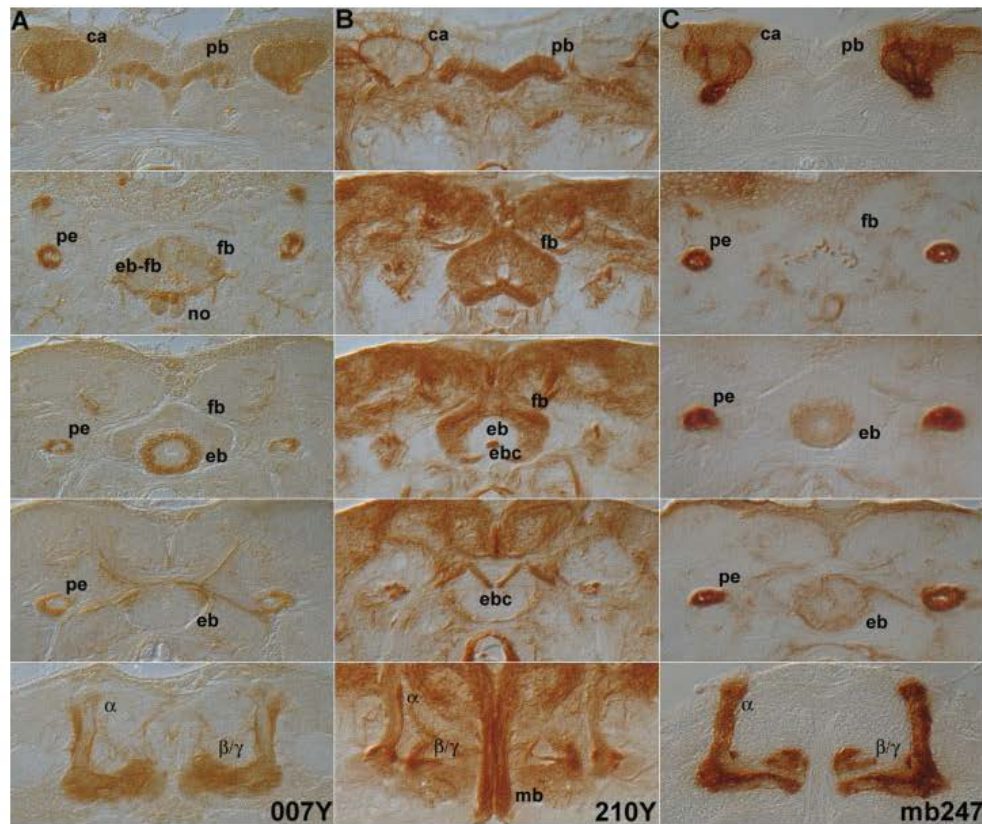


Figure 4 Expression analysis of the different GAL4 driver lines used in the rescue experiments. (A) 007Y-GAL4, (B) 210Y-GAL4, and (C) mb247-GAL4 were crossed to UAS-tau-GFP and 7 μ m-frontal paraffin sections from these flies were then stained with an antibody against bovine TAU. Sections are organized from posterior (uppermost row) to anterior (lowermost row). Constituents of the central complex are marked with pb, protocerebral bridge; fb, fan-shaped body; eb, ellipsoid body; no, noduli; eb-fb, ellipsoid- and fan-shaped body connecting neurons; ebc, ellipsoid-body canal. Constituents of the mushroom bodies are labeled with ca, calyx, pe, peduncle, and α , β/γ , α -, β/γ -lobes. mb, median bundle.

optic lobes, specifically in the serpentine layer of the medulla. Interestingly, we observed that the expression pattern of 210Y-GAL4 in the protocerebral bridge is clearly distinct from the pattern induced by 007Y-GAL4. In 210Y-GAL4, the w-, x-, y-, and z-bundles are not stained and the bridge has a compact appearance, whereas the 007Y-GAL4 staining pattern shows a glomerular structure. We therefore assume that 210Y-GAL4 is specific for latero-lateral elements of the bridge, whereas 007Y-GAL4 stains sets of columnar elements, which connect the bridge with the other neuropilar regions of the central complex. With the exception of the ellipsoid-body canal, the ellipsoid body is devoid of 210Y-GAL4 signal.

Surprisingly, *tay*¹/*Y*; UAS-*tay*/*II*; 210Y-GAL4/*III* flies showed no rescue of the defective protocerebral bridge (data not shown), nor were their behavioral deficits significantly improved. Neither the walking activity [Fig. 2(A); $20.0 \pm 3.4\%$; *rescue/tay*¹ $p = 0.438$] nor the walking speed of these flies (9.6 ± 1.2 mm s⁻¹; $p > 0.77$) is significantly different from *tay*¹ in Buridan's paradigm [Fig. 2(B)]. The capacity of 210Y-GAL4 rescued flies to orient towards visual objects is indistinguishable from CS flies, but their ability to compensate for optomotor stimuli is still impaired [Fig. 2(C); 0.47 ± 0.06 ; *rescue/CS* $p = 0.002$]. We therefore conclude that expression of *tay* in the columnar elements of the protocerebral bridge,

Developmental Neurobiology

which are stained by 007Y-GAL4 but not by 210Y-GAL4, is required to restore wild-type walking speed and activity in the *tay¹* mutant. In contrast, the latero-lateral elements of the bridge, which are stained by 210Y-GAL4 and not by 007Y-GAL4, are not involved in these behavioral aspects. Moreover, line 210Y-GAL4 was not able to rescue the optomotor response phenotype, although it induces expression of *tay* in many parts of the central complex. To test whether other parts of the central complex play a role in the compensatory walking defect in *tay¹*, we tested other driver lines [c232-GAL4, c819-GAL4 (Renn et al., 1999), NP2320-GAL4 and NP3124-GAL4 (Liu et al., 2006)] to express *tay* in the central complex. However, none of these lines were able to rescue the compensatory turning of *tay¹* (data not shown), suggesting that most parts of the central complex are not involved in the optomotor response defects observed in *tay¹*.

Rescue Experiments With mb247-GAL4

The driver line 007Y-GAL4 also expresses in specific neurons of the ellipsoid body, the noduli, and the mushroom bodies. To exclude that these structures are involved in the rescue ability of 007Y-GAL4, we used the mb247-GAL4 (Tettamanti et al., 1997) line which is expressed in these neuropils, while omitting the protocerebral bridge. This line induces strong expression in all parts of the mushroom bodies [Fig. 4(C)] and a weaker expression in a middle layer of the fan-shaped body and in an outer ring of the ellipsoid body. In the optic lobes mb247-GAL4 drives expression in glial cells of the inner chiasm. The mb247-GAL4 driven expression of *tay* does not rescue the *tay¹*-incision of the protocerebral bridge [Fig. 1(F)]. In Buridan's paradigm, we found an intermediate walking activity of *tay¹/Y; UAS-tay/II; mb247-GAL4/III* flies, which is significantly higher than in *tay¹* [Fig. 2(B); $26.3 \pm 6.2\%$; $p = 0.198$] but well below CS activity ($p = 0.013$). The walking speed of these flies, however is not significantly different from *tay¹* and below that of the wild-type [Fig. 2(C); $8.64 \pm 0.89 \text{ mm s}^{-1}$, rescue/CS: $p = 0.003$], whereas the orientation capacity towards landmarks is in the range of CS flies. Surprisingly, the optomotor compensation defect of *tay¹* flies is fully rescued by mb247 driven expression of *tay* [Fig. 3(A); 0.72 ± 0.04 ; rescue/*tay¹*: $p = 1.76 \times 10^{-4}$], despite the persisting incision of the bridge [Fig. 1(D)].

We therefore asked whether the mushroom bodies are required for optomotor compensation during walking because both, 007Y-GAL4 and mb247-

GAL4 lead to the expression of *tay* in the mushroom bodies. The mushroom bodies can be obliterated from the *Drosophila* brain by chemical ablation (via hydroxyurea application), because in a narrow, early larval time window their neuroblasts are the only dividing cells in the brain (de Belle and Heisenberg, 1994). Flies treated with hydroxyurea were individually inspected for proper ablation of the mushroom bodies and for the structural integrity of the protocerebral bridge after performing behavioral tests. As expected all behavioral defects seen in the Buridan's paradigm remained unaffected by mushroom-body ablation (data not shown). Surprisingly, the ablation of the mushroom bodies in *tay¹/Y; UAS-tay/II; mb247-GAL4/III* rescue flies did also not affect their ability to compensate for optomotor stimuli [Fig. 3(C); mb247HU/CS $p = 1.20 \times 10^{-3}$ and mb247HUctr/CS $p = 4.0 \times 10^{-4}$]. We therefore conclude that expression of 007Y-GAL4 and mb247-GAL4 in a structure different from the adult mushroom bodies and the protocerebral bridge is rescuing the capacity of *tay¹* to turn on the spot and walk in circles upon optomotor stimulation.

Neuronal Silencing in the Protocerebral Bridge Reduces Walking Speed and Activity

To verify our findings that an intact protocerebral bridge is required for walking speed and activity, we performed neuronal silencing experiments using conditional expression of the tetanus toxin light chain (TNT). TNT acts as a specific protease for neuronal synaptobrevin, thereby inhibiting evoked neurotransmitter release from the synapse (Sweeney et al., 1995). Conditional induction of TNT in the adult brain via the rescue driver line 007Y-GAL4 was achieved by employing a UAS-GAL80^{ts} transgene, a temperature sensitive repressor of the GAL4 protein (McGuire et al., 2003). The experimental and control flies were first measured at the restrictive temperature (18°C) for their walking capabilities, then shifted to the permissive temperature (33°C) for TNT expression and analyzed again. The experimental group (UAS-TNT/II; *Tub-GAL80^{ts}/007Y-GAL4*) displayed a dramatically reduced walking activity (medians: 17.6% induced vs. 42.0% uninduced; $p = 2.0 \times 10^{-4}$) and a decrease in walking speed (median 9.0 mm s^{-1} with a prominent tail of the distribution towards zero) at the permissive temperature in comparison to the uninduced state [median 11.4 mm s^{-1} ; $p = 0.001$; Fig. 5(E,F)]. As expected, conditional expression of TNT via the UAS-TNT/II; *Tub-*

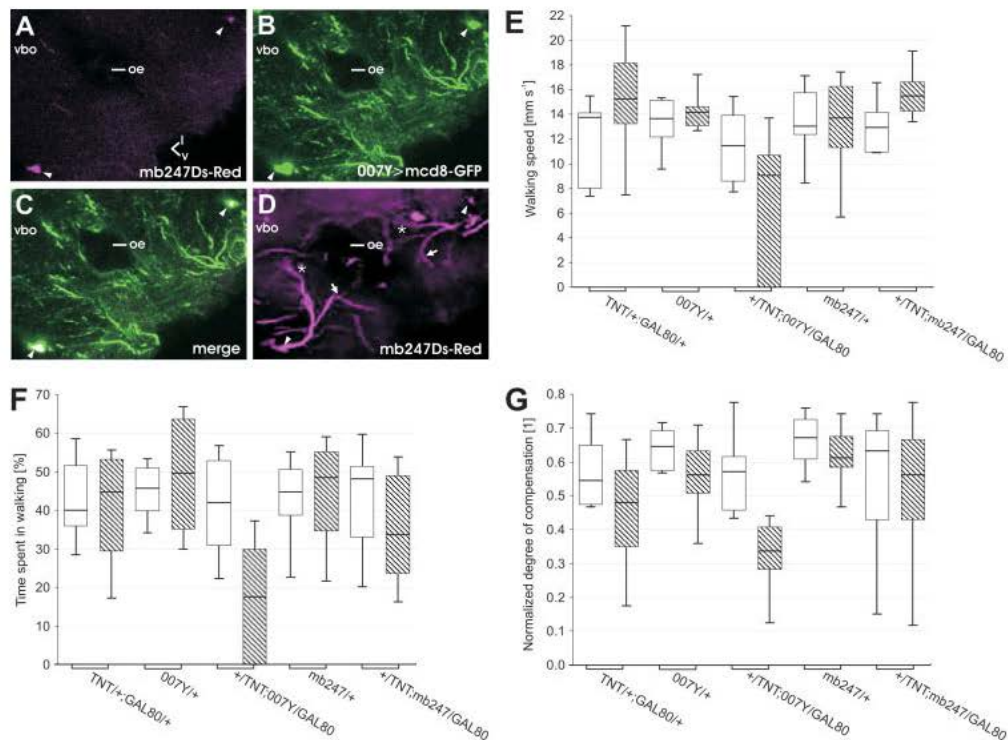


Figure 5 Coexpression studies of 007Y-GAL4 and mb247-DsRed and conditional tetanus toxin expression. (A–C) Confocal analysis of flies coexpressing driver lines 007Y-GAL4 and mb247-DsRed in the adult brain (UAS-mCD8-GFP/mb247-DsRed; 007Y-GAL4/mb247-DsRed). Two focal sections of 1 μ m were sampled for each picture [the ventral (v) and lateral (l) orientations are indicated]. Coexpression of membrane bound mCD8-GFP (A) and cytoplasmic DsRed (B) is only found in one single cell type (arrowheads) in the subesophageal ganglion (C, merge of A and B). (D) A reconstruction of the mb247-DsRed signal by sampling 100 focal sections (oe, esophagus; vbo, ventral body). The axon of the colabeled neuron splits into an ascending branch (asterisk) to the ventral body and a descending branch (arrow) to the ventral ganglion. (E–F) Conditional expression of TNT via 007Y-GAL4 in the adult impairs walking speed and activity in the Buridan paradigm. (G) Similarly, optomotor compensation is reduced when TNT is driven by 007Y-GAL4. Striped bars indicate induced states. Box-Whisker plots represent the median (bold line), the mean (square), 25% and 75% quartiles (box), 10% and 90% quantiles (whiskers) and extreme values (stars).

GAL80^{ts}/mb247-GAL4 line did not negatively affect walking speed [Fig. 5(E)]. In fact, flies with mb247-GAL4 driven TNT displayed a significant faster walking speed (median 15.5 mm s⁻¹) than the uninduced controls (median 12.9 mm s⁻¹; $p = 0.005$). In contrast, the walking activity did not change significantly [medians: 33.7% induced vs. uninduced 48.1%; $p = 0.11$; Fig. 5(F)]. These results confirm our findings from the rescue experiments that neuronal transmission through the protocerebral bridge is required for proper walking speed and activity, while

the mushroom bodies are not involved in these control aspects.

Although our *tay* rescue experiments with mb247 did result in a restoration of the optomotor compensation the HU ablation experiments did exclude the mushroom bodies from functioning in optomotor compensation during walking. Both, mb247-GAL4 and 007Y-GAL4 show expression in the fan-shaped body and the ellipsoid body besides the Kenyon cells of the mushroom bodies. However, double labeling experiment in adult whole brains using 007Y-GAL4/

UAS-mCD8-GFP and mb247-DsRed (Riemensperger et al., 2005) did not show an overlapping expression pattern of cytoplasmic DsRed and membrane bound mCD8-GFP in the fan-shaped body or ellipsoid body. In fact, the only neuronal cells coexpressing GFP and Ds-Red in the adult brain were located in the suboesophageal ganglion. These cells comprise a pair of neurons that descend to the thorax with an axonal branch projecting to the ventral body [Fig. 5(A–D)]. If these neurons are in fact necessary for optomotor responses while walking, TNT expression employing lines 007Y-GAL4 and mb247-GAL4 should result in a similar reduction of turning behavior than observed in *tay*^f. Although conditional induction of TNT via 007Y-GAL4 did reduce the optomotor response from median 0.57 to 0.34 normalized degree of compensation (induced/uninduced: $p = 0.001$), no defect could be detected using the mb247 line [medians: induced 0.56 vs. uninduced 0.63; $p = 0.09$; Fig. 5(G)]. Although, recent publications in *Drosophila* showed that in some neuronal cell types synaptic transmission is not blocked by tetanus toxin [e.g. in the photoreceptor cells (Rister and Heisenberg, 2006) and the Kenyon cells of the mushroom bodies (Thum et al., 2006)] we do not anticipate that this is the case in these cells due to the fact that 007Y-GAL4 driven TNT expression in these cells could interfere with optomotor compensation. However, expression of TNT via mb247-GAL4 did not alter the degree of compensation and we therefore exclude these neurons from being required for this type of turning behavior. The fact that mb247-driven expression of *tay* during development can rescue the optomotor response whereas mb247-driven expression of TNT in the adult did not affect this turning behavior, suggests that the mb247-GAL4 expression pattern during brain development is broader than later in the adult. Therefore, the identity of the 007Y-GAL4-positive neurons required for the proper optomotor response remains to be determined when more specific GAL4 driver lines become available.

DISCUSSION

The central complex of the insect brain has been implicated in visual orientation, visual learning, and locomotor control; however, the role of specific substructures in these functions is mostly unknown. This study unequivocally separates functions of the protocerebral bridge in walking control from functions in the control of optomotor turning. The newly identified *tay* bridge (*tay*^f) mutant shows deficits in several of the behavioral aspects associated with the central

complex, including slow walking speed, decreased walking activity, and failure to orient properly towards visual objects in Buridan's paradigm. Furthermore, these flies are impaired in their ability to compensate for optomotor stimuli during walking. Using various GAL4 lines to express *tay* in different substructures in *tay*^f mutant brains, we were able to associate distinct neuropilar regions of the central complex with defined components of locomotor control and orientation behavior.

Our initial rescue experiments using the pan-neuronal *elav*-GAL4 driver (Robinow and White, 1991; Luo et al., 1994) did not improve the behavioral and anatomical phenotypes, probably due to the low expression level induced by this promoter construct. In contrast, more specific and stronger driver lines were able to rescue distinct aspects of the phenotypes seen in *tay*^f. Expression of *tay* using 007Y-GAL4 completely rescued all phenotypes of *tay*^f. Only the orientation capacity towards landmarks was not fully rescued, although it was significantly improved compared to *tay*^f. In particular, 007Y-GAL4 was the only driver line tested that restored the anatomical integrity of the protocerebral bridge and the walking behavior in Buridan's paradigm. The conditional tetanus toxin silencing experiments, using line 007Y-GAL4, support the hypothesis of a function of the protocerebral bridge in the regulation of walking behavior. Conditional neuronal silencing of mushroom body neurons and hydroxyurea ablation experiments exclude an involvement of the mushroom bodies in controlling locomotion activity and walking speed. Therefore, we conclude that neuronal activity of the protocerebral bridge is required for a high walking speed and high overall activity. The poor turning behavior upon optomotor stimulation was restored by two of the used GAL4 driver lines, 007Y and mb247. Our experiments exclude a role of the protocerebral bridge in the impaired optomotor turning response of the mutant, because *tay*^f rescued via mb247-GAL4 still showed a defective protocerebral bridge. Double labeling experiments for these two reporter lines revealed only two populations of neurons stained by both lines; the mushroom bodies and one type of neuron in the suboesophageal ganglion. Surprisingly, however, the turning behavior upon optomotor stimulation does not appear to require either of these structures but a so far unidentified third type of neurons. This is shown on the one hand by the ablation of the mushroom bodies in mb247-GAL4 rescued *tay*^f-flies which did not induce defects in turning behavior. Silencing of these neurons by TNT expression on the other hand did result in reduced optomotor compensation in case of 007Y-GAL4 but

not in mb247-GAL4, suggesting that an unidentified class of neurons in the expression pattern of 007Y-GAL4 plays a role in turning behavior. Moreover this result suggests that the mb247-GAL4 rescue of the *tay*¹ phenotype is due to a different type of neurons than in line 007Y-GAL4.

We did not detect any expression of 007Y-GAL4 in neurons of the visual system nor in the thoracic ganglion (data not shown), suggesting that these unidentified neurons are localized in the central brain. Based on a detailed analysis of the 007Y-GAL4 expression pattern we like to hypothesize that neurons connecting the fan-shaped body and the ellipsoid body are the most likely candidates for a role in optomotor response. These neurons are stained in the medial-to-ventral layer of the fan-shaped body [fb-fb neurons in Fig. 4(A)] and connect this structure with the outer ring of the ellipsoid body, which is also stained. Comparing this expression pattern with the patterns of driver lines that did not rescue the turning behavior make the fb-eb connecting neurons promising candidates for establishing proper turning upon optomotor stimulation. Future studies have to address whether these or other neurons of the 007Y-GAL4 expression pattern are necessary for the optomotor turning response.

In summary, our results suggest that the horizontal fiber system of the protocerebral bridge is required for the regulation of walking speed and activity during the visual-object approach in Buridan's paradigm, whereas the optomotor response while walking appears to be regulated by a different system. Our studies are therefore a first step to understand the complexity and modular architecture of the central complex in locomotion control in walking flies.

The authors thank T. Peter, S. Klühspies, and S. Gross for technical assistance, D. Kretschmar for critically reading of the manuscript, and M. Heisenberg for continuous support. D. Armstrong, A. Fiala, K. Ito, A. Katzen, and H. Tanimoto generously provided fly lines.

REFERENCES

- Benzer S. 1967. Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:1112–1119.
- Brand AH. 1995. GFP in *Drosophila*. *Trends Genetics* 11:324–325.
- Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–415.
- Callaerts P, Leng S, Clements J, Benassayag C, Cribbs D, Kang YY, Walldorf U, et al. 2001. *Drosophila Pax-6* *eyeless* is essential for normal adult brain structure and function. *J Neurobiol* 46:73–88.
- de Belle JS, Heisenberg M. 1994. Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263:692–695.
- Götz KG. 1980. Visual guidance in *Drosophila*. In: Siddiqi O, Babu P, Hall LM, Hall JC, editors. *Development and Neurobiology of Drosophila*. New York: Plenum Press, pp 391–407.
- Hanesch U, Fischbach K-F, Heisenberg M. 1989. Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 257:343–366.
- Heinze S, Homberg U. 2007. Maplike representation of celestial E-vector orientations in the brain of an insect. *Science* 315:995–997.
- Heisenberg M, Böhl K. 1979. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z Naturforsch* 34c:143–147.
- Katzen AL. 1990. Proto-oncogenes in *Drosophila*: Molecular and genetic analysis. Ph.D Thesis, University of California, San Francisco.
- Kretschmar D, Tschape J, Bettencourt Da Cruz A, Asan E, Poeck B, Strauss R, Pflugfelder GO. 2005. Glial and neuronal expression of polyglutamine proteins induce behavioral changes and aggregate formation in *Drosophila*. *Glia* 49:59–72.
- Lindsley DL, Zimm GG. 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. San Diego, CA: Academic Press.
- 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.
- Luo L, Liao YJ, Jan LY, Jan YN. 1994. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* 8:1787–1802.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL. 2003. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302:1765–1768.
- Mühlig-Versen M, da Cruz AB, Tschape JA, Moser M, Buttner R, Athenstaedt K, Glynn P, et al. 2005. Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult *Drosophila*. *J Neurosci* 25:2865–2873.
- O'Dell KM, Armstrong JD, Yang MY, Kaiser K. 1995. Functional dissection of the *Drosophila* mushroom bodies by selective feminization of genetically defined subcompartments. *Neuron* 15:55–61.
- Pielage J, Steffes G, Lau DC, Parente BA, Crews ST, Strauss R, Klämbt C. 2002. Novel behavioral and developmental defects associated with *Drosophila* single-minded. *Dev Biol* 249:283–299.
- Rauskolb C, Peifer M, Wieschaus E. 1993. *Extradenticle*, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene *pbx1*. *Cell* 74:1101–1112.
- Reinn SCP, Armstrong JD, Yang M, Wang Z, An X, Kaiser K, Taghert PH. 1999. Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: Organization and development of the central complex. *J Neurobiol* 41:189–207.

- Rister J, Heisenberg M. 2006. Distinct functions of neuronal synaptobrevin in developing and mature fly photoreceptors. *J Neurobiol* 66:1271–1284.
- Riemensperger T, Voller T, Stock P, Buchner E, Fiala A. 2005. Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr Biol* 15:1953–1960.
- Robinow S, White K. 1991. Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol* 22:443–461.
- Spradling AC, Rubin GM. 1982. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218:341–347.
- Stapleton M, Carlson J, Brokstein P, Yu C, Champe M, George R, Guarin H, et al. 2002. A *Drosophila* full-length cDNA resource. *Genome Biol* 3:0080.1–0080.8
- Strauss R. 2002. The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 12:633–638.
- Strauss R, Heisenberg M. 1993. A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* 13:1852–1861.
- Strauss R, Pichler J. 1998. Persistence of orientation toward a temporarily invisible landmark in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 182:411–423.
- Strauss R, Schuster S, Götz KG. 1997. Processing of artificial visual feedback in the walking fruit fly *Drosophila*. *J Exp Biol* 200:1281–1296.
- Strauss R, Hanesch U, Kinkelin M, Wolf R, Heisenberg M. 1992. *no-bridge* of *Drosophila melanogaster*: Portrait of a structural mutant of the central complex. *J Neurogenet* 8:125–155.
- Sultana R, Yu CE, Yu J, Munson J, Chen D, Hua W, Estes A, et al. 2002. Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics* 80:129–134.
- 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.
- Tettamanti M, Armstrong JD, Endo K, Yang MY, Furukubo-Tokunaga K, Kaiser K Reichert H. 1997. Early development of the *Drosophila* mushroom bodies, brain centers for associative learning and memory. *Dev Genes Evol* 207:242–252.
- Thum AS, Knapek S, Rister J, Dierichs-Schmitt E, Heisenberg M, Tanimoto H. 2006. Differential potencies of effector genes in adult *Drosophila*. *J Comp Neurol* 498:194–203.
- The FlyBase Consortium. 2003. The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res* 31:172–175.
- Vitzthum H, Müller M, Homberg U. 2002. Neurons of the central complex of the locust *Schistocerca gregaria* are sensitive to polarized light. *J Neurosci* 22:1114–1125.
- Walch HS. 2002. Molekulare und histologische Charakterisierung der Neurodegenerations-Mutante Vam in *Drosophila melanogaster*. Doctoral Thesis, Universität Regensburg, Germany.

3 Zusammenfassung der Veröffentlichung zur Kontrolle der Kletterrichtung durch die Protocerebralbrücke (Triphan et al. 2010, Curr. Biol.) und Erklärung der eigenen Anteile

Triphan T, Poeck B, Neuser K and Strauss R. 2010. Visual targeting of motor actions in climbing *Drosophila*. Cur Biol, 20, 663-668.

Strukturmutanten der PB waren durch den Verlust der Richtung beim Klettern über Lücken aufgefallen. Nach einer korrekten Entscheidung zu Klettern, die auf der visuellen Abschätzung der Lückenbreite beruht, wurde bei der Ausführung des Kletterns anstatt $\pm 5^\circ$ Abweichung in der Horizontalebene wie beim Wildstamm in den Mutanten *tay bridge¹* und *ocelliless¹* bis zu $\pm 35^\circ$ Abweichung gemessen. Die genomische Rettung von *tay bridge¹* reversiert den Verhaltens- und Strukturdefekt vollständig. Die partielle Rettung mit verschiedenen GAL4-Treibern ergab eine partielle Rettung immer dann, wenn Expression in der PB vorlag, nicht jedoch bei Expression in den Pilzkörpern. Wurde die gegenüberliegende Seite der Zielplattform so gestaltet, dass keine Querwand mehr sichtbar war („Sprungbrett“), so zeigten die partiell geretteten Fliegen wieder hohe Fehlerraten. Die anatomische Feinanalyse der 007y Expression in *tay¹*, in Treiber- und in 007y-geretteten Gehirnen ergab, dass der durch *tay¹* verursachte Schaden nicht auf die sagittale Einschnürung der PB beschränkt ist, sondern auch durch den Ausfall der Expression in den denditischen Arborisationen des Horizontalen Fasersystems in allen Glomeruli der PB bedingt wird. Dies erklärt die ähnliche Stärke des Verhaltensdefizits in der grobanatomisch scheinbar nur schwach betroffenen Mutante *tay¹* gegenüber der massiv betroffenen Mutante *ocelliless¹*, bei der die PB fast vollständig fehlt. Es wird geschlossen, dass das Horizontale Fasersystem für die Kontrolle der Schrittlänge zur visuell kontrollierten Ansteuerung der gegenüber liegenden Seite auch beim Klettern gebraucht wird. Ein Funktionsmodell wird präsentiert.

Erklärung der eigenen Anteile

Tilman Triphan, Burkhard Poeck und Roland Strauss konzipierten die Forschungsarbeit und entwickelten die Experimente. Tilman Triphan führte die

Verhaltensexperimente durch und analysierte die Daten. Kirsa Neuser führte alle neuroanatomischen Analysen durch und stellte alle Präparate und die Abbildungen (S1 und S2) her. Tilman Triphan und Roland Strauss schrieben die Veröffentlichung.

Visual Targeting of Motor Actions in Climbing *Drosophila*

Tilman Triphan^{1,2}, Burkhard Poeck¹, Kirsa Neuser¹ and Roland Strauss^{1,3}

1) Johannes Gutenberg-Universitaet Mainz, Institut fuer Zoologie III, Col.-Kleinmann-Weg 2, 55099 Mainz, Germany

2) Current address: Janelia Farm Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, 19700 Helix Dr., 20147 Ashburn, VA, U.S.A.

3) Corresponding author

rstrauss@uni-mainz.de

phone: +49 (0)6131-3925034

fax: +49 (0)6131-3925443

Running title: Visual targeting of motor actions

Key words: central complex, protocerebral bridge, motor control, climbing behavior, insect behavior, insect brain function

Highlights

- Flies initiate adaptive gap climbing maneuvers based on visual width estimation.
- Mutant flies make correct decisions but lose their direction during gap climbing.
- A central brain structure necessary for the visual targeting of climbing is found.
- Structure-function model of the central complex can explain oriented motor control.

Summary

Drosophila melanogaster flies cross surmountable gaps in their walkway of widths exceeding their body length with an astounding maneuver but avoid attempts at insurmountable gaps by visual width estimation [1]. Different mutant lines affect specific aspects of this maneuver indicating a high complexity and modularity of the underlying motor control [1]. Here we report on two mutants, *ocelliless*¹ and *tay bridge*¹ [2] that, while making a correct decision to climb, fail dramatically in aiming at the right direction. Both mutants show structural defects in the protocerebral bridge, a central complex neuropil formed like a handlebar spanning the brain hemispheres. The bridge has been implicated in step-length control in walking flies [3] and celestial E-vector orientation in locusts [4]. In rescue experiments using *tay bridge*¹ flies the integrity of the bridge was reestablished, concomitantly leading to a significant improvement of their orientation at the gap. Although producing directional scatter, their attempts were clearly aimed at the landing site. However, this partial rescue was lost when using at a reduced-visibility landing site. We therefore conclude that the protocerebral bridge is an essential part of a visual targeting network that transmits directional clues to the motor output via a known projection system [5].

Results and Discussion

Climbing of Wild-Type and Protocerebral-Bridge Defective Flies

Although wild-type flies have an average body length of only 2.5 mm, they are able to surmount gaps of up to 4.3 mm with a special climbing behavior [1]. To successfully cross challenging widths, flies have to avoid deviations from the optimum direction because any angular deviation will shorten their effective reach when leaning into the gap and trying to reach the other side with their front legs. After contacting the opposite side with their front legs, the middle legs are released and also reach for the landing side. Finally, the hind legs release their grip and the flies walk up the opposite vertical wall and over the edge to continue onto the horizontal surface. To assess the angular precision, we measured the deviation in the x-y-plane as the angle between the optimal climbing direction and the longitudinal axis of the fly (Fig. 1A and A'; frames taken from high-speed motion pictures recorded at 200 frames/s; see Movie S1). The orientation was determined at the time of the last front-leg stroke before

either making contact to the other side or giving up. These distinct leg-over-head search strokes of the front legs are a unique sign of a climbing attempt because they do not occur during normal walking [1]. Wild-type Berlin males (WTB) showed a median scatter of just 6.2° when monitoring 58 attempts from ten flies crossing a 3.5 mm gap (Fig. 1D). A more detailed statistical analysis is given in Figure 1G, which shows the absolute angular deviation from the optimal climbing direction in terms of median, 25%-, and 75%-quartiles (the whiskers denote the entire range of angles found).

The low scatter suggested that flies are actively aligning their body axis in relation to the gap. To determine whether the central complex, and specifically the protocerebral bridge, plays a role in this orientation behavior, we tested mutant flies with defective protocerebral bridges. The bridge is a neuropil shaped like a bicycle's handlebar within the central complex, which interconnects the protocerebral hemispheres of the insect brain (Fig. 1D and 4B). It consists of eight glomeruli per hemisphere and is interconnected with the other three neuropilar regions of the central complex called fan-shaped body, ellipsoid body, and the paired noduli. The connectivity is established by columnar projection systems which come in sets of homologous neurons in multiples of eight [5]. Most of these systems carry output from the bridge, few provide input. Tangential elements interconnect the glomeruli of the bridge intrinsically.

By electrophysiological means a map-like representation of the head orientation relative to the E-vector of polarized light has been found in the protocerebral bridges of locusts [4, 6]. We have previously shown that *Drosophila* mutants with lesions in the protocerebral bridge (*tay bridge¹*) are defective in controlling their step size [3]. Another mutant strain with a severe defect of the protocerebral bridge (*ocelliless¹*; *oc¹*) was originally described for lacking the three simple eyes on top of the head and later identified as an allele of *orthodenticle* (*otd*; [7-9]). With the exception of the two outermost glomeruli (no. 8) the bridge is missing in *oc¹* flies and only occasionally *oc¹* flies show additional small fragments of bridge material. *oc¹* flies readily climbed 3.5 mm wide gaps but with a significantly lower success rate than wild-type flies ($21\% \pm 7\%$ versus $56\% \pm 6\%$; $p < 0.001$, t-test, two-tailed). The initiation rate of *oc¹* flies at this surmountable gap width is not the cause of their low success ($78\% \pm 7\%$ versus $78\% \pm 4\%$; not significantly different, t-test, two-tailed). Analyzing their orientation behavior revealed a highly significantly broader scatter of their climbing directions (Fig. 1G; $p < 10^{-6}$, U-test against WTB, Bonferroni corrected for multiple comparisons; statistical data are given in Table S1). As shown in Fig. 1B and E, many attempts are directed into the void which

never occurred in wild-type flies (Movie S2). Analyzing 134 attempts from 19 flies, we found a median angular deviation of 15.2° (Fig. 1E, G, and H). To exclude the possibility that the missing ocelli are responsible for the increased angular scatter, we also tested wild-type flies that had their ocelli painted with light-tight black paint. Because the climbing precision of these flies was indistinguishable from unaltered wild-type flies (median 6.2° , Fig. 1G; U-test, corrected for multiple testing; Table S1), we conclude that the ocelli do not play a role in the orientation behavior.

To test whether defects of the protocerebral bridge are indeed leading to defects in orientation we analyzed the climbing behavior of a genetically independent protocerebral bridge defective mutant line called *tay bridge¹* (*tay¹*). *tay¹* flies show a medial constriction of the bridge and have been originally isolated in a screen for walking-impaired flies [2]. The analysis of 82 climbing attempts from 18 different male *tay¹* flies revealed again a conspicuously broader angular scatter (median 28.9° , Fig. 1C, F, I) statistically indistinguishable from *oc¹* ($p=0.322$, U-test, corrected for multiple testing; Fig. 1G; Table S1). Also similar to *oc¹*, the climbing attempts of *tay¹* flies often occurred sideways into the void.

Rescue Experiments

To verify the causal relationship of the structural defects in the bridge with the observed orientation deficits, we tried rescuing the *oc¹* bridge using a cDNA transgene of *otd*. However, inducing the UAS-*otd* transgene with all the GAL4 lines driving expression in the adult bridge resulted in lethality during development (data not shown). Therefore, we performed rescue experiments using the *tay¹* mutant. A genomic rescue construct for *tay* ($P\{tay\}$) had completely rescued all known phenotypes of *tay¹*, including the structural defect of the protocerebral bridge [2]. It also rescued the angular deviation in the current study providing additional evidence for the importance of the bridge in orientation behavior (median 3.1° , Fig. 2A; not significantly different from WTB, Kruskal-Wallis test, corrected for multiple testing; full statistical account is given in Table S2).

To specifically address the functional role of the bridge, we then induced the UAS-*tay* construct with 007Y-GAL4, which had also been shown in the earlier study to rescue the structural defect of *tay¹*. 007Y-GAL4 expresses in the w-, x-, y-, and z bundles of the central complex, which are formed by columnar projections between the bridge, the fan-shaped body

and the ventral bodies ([5], Fig. S1). These neurons are called the horizontal fiber system which have postsynapses in the bridge, mixed terminals in the fan-shaped body and presynapses in the ventral bodies as judged by the Golgi gestalt [5]. Besides the expression in the horizontal fiber system, 007Y-GAL4 induces weak expression in the outer perimeter of the ellipsoid body, in a dorsal and a ventral-to-middle layer of the fan-shaped body, in the dorsal ends of the noduli, and in most parts of the mushroom bodies [2].

Comparative expression analysis of 007Y-GAL4 using a UAS-*tau::GFP* reporter construct revealed a significant reduction of the GFP expression in the glomeruli of the bridge in *tay¹* mutant flies. This reduction in staining intensity reflects a reduction in dendritic arborizations of the horizontal fiber system. This missing arborization most likely causes the medial constriction of the bridge as observed in autofluorescent micrographs of the *tay¹* mutant ([2]; Fig. S2). Although we confirmed that UAS-*tay* expression via 007Y-GAL4 restored the integrity of the protocerebral bridge, as assessed by autofluorescent sections and the reconstitution of glomerular staining (Fig. S1C), the behavioral defect in gap orientation was still present in these individuals. Indeed, the angular scatter of these rescue flies was not statistically different from mutant *tay¹* animals (median 17.7°, Fig. 2A; $p=0.782$, Kruskal-Wallis test, corrected for multiple testing; Table S2). Nevertheless, we noted that the rescue flies were more successful in their climbing attempts than the *tay¹* mutant flies. Though, the scatter was still large the attempts were more often directed to the opposite block. We therefore sorted the 173 attempts of the rescue flies into successful and unsuccessful events, whereby the later were further grouped by the excess deviation by which the longitudinal body axis angled away from the opposite block (Fig. 2B). Data were sorted into 20°-bins for the graphical representation in Fig. 2C. In terms of the excess deviation, the climbing behavior of the 007Y-rescue flies was not significantly different from WTB and highly significantly smaller than that of *tay¹* ($p=0.367$, $p=0.027$, Kruskal-Wallis-test, corrected for multiple testing; statistical analysis was performed on the excess deviation angles before binning, the full set of p-values is given in Table S3).

To determine whether the expression of 007Y-GAL4 in the mushroom bodies plays a role in this effect, we expressed UAS-*tay* by the mushroom-body driver *mb247-GAL4* [2]. As expected, expression of UAS-*tay* in the mushroom body did not rescue the protocerebral bridge nor did it prevent the scatter (median 24.6°, Fig. 2A; not significantly different from *tay¹*; Table S2) or the excess deviation (Fig. 2C; not significantly different from *tay¹*; Table

S3). This result and the concomitant rescue of the dendritic arborizations and of angular scatter by the 007Y driver suggest that the horizontal fiber system is required for this orientation task. Two other lines, 210Y-GAL4 [2] and c320-GAL4 [10], which both induce expression in the adult bridge, failed to rescue the structural *tay*¹-defect when driving UAS-*tay* (Fig. S2). Although c320-GAL4 addresses the horizontal fiber system in the adult bridge, no rescue of the primary scatter (median 26.0°, Fig.2A; not significantly different from *tay*¹; Table S2) or of the excess deviation was seen (Fig.2C; not significantly different from *tay*¹; Table S3). This negative result is most likely due to a delayed expression time point of c320 compared to 007Y.

In contrast, the driver line 210Y-GAL4 expresses in tangential neurons of the bridge [2], and therefore was not expected to rescue either the morphological or the behavioral phenotype. Interestingly, the primary scatter in 210Y-GAL4 rescue flies was not significantly different from *tay*¹ flies (median 22.2°, Fig.2A; Table S2) but the excess deviation showed partial improvement (Fig.2C; not significantly different from *tay*¹, $p=0.062$ against WTB, Table S3). These differences in the rescue abilities of the 007Y and 210Y driver lines could be due to their individual expression pattern within the protocerebral bridge or in other parts of the central brain where 210Y drives expression. The latter interpretation might be supported by the rescue experiments using a recombinant 007Y+210Y-GAL4 driver line. This double rescue experiments revealed that the effects of the 007Y- and 210Y-expression on the decrease of excess deviation are additive; these rescue flies were almost indistinguishable from WTB, but dramatically different from *tay*¹ (Fig. 2C; n.s. and $p=0.004$; Table S3).

Rescue Experiments at the Reduced-Visibility Paradigm

Because the 007Y-rescue did restore the integrity of the protocerebral bridge but not the wild-type precision of the climbing direction, we tested whether the improvements of these flies might be attributable to a work-around solution. The protocerebral bridge could be involved in a visual targeting mechanism that enables the flies to target the comparatively broad front surface of the landing site. Such a mechanism is supported by previous observations that wild-type flies track the opposite front surface much more than the top surface [1]. Therefore, we made use of a top-side only or diving-board like paradigm to investigate the effects of visual clues from the landing side (Fig.3A-C). In this paradigm, wild-type flies have a lower climbing-initiation rate (this has also been noted earlier [1]) but no significant increase in the

angular deviation (median 5.3°, compare to Fig. 2A, C) nor in the excess deviation of their attempts was observed (Fig. 3D, E; Movie S3; statistical account is given in Tables S2 and S3). Expectedly, we also did not observe a worse phenotype in *tay*¹ mutant which showed the same high angular deviation and excess deviation as in the standard paradigm with the solid opposite side (median 34.1°, Fig. 3D, E; Tables S2 and S3). This finding is in accordance with the idea that the reduction of the visual cue by the low visibility of the opposite side is irrelevant to flies which cannot evaluate this cue due to their defect in the protocerebral bridge.

In contrast, 007Y-GAL4 rescue flies performed much worse in the low visibility paradigm. While the excess deviation was rescued when the solid standard block was used (Fig. 2C), now these flies were indistinguishable from *tay*¹ mutants (Fig. 3E; not significantly different from *tay*¹; Table S3). This suggests that the increased performance using the standard gap is due to an improved visual targeting mediated by the restored protocerebral bridge. However, when the conspicuous visual cue of the landing site is removed, the restored bridge cannot provide this supportive function. This hypothesis is further supported by the results obtained with 210Y-GAL4, which does not restore the protocerebral bridge. In this case, the visibility of the opposite side is not of importance and consequently their performance remains the same in the diving board paradigm as in the standard assay (Fig. 3E, Table S3). Similarly, the combined driver line 210Y-GAL4+007Y-GAL4 does not show an improvement compared to 210Y-GAL4 alone, because the rescue of the protocerebral bridge by the 007Y-component does not help when the visual cue is missing (Fig. 3E, Table S3).

Conclusion

In recent years different laboratories provided evidence that multimodal sensory inputs into the central complex (e.g. E-vector orientation [4, 6, 11]; tactile input from the antennae [12]; visual orientation towards objects [2; 3; 13]) are used to establish a representation of the outside world. In this communication we could show that an intact protocerebral bridge is required to target the opposite side of the gap using acute visual information. This rescue is lost by removing the front surface of the landing side from the view of the fly. Therefore, this targeting mechanism depends on continuous visual input that is lost when only the diving board is presented during the climbing event. In contrast, the partial rescue provided by the 210Y driver line does not depend on such an online visual guidance as it persisted in the

diving board paradigm. This improvement could be due to a working memory that is not formed in the *tay¹* mutant (Fig. 4A). Therefore, the 210Y rescue effect is additive to the 007Y rescue as seen in double driver flies (Fig. 4A). We therefore like to conclude that the protocerebral bridge holds a representation of the outside world (in this case of the vertical edges of the opposing surface) and the fly's orientation in it. The bridge most likely conveys preprocessed visual information through the ventral bodies to motor centers which finally steer the animal toward the indented direction.

In accordance with earlier findings on step-length control in bridge-defective flies [3, 14-15] and described projection systems [5] we propose a structure-function model of the protocerebral bridge. The two-times eight glomeruli of the bridge are connected by the horizontal fiber system to the one-times eight fans of the fan-shaped body in a cross-over scheme (Fig. 4B, C). We suggest a model in which the visual target direction is represented in the bridge, the latero-lateral extent of which may code for the azimuth position of the chosen target. The sagittal glomeruli represent the frontal visual field and the outermost glomeruli provide positional information from the rear of the fly. An asymmetrical representation corresponds to an object at the side of the fly and should enhance the step size on the contralateral body side by virtue of the output of the horizontal fiber system to the ventral bodies (Fig. 4C), an accessory area of the central complex [5]. The body side ipsilateral to the target does not receive enhancement signals. It steps with a basic step length and this asymmetry in step length causes turning towards the visual target. Notably, protocerebral bridge defective mutants show basic step length throughout and have problems turning [3, 14-15]. When the fly is on target, the representation in the middle of the bridge may lead to an increase in step size on both sides of the body, and consequently an increase in walking speed, as has been found in WTB flies [16] (Fig. 4D).

In a similar way locusts and crickets could use the representation of the celestial E-vector in the protocerebral bridge to generate steering commands for their migration. The orientation of these insects with respect to the E-vector is preprocessed by neurons of the lower division of the central body (homologous to the ellipsoid body [4, 11]) and conveyed to the bridge [6]. Therefore, we can assume that the protocerebral bridge converts differences between world centered and body centered azimuthal coordinates into motor commands for orientation.

Experimental Procedures

Setup. A set of two orthogonal high-speed video cameras with 200 frames per second was used as described in [1]. The catwalk is 34 mm long, 10 mm high and 4.0 mm wide and is interrupted by a gap in the middle of the longitudinal axis. The standard gap is rectangular, 3.5 mm wide and 5.0 mm deep. The reduced-visibility gap is 5.0 mm deep, but while the gap is also 3.5 mm wide at the top it widens towards the bottom at the landing side, the starting side has a vertical wall (Fig. 3A-C).

Flies. Flies were kept on standard *Drosophila* medium under a 14h/10h light-dark cycle at 25°C and measured at age 3-5 days. To prevent flying, wings were shortened to 1/3 of their length under cold anesthesia (4°C) in a stream of dry air. Flies were given at least 12h in food vials for recovery. Painting of the ocelli with Schmincke Aerocolor 28870 was done as described in [1]. WTB was taken from the culture at the Biocenter Wuerzburg, *tay*¹ has been created on a WTB background. The genomic rescue line P{*tay*} and the UAS-*tay* construct are described in [2]. *oc*¹ has originally been generated by Bedichek [7] by X-ray irradiation of an unknown genetic background. The driver lines 007Y-GAL4, 210Y-GAL4, [2, 17], and mb247-GAL4 [18] have a wild-type Canton-S genetic background [19]. c320-GAL4 is described in [20] and its expression pattern is shown in [10].

Statistics. All data sets comprised groups that were not normally distributed (Shapiro-Wilk-test). Pair-wise comparisons of Fig. 1 were therefore performed with the Mann-Whitney U test, Bonferroni correction applied, and data presented as medians, 25%- and 75%-boxes, and whiskers denoting the full range of the respective data set (Table S1). For all multiple group comparisons, Kruskal-Wallis analyses of ranks were performed and tested post-hoc with Mann-Whitney U tests corrected for multiple comparisons [21]. The full sets of p- and z'-values are given in Tables S2 and S3. All analyses were done with Statistica version 7 (StatSoft).

Acknowledgements

We are grateful to M. Heisenberg for his continuous support at the Biocenter Wuerzburg during the transition period of the group to the University of Mainz. We thank S. Clemens-

Richter for technical support and D. Kretzschmar for carefully reading the manuscript. The work was funded in part by the German Science Foundation (International Research Training Group GRK 1156, and grant no. STR590/2-4).

References

- [1] Pick, S., and Strauss, R. (2005). Goal-driven behavioral adaptations in gap-climbing *Drosophila*. *Curr. Biol.* *15*, 1473-1478.
- [2] Poeck, B., Triphan, T., Neuser, K., and Strauss, R. (2008). Locomotor control by the central complex in *Drosophila* – an analysis of the *tay bridge* mutant. *Dev. Neurobiol.* *68*, 1046-1058.
- [3] Strauss, R. (2002). The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* *12*, 633-638.
- [4] Heinze, S., and Homberg, U. (2007) Maplike representation of celestial E-vector orientations in the brain of an insect. *Science* *315*, 995-997.
- [5] Hanesch, U., Fischbach, K.-F., and Heisenberg, M. (1989). Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue. Res.* *257*, 343-366.
- [6] Heinze S., Gotthardt, S., and Homberg, U. (2009). Transformation of polarized light information in the central complex of the locust. *J. Neurosci.* *29*, 11783-11793.
- [7] Bedichek, S., and Patterson, J.T. (1934). New mutants. *Dros. Inf. Serv.* *2*, 9-10.
- [8] Finkelstein, R., Smouse, D., Capaci, T.M., Spradling, A.C., and Perrimon, N. (1990). The *orthodenticle* gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* *4*, 1516-27.
- [9] Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W.J., Reichert, H., and Furukubo-Tokunaga, K. (1995). Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* *15*, 769-778.
- [10] Aso, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., and Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J. Neurogenet.* *23*, 156-172.

- [11] Sakura, M., Lambrinos, D., and Labhart, T. (2008). Polarized skylight navigation in insects: model and electrophysiology of E-vector coding by neurons in the central complex. *J. Neurophysiol.* *99*, 667-682.
- [12] Ritzmann, R.E., Ridgel, A.L., and Pollack, A.J. (2008). Multi-unit recording of antennal mechano-sensitive units in the central complex of the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *J. Comp. Physiol. A* *194*, 341-360.
- [13] Neuser, K., Triphan, T., Mronz, M., Poeck, B., and Strauss, R. (2008). Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* *453*, 1244-1247.
- [14] Strauss, R., Hanesch, U., Kinkelin, M., Wolf, R., and Heisenberg, M. (1992). *no bridge* of *Drosophila melanogaster*: portrait of a structural mutant of the central complex. *J. Neurogenet.* *8*, 125-155.
- [15] Callaerts, P., Leng, S., Clements, J., Benassayag, C., Cribbs, D., Kang, Y.Y., Walldorf, U., Fischbach, K.-F., and Strauss, R. (2001). *Drosophila Pax-6/eyeless* is essential for normal adult brain structure and function. *J. Neurobiol.* *46*, 73-88.
- [16] Strauss, R., and Heisenberg, M. (1990). Coordination of legs during straight walking and turning in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* *167*, 403-412.
- [17] Renn, S.C.P., Armstrong, J.D., Yang, M., Wang, Z., An, X., Kaiser, K., and Taghert, P.H. (1999). Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: Organization and development of the central complex. *J. Neurobiol.* *41*, 189-207.
- [18] Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* *288*, 672-675.
- [19] O'Dell, K.M., Armstrong, J.D., Yang, M.Y., and Kaiser, K. (1995). Functional dissection of the *Drosophila* mushroom bodies by selective feminization of genetically defined subcompartments. *Neuron* *15*, 55-61.
- [20] Martini, S.R., and Davis, R.L. (2005). The *dachshund* gene is required for the proper guidance and branching of mushroom body axons in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* *64*, 133-144.
- [21] Siegel, S., and Castellan, N.J. (1988). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, Second Edition, (New York, NY: McGraw-Hill), pp. 213-215.

Figure legends

Figure 1: Wild-type and mutant flies at the standard gap. A-C, Examples of climbing attempts of a wild-type Berlin (WTB), an *ocelliless*¹ (*oc*¹), and a *tay bridge*¹ (*tay*¹) male fly,

respectively. Angular deviations from the optimal direction are indicated. Gap width is 3.5 mm. **D-F**, Scatter of the orientation and position of the longitudinal body axis taken at the last stroke of a front leg before giving up or succeeding in contacting the opposite side. WTB: 58 events (n) from 10 flies (N); *oc¹*: n = 134, N = 19; *tay¹*: n = 82, N = 18. Sketches indicate the phenotype of the central complex (PB, protocerebral bridge; FB, fan-shaped body; EB, ellipsoid body; NO, noduli). **G**, Median absolute angular deviations from the perfect crossing direction (small rectangles). Boxes indicate 25%- and 75%-quartiles, whiskers denote the entire range of angular deviations. Data were taken from D-F and WTB with occluded ocelli added: n = 42, N = 5. The mutant data are highly significantly different from both WTB data sets. Full statistical account is given in Table S1. **H, I**, Mean frequency of angular deviations for *oc¹* and WTB (H) as well as *tay¹* and WTB (I) in 10°-bins.

Figure 2: *tay¹* rescue flies at the standard gap. **A**, Median absolute angular deviations of WTB, *tay¹* (data as in Fig. 1), and various rescue lines. Only the genomic rescue *tay¹*;P{*tay*} restores all phenotypes (N = 8, n = 94). *tay¹*;UAS-*tay*;007Y-GAL4 (N = 32, n = 173); *tay¹*;UAS-*tay*;210Y-GAL4 (N = 18, n = 84); *tay¹*;UAS-*tay*;mb247-GAL4 (N = 7, n = 39), and *tay¹*;UAS-*tay*;c320-GAL4 (N = 7, n = 55) do not rescue the angular deviation. Rescue flies that contain both drivers, 007Y-GAL4 and 210Y-GAL4 (N = 11, n = 67), show an intermediate phenotype between WTB and *tay¹*. For statistics see Table S2. **B**, Excess deviation of events missing the opposite side is defined as the angle between the alignment of the fly that would just hit the other side and the actual body direction at the last leg-over-head stroke. **C**, Distribution of excess deviations in 20°-bins from the data set in A. Besides the genomic rescue, also the driver line 007Y-GAL4 and the combination of driver line 007Y-GAL4+210Y-GAL4 rescue excess deviation. In addition, these lines are the only ones with a restored protocerebral bridge indicated by “+” for the wild-type or “-” for the *tay¹*-phenotype. The 210Y-GAL4 rescue, although it does not visibly restore the bridge, shows a somewhat intermediate behavioral phenotype. Statistical data are given in Table S3.

Figure 3: Climbing at the reduced visibility gap. **A-C**, Three frames taken from a video sequence of a wild-type Berlin fly crossing the gap with reduced visibility of the contralateral side. **A**, Last front leg stroke before touching the distal side. **B**, Bridging the gap and release of the hind- and middle legs. **C**, Successful arrival at the distal side. **D**, Median absolute angular deviations from the ideal crossing direction at the reduced visibility gap (rectangles). Boxes indicate 25%- and 75%-quartiles, whiskers denote the entire range of data. WTB, n =

80, N = 12; *tay*¹, n = 53, N = 11; rescue *tay*¹;UAS-*tay*;007Y-GAL4, n = 75, n = 15; *tay*¹;UAS-*tay*;210Y-GAL4, n = 90, n = 18, *tay*¹;UAS-*tay*;007Y-GAL4+210Y-GAL4, n = 52, n = 10. Statistical data are given in Table S2. **E**, Comparison of the distribution of excess deviations at the standard (left) and reduced visibility gap (right), taken from the data sets shown in 2C and 3D, respectively. Similar to the standard gap, the *tay*¹;UAS-*tay*;210Y-GAL4 flies show a partial rescue of the excess deviation at the reduced visibility gap. The full rescue observed with *tay*¹;UAS-*tay*;007Y-GAL4+210Y-GAL4 at the standard gap reverts to a partial rescue at the reduced visibility gap and the behavior of 007Y-GAL4 rescue flies, which is indistinguishable from WTB at the standard gap, does not differ from *tay*¹ at the reduced visibility gap. n.s., not significant; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. The full set of p-values is given in Table S3.

Figure 4: Anatomical and functional model of the protocerebral bridge. **A**, Summary of the rescue experiments with regard to the structure of the protocerebral bridge and the excess deviation at the standard and low visibility gap. **B**, Schematic of the central complex and a neuron of the horizontal fiber system (HFS; after [5]); PB, protocerebral bridge; FB, fan-shaped body; EB, ellipsoid body; NO, noduli. The HFS connects the two-times eight glomeruli of the PB to the eight fans of the FB in a cross-over scheme and exits to the ventral bodies (VBO). The HFS neurons have spiny arborizations in the PB, mixed terminals in layer 4 of the FB and blebbed endings in the VBO. **C, D**, Functional model of the PB and HFS with the target sideways to the fly (C) and in front of the fly (D). The bridge is assumed to hold a representation of the target's azimuth position which, by means of the HFS, influences step length contra-laterally. As a consequence, the fly turns towards the object in C and speeds up in D. w, x, y, z, w-, x-, y-, and z-fiber bundles characteristic of the HFS [5]. While 007Y-GAL4 induces expression in these fiber bundles, 210Y-GAL4 does not.

Figure S1: Expression pattern of 007Y-GAL4 and structural rescue of *tay*¹. 007Y-GAL4 expression in the wild-type (A), mutant (B), and rescued background (C) as assessed by anti-tau immuno-histological staining. **Aa-Ca**, A singular cell body of the horizontal fiber system (HFS) is indicated by an arrowhead. **Ab-Cb**, The glomerular staining of the dendritic arborizations (arrowheads) of the HFS (arrows) is strongly reduced in the *tay*¹ mutant and reconstituted in the 007Y rescue flies. **Ac-Cc**, Staining in the fourth layer of FB or in the NO is not affected in the *tay*¹ mutant. **Ad-Cd**, The projections of the HFS neurons into the VBO (asterisks) are hardly seen in the mutant background. Immuno-labeling of tau::GFP in frontal

paraffin sections (7 μ m) were performed as described in [2]. HFS, horizontal fiber system; CA, calyx of the mushroom body; PE, peduncle of the mushroom body; PB, protocerebral bridge; FB, fan-shaped body; NO, Noduli; EB, ellipsoid body; VBO, ventral body).

Figure S2: Histological analysis of the attempted 210Y and c320 rescues. A, Autofluorescence micrographs of frontal paraffin sections (7 μ m) through the posterior wild-type (WT) brain at the plane of the mushroom body calices (CA). Failure to rescue the protocerebral bridge (PB) defect of the *tay*¹ mutant by the driver lines 210Y (**B**) and c320 (**C**). Note the constrictions (arrows in B and C) at the midline of the protocerebral bridge.

Figures

Figure1

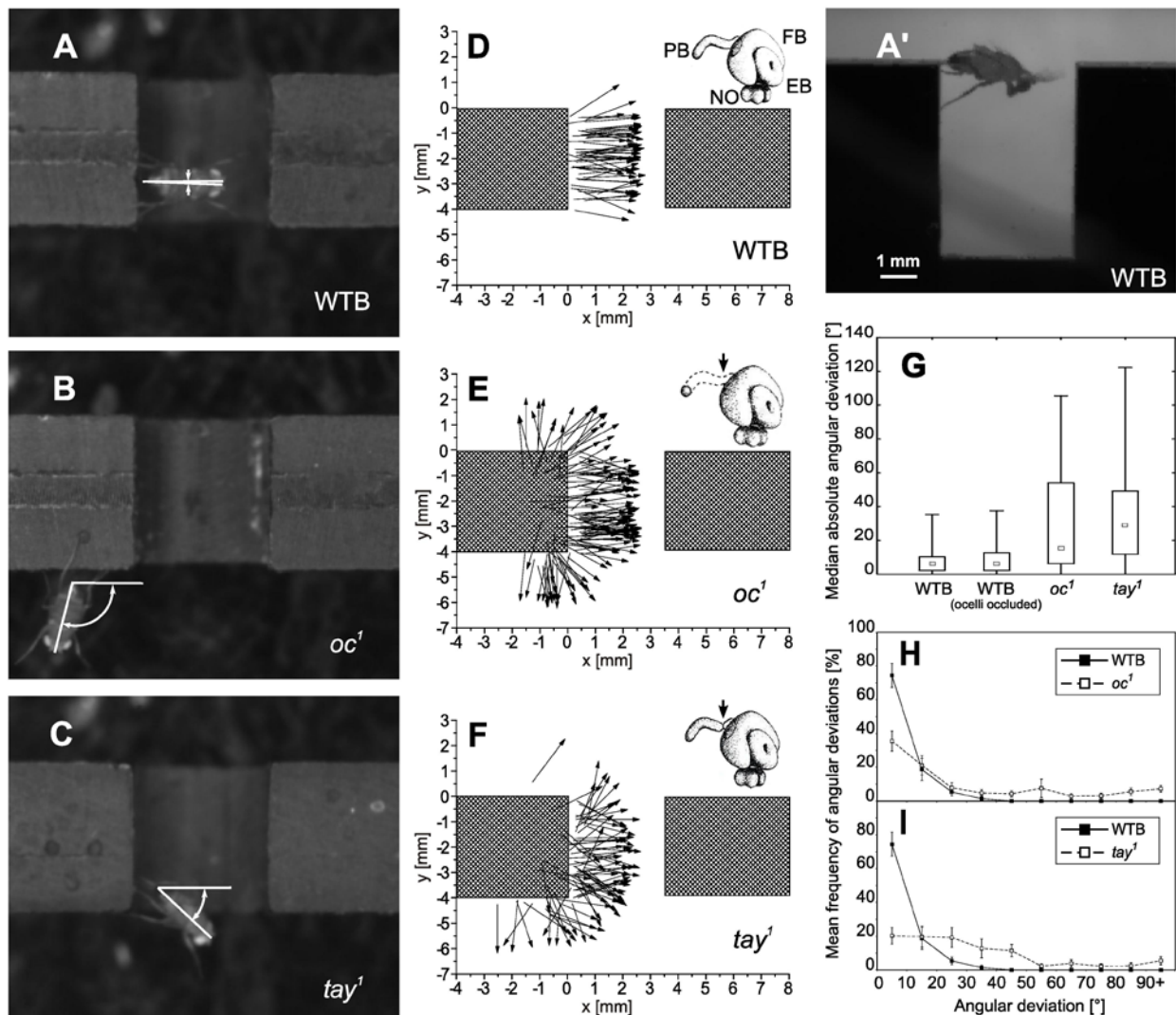


Figure 2

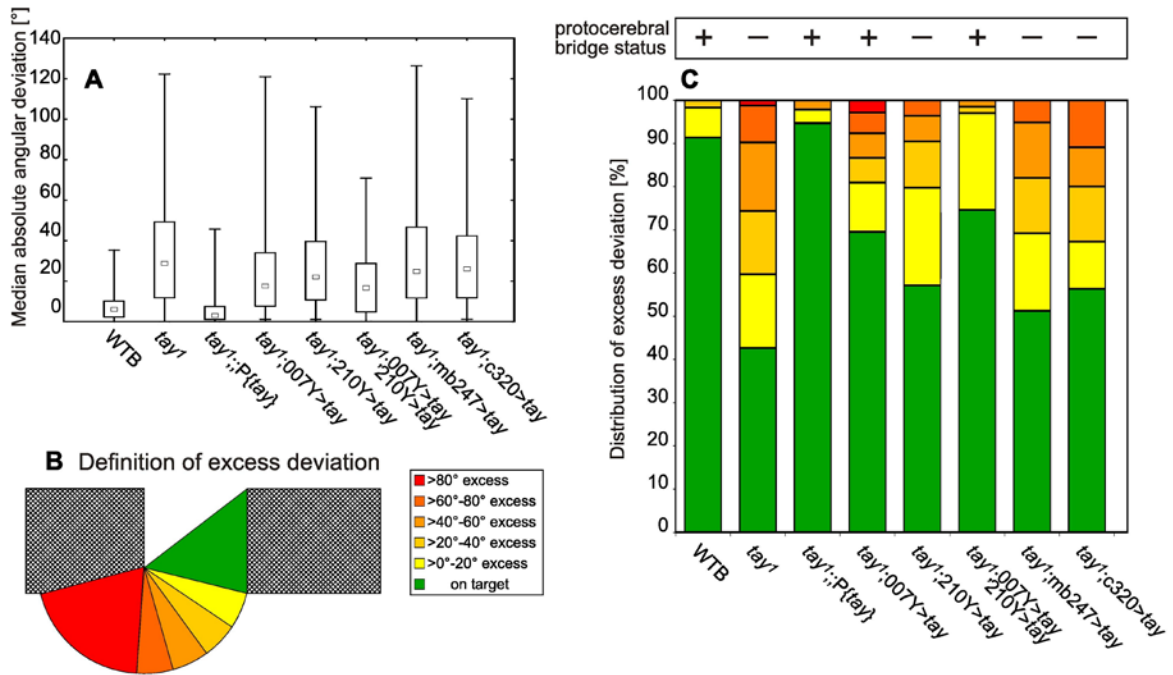


Figure 3

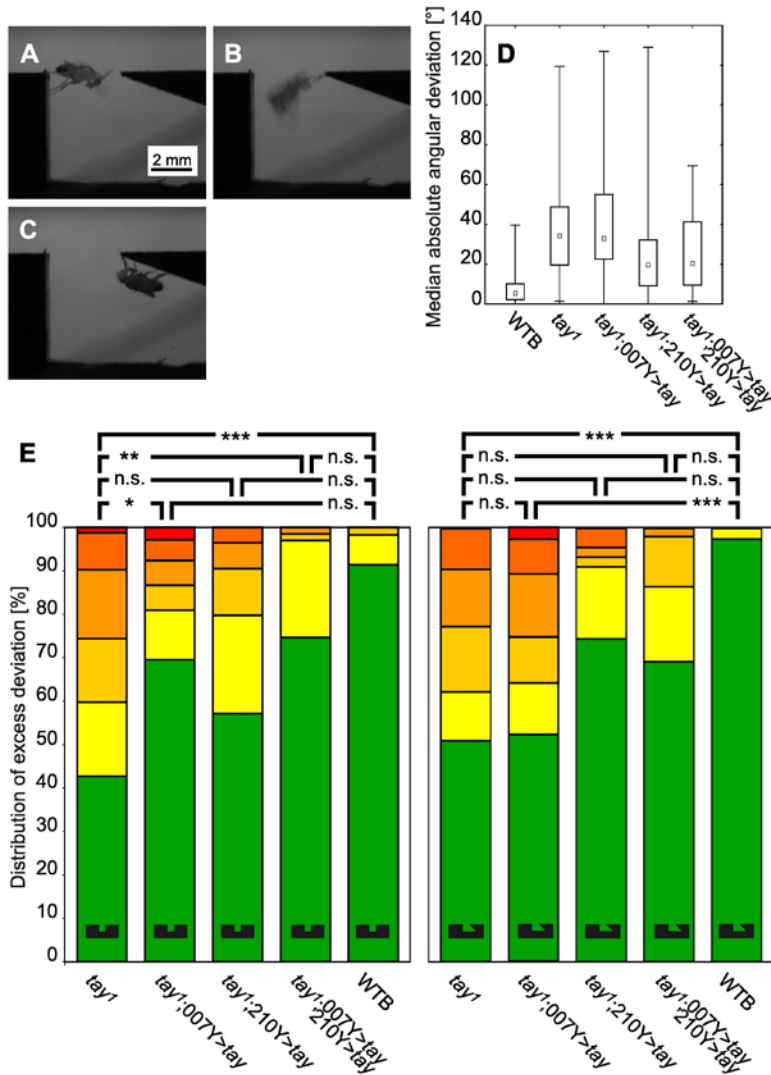
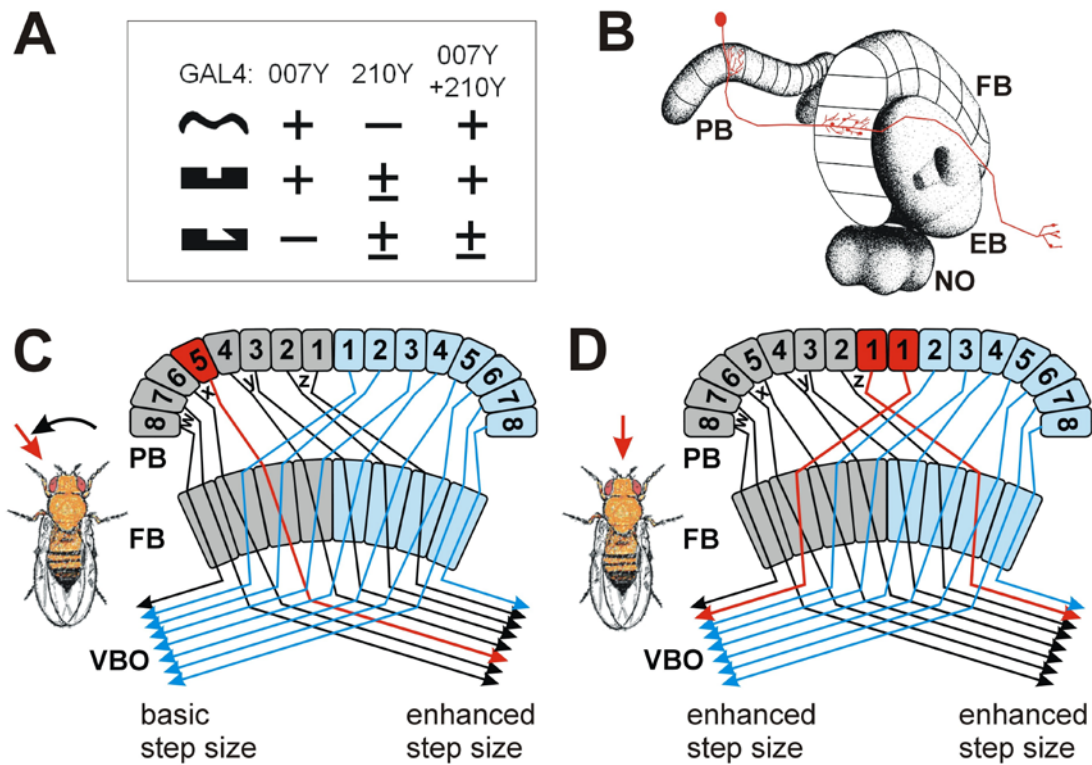


Figure 4



Supplement

Figure S1: Expression pattern of 007Y-GAL4 and structural rescue of *tay*¹.

Figure S2: Histological analysis of the attempted 210Y and c320 rescues.

Table S1: Pairwise comparison of median absolute angular deviations for the data shown in Fig.1G. Mann-Whitney U tests with Bonferroni corrections applied for multiple comparisons.

Table S2: Kruskal-Wallis tests of ranks for median absolute angular deviations for the data shown in Fig.2A and 3D, corrected for multiple comparisons.

Table S3: Kruskal-Wallis tests of ranks for median excess deviations for the data shown in Fig.2C and 3E, corrected for multiple comparisons.

Movie S1: Top view of a WTB male crossing a 3.5 mm wide standard gap.

Movie S2: Top view of an *ocelliless*¹ male attempting to cross a 3.5 mm standard gap.

Movie S3: Side view of a WTB male crossing a 3.5 mm gap with reduced visibility (“diving board”).

Visual Targeting of Motor Actions in Climbing *Drosophila*

Tilman Triphan^{1,2}, Burkhard Poeck¹, Kirscha Neuser¹ and Roland Strauss^{1,3}

- 1) Johannes Gutenberg-Universitaet Mainz, Institut fuer Zoologie III, Col.-Kleinmann-Weg 2, 55099 Mainz, Germany
- 2) Current address: Janelia Farm Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, 19700 Helix Dr., 20147 Ashburn, VA, U.S.A.
- 3) Corresponding author

Supplemental Inventory

Figure S1: Expression pattern of 007Y-GAL4 and structural rescue of *tay*¹.

Figure S2: Histological analysis of the attempted 210Y and c320 rescues.

Table S1: Pairwise comparison of median absolute angular deviations for the data shown in Fig.1G. Mann-Whitney U tests with Bonferroni corrections applied for multiple comparisons.

Table S2: Kruskal-Wallis tests of ranks for median absolute angular deviations for the data shown in Fig.2A and 3D, and corrected post-hoc comparisons of mean ranks of all pairs of groups.

Table S3: Kruskal-Wallis tests of ranks for median excess deviations for the data shown in Fig.2C and 3E, and corrected post-hoc comparisons of mean ranks of all pairs of groups.

Supplemental References

Movie S1: Top view of a WTB male crossing a 3.5 mm wide standard gap.

Movie S2: Top view of an *ocelliless*¹ male attempting to cross a 3.5 mm standard gap.

Movie S3: Side view of a WTB male crossing a 3.5 mm gap with reduced visibility (“diving board”).

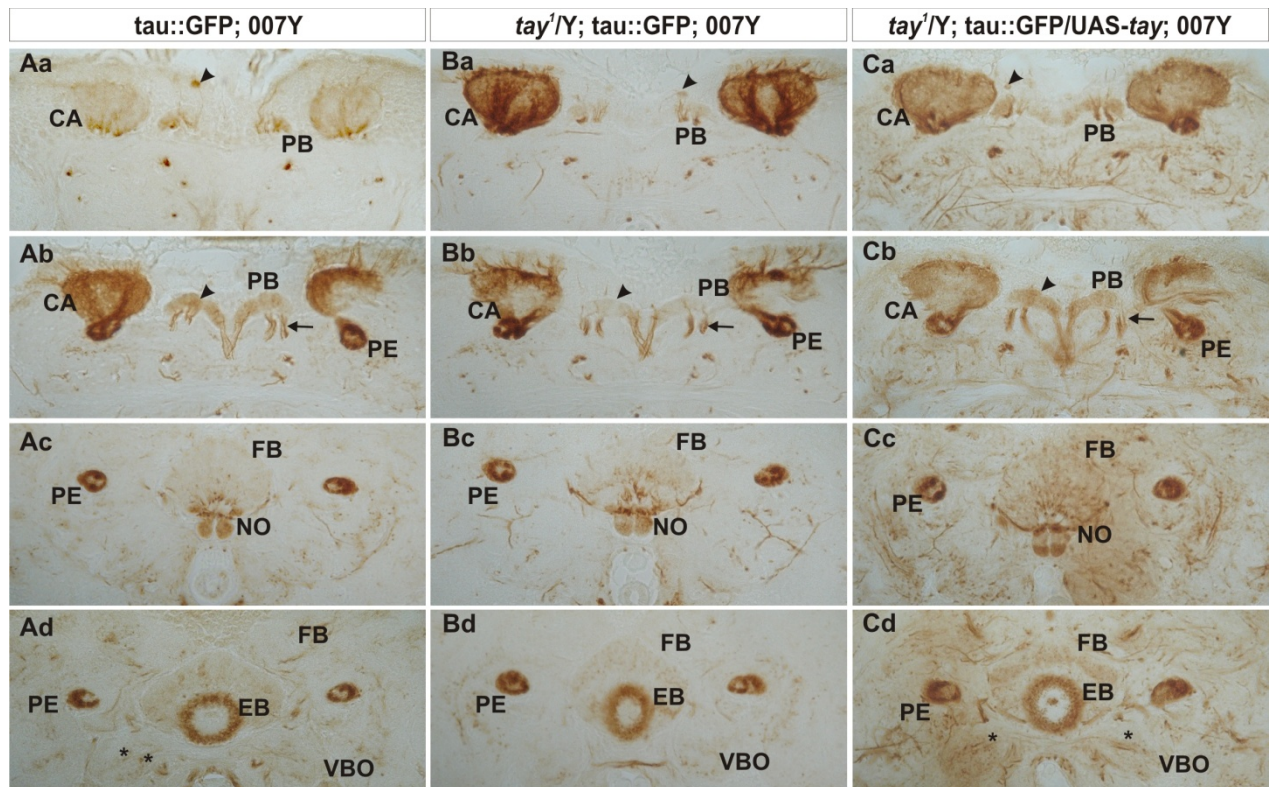


Figure S1: Expression pattern of 007Y-GAL4 and structural rescue of *tay¹*. 007Y-GAL4 expression in the wild-type (A), mutant (B), and rescued background (C) as assessed by anti-tau immuno-histological staining. **Aa-Ca**, A singular cell body of the horizontal fiber system (HFS) is indicated by an arrowhead. **Ab-Cb**, The glomerular staining of the dendritic arborizations (arrowheads) of the HFS (arrows) is strongly reduced in the *tay¹* mutant and reconstituted in the 007Y rescue flies. **Ac-Cc**, Staining in the fourth layer of FB or in the NO is not affected in the *tay¹* mutant. **Ad-Cd**, The projections of the HFS neurons into the VBO (asterisks) are hardly seen in the mutant background. Immuno-labeling of tau::GFP in frontal paraffin sections (7 μ m) were performed as described in [S1]. HFS, horizontal fiber system; CA, calyx of the mushroom body; PE, peduncle of the mushroom body; PB, protocerebral bridge; FB, fan-shaped body; NO, Noduli; EB, ellipsoid body; VBO, ventral body).

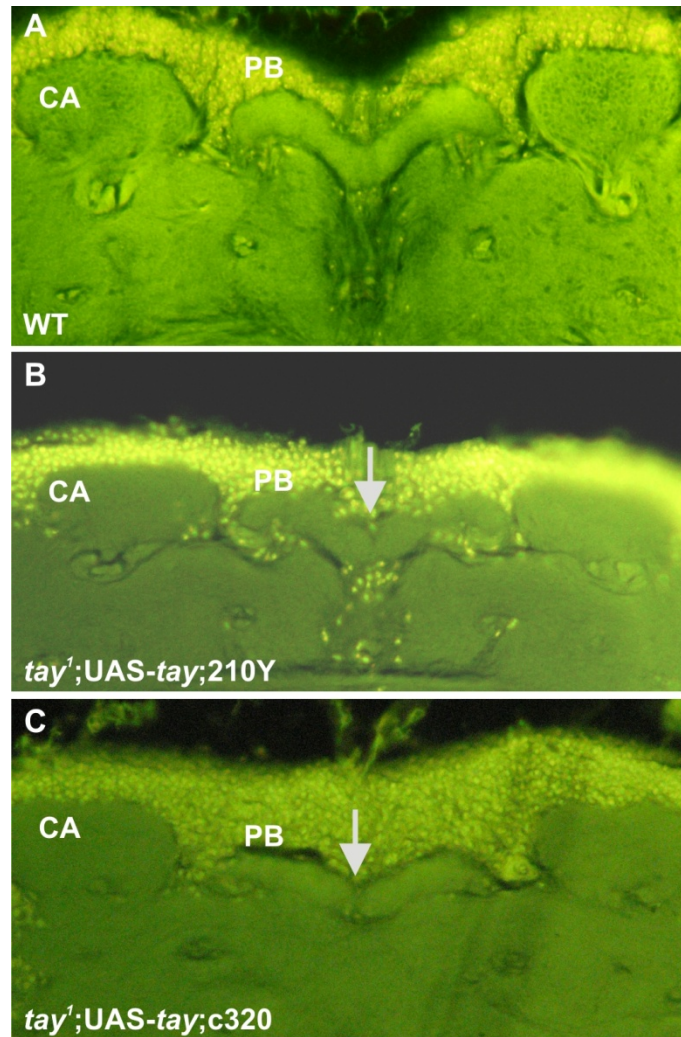


Figure S2: Histological analysis of the attempted 210Y and c320 rescues. **A**, Autofluorescence micrographs of frontal paraffin sections (7µm) through the posterior wild-type (WT) brain at the plane of the mushroom body calices (CA). Failure to rescue the protocerebral bridge (PB) defect of the *tay*¹ mutant by the driver lines 210Y (**B**) and c320 (**C**). Note the constrictions (arrows in B and C) at the midline of the protocerebral bridge.

Table S1: Pairwise comparison of median absolute angular deviations for the data shown in Fig. 1G. Mann-Whitney U tests with Bonferroni corrections applied for multiple comparisons (WTB, wild-type Berlin; *tay*¹, *tay bridge*¹; *oc*¹, *ocelliless*¹; oc. occl., ocelli occluded).

Strain 1 vs. Strain 2	Rank Sum 1	Rank Sum 2	U	Z	p-value	p (corr.)	N 1	N 2
WTB vs. WTB (oc. occl.)	2865.000	2185.000	1154.000	-0.443553	0.657366	1.000000	58	42
WTB vs. <i>oc</i> ¹	3775.000	14753.00	2064.000	-5.15236	0.000000	0.000000	58	134
WTB vs. <i>tay</i> ¹	2503.000	7367.000	792.0000	-6.70724	0.000000	0.000000	58	82
<i>oc</i> ¹ vs. <i>tay</i> ¹	13714.00	9722.000	4669.000	-1.84971	0.064356	0.32178	134	82
WTB (oc. occl.) vs. <i>oc</i> ¹	2524.500	13051.50	1621.500	-4.13745	0.000035	0.000175	42	134

Table S2: Kruskal-Wallis tests of ranks for median absolute angular deviations for the angular aberration data shown in Fig.2A and 3D, and corrected post-hoc comparisons of mean ranks of all pairs of groups after [S2] (r.v., reduced visibility paradigm).

Multiple Comparisons p values (upper lines) and z' values (lower lines) (2-tailed), Kruskal-Wallis test: H (12, N = 1002) = 277.9378 p = 0.000													
N n		WTB	tay ¹	P{tay}	007Y	210Y	007Y+210Y	mb247	c320	WTB (r.v.)	tay ¹ (r.v.)	007Y (r.v.)	210Y (r.v.)
R		277.50	627.26	213.11	527.36	589.38	462.31	579.21	603.84	265.44	678.89	707.75	536.43
full block													
10 58	WTB												
18 82	tay ¹	<0.00001	7.044148										
8 94	P{tay}	n.s.	<0.00001	1.332507	9.470493								
32 173	007Y	<0.00001	0.782448	5.690183	2.574745	<0.00001	8.47431						
18 84	210Y	<0.00001	n.s.	6.312547	0.843050	<0.00001	8.659615	n.s.	1.611656				
11 67	007Y+210Y	0.028849	0.041991	3.560707	3.460912	<0.00001	5.385744	n.s.	1.561908	0.573252	2.680584		
7 39	mb247	0.000037	n.s.	5.03442	0.853601	<0.00001	6.641538	n.s.	1.010740	n.s.	0.181466	n.s.	2.005426
7 55	c320	<0.00001	n.s.	5.991394	0.464319	<0.00001	7.952968	n.s.	1.707246	n.s.	0.561271	n.s.	2.687645
													0.406576
reduced visibility block													
12 80	WTB (r.v.)	n.s.	<0.00001	0.241567	7.955804	n.s.	1.188799	<0.00001	6.693743	<0.00001	7.165225	0.003116	<0.00001
													6.675543
11 53	tay ¹ (r.v.)	<0.00001	n.s.	7.29894	1.012260	<0.00001	9.369701	0.066498	3.335150	n.s.	1.763092	0.003652	n.s.
													1.347308
15 75	007Y (r.v.)	<0.00001	n.s.	8.502421	1.740761	<0.00001	11.03932	0.000509	4.508680	0.782856	2.574565	0.000035	n.s.
													2.249885
18 90	210Y (r.v.)	<0.00001	n.s.	5.313720	2.055725	<0.00001	7.575605	n.s.	0.241354	n.s.	1.205977	n.s.	n.s.
													0.770943
10 52	007Y+210Y (r.v.)	0.000041	n.s.	5.016980	1.412746	<0.00001	6.831226	n.s.	0.599184	n.s.	0.677611	n.s.	n.s.
													1.728826
													0.398453
													0.876401
													5.612639
													2.197105
													0.265142
													2.929118
													n.s.
													0.363928

tay¹; UAS-tay; GAL4

Table S3: Kruskal-Wallis tests of ranks for median excess deviations for the excess deviation data shown in Fig.2C and 3E, and corrected post-hoc comparisons of mean ranks z' for all pairs of groups after [S2] (r.v., reduced visibility paradigm).

Multiple Comparisons p values (upper lines) and z' values (lower lines) (2-tailed), Kruskal-Wallis test: H (12, N = 1002) = 147.6064 p = 0.000													
N n		WTB	tay^1	P{ tay }	007Y	210Y	007Y+210Y	mb247	c320	WTB (r.v.)	tay^1 (r.v.)	007Y (r.v.)	210Y (r.v.)
R		383.38	646.45	371.18	507.49	549.15	453.04	589.95	580.00	356.31	605.11	604.60	488.56
full block													
10 58	WTB												
18 82	tay^1	<0.00001	5.298314										
8 94	P{ tay }	n.s. 0.252445	<0.00001 6.294776										
32 173	007Y	0.367050 2.826514	0.026655 3.581423	0.018485 3.675927									
18 84	210Y	0.061830 3.355336	n.s. 2.165688	0.003279 4.095965	n.s. 1.082574								
11 67	007Y+210Y	n.s. 1.342209	0.003858 4.058153	n.s. 1.769242	n.s. 1.307469	n.s. 2.027512							
7 39	mb247	0.044225 3.446932	n.s. 1.003738	0.005634 3.968809	n.s. 1.607398	n.s. 0.727481	n.s. 2.348762						
7 55	c320	0.023895 3.609871	n.s. 1.317459	0.001665 4.250390	n.s. 1.618576	n.s. 0.614480	n.s. 2.410992	n.s. 0.164219					
reduced visibility block													
12 80	WTB (r.v.)	n.s. 0.542329	<0.00001 6.379790	n.s. 0.337756	0.008711 3.863715	0.001556 4.265513	n.s. 2.018373	0.002783 4.133808	0.000796 4.412731				
11 53	tay^1 (r.v.)	0.004312 4.032077	n.s. 0.810464	0.000197 4.705868	n.s. 2.148623	n.s. 1.102273	0.332062 2.858447	n.s. 0.248376	n.s. 0.450833	0.000094 4.876170			
15 75	007Y (r.v.)	0.000962 4.371705	n.s. 0.905112	0.000015 5.209475	n.s. 2.427125	n.s. 1.915763	0.143327 3.115309	n.s. 0.256444	n.s. 0.478830	<0.00001 5.337906	n.s. 0.009882		
18 90	210Y (r.v.)	n.s. 1.675897	0.003139 4.106045	n.s. 2.199276	n.s. 1.128544	n.s. 1.205986	n.s. 0.256971	n.s. 2.251346	n.s. 2.320892	n.s. 2.445148	0.404359 2.795367	0.159119 3.084348	
10 52	007Y+210Y (r.v.)	n.s. 1.903058	0.162710 3.077704	n.s. 2.346810	n.s. 0.413689	n.s. 1.186669	n.s. 0.663985	n.s. 1.653937	n.s. 1.633596	0.803970 2.565346	n.s. 2.063403	n.s. 2.222046	n.s. 0.466442

tay^1 ; UAS- tay ; GAL4

Supplemental References

- [S1] Poeck, B., Triphan, T., Neuser, K., and Strauss, R. (2008). Locomotor control by the central complex in *Drosophila* – an analysis of the *tay bridge* mutant. *Dev. Neurobiol.* 68, 1046-1058.
- [S2] Siegel, S., and Castellan, N.J. (1988). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, Second Edition, (New York, NY: McGraw-Hill), pp. 213-215.

4 Unpublished behavioural and neuroanatomical results

The following section summarizes results, which have been achieved after the publication of Neuser et al. (2008) on the spatial orientation memory. Methods and Statistics are used as described in Neuser et al. (2008) if not stated otherwise.

4.1 Behavioral characterization of wild-type Canton-S flies in the detour paradigm

4.1.1. Representation of an additional distracter does not disrupt the spatial orientation memory.

To estimate whether the formation of the spatial orientation memory is disturbed by presenting an additional distracter, two lateral distracters, instead of one, were displayed opposite to each other. It turned out that flies oriented either to the one or the other of the distracters, while showing normal memory performance (Fig. 3; N=11,11; U=34.5; p= 0.09).

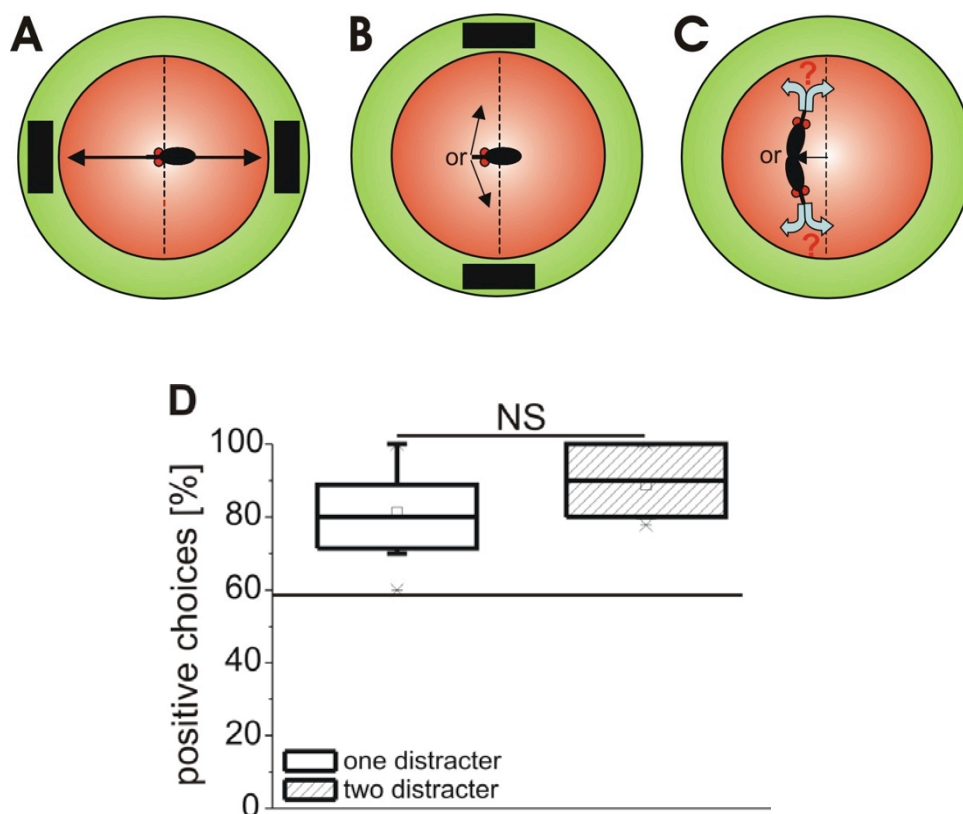


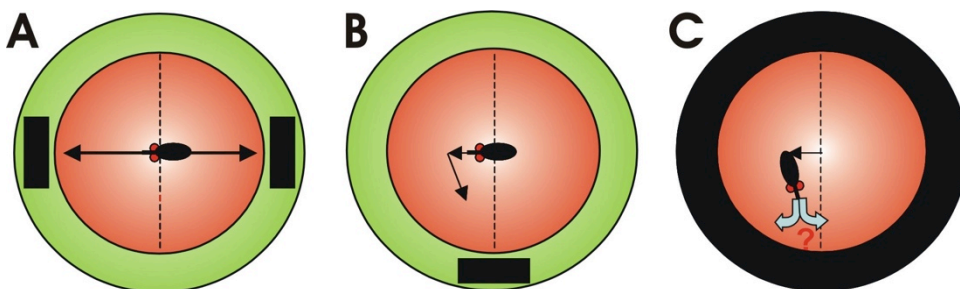
Fig. 3: Presenting two distracters does not impair the spatial orientation memory. After a fly was put into the cylindrical arena and patrolled once between two opposing stripes (A), these stripes disappeared as soon as the fly crossed the virtual midline. Instead of one distracter in the standard paradigm, now two distracters appeared opposite to each other and simultaneously (B). The fly either turns towards one or the other distracter.

After it has changed its direction, both distracters disappeared and it was determined whether the fly turns back towards its original target (C). (D) The memory performance of flies tested in the “two-distracter-paradigm” was not significantly different from the memory performance of flies tested in the standard paradigm ($N=11,11$; $U=34.5$; $p= 0.09$). Box plots: Bold horizontal lines represent the medians, squares the means, boxes the 25% and 75% quartiles, whiskers the 10% and 90% quantiles, and stars the extreme values. The horizontal line at 58% positive choices indicates the chance level.

4.1.2 The orientation strategy underlying the spatial memory seems to be idiothetic.

In a next step the question has been addressed, which strategy the flies are using to actually solve the orientation task. In principle, orientation can be either idiothetic or allothetic. Animals using landmarks, polarized light or other external cues to determine their position in the environment are using an allothetic form of orientation. In contrast, if the representation of the animals position in the environment is only determined by internal information about the own movements, like “I turned 5 degrees and walked 4 steps, then I turned 90 degrees and walked 5 steps”, this form of orientation is called idiothetic. In an attempt to determine, whether flies are using allothetic or idiothetic forms of orientation to establish their spatial orientation memory, all possible visual information during the decision phase was excluded by using the “LED-Off” paradigm (Fig. 4A-C). That is, all LEDs turned off when the distracter disappeared, while in the standard paradigm all LEDs turned bright. Otherwise, the experimental design was as previously described. During the decision phase the arena was completely dark except for a dark-room safe red light that is invisible to the flies and illuminated the platform from below to allow for video tracking.

Compared to wild-type flies tested in the standard paradigm, flies tested in the “LED-Off” situation did not behave significantly different (Fig. 4D; $N= 11,8$; $U= 31.5$; $p= 0.3$). Therefore, the formation of the spatial orientation memory seems to be independent of residual visual cues.



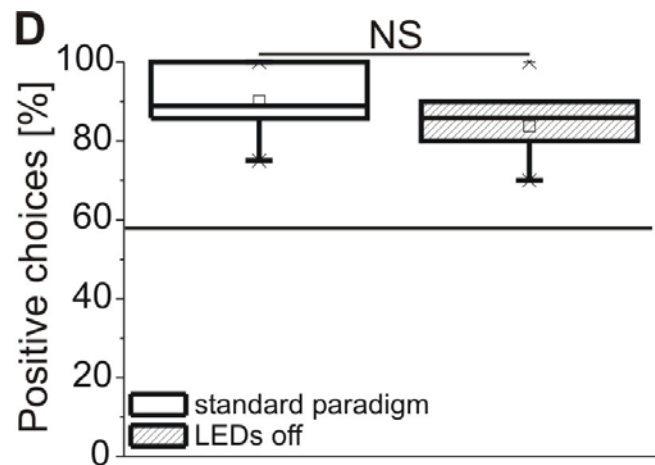


Fig. 4: The orientation memory is independent of visual cues. Flies were tested in the so called “LED off” paradigm (A-C) and compared to flies tested in the standard detour paradigm (see Neuser et al. 2008). (A) A fly is put in the LED arena and patrols between two opposing vertical black stripes. (B) On crossing the midline the stripes disappear and a lateral distracter appears. (C) After fixation of the distracter, it also disappears, while instantly the LEDs turn off. Therefore, during the decision phase, there is no obvious visual input for the flies. (D) The orientation memory of wild-type flies is not impaired when tested in the modified detour paradigm (N= 11,8; U= 31.5; p= 0.3). Box plots: Bold horizontal lines represent the medians, squares the means, boxes the 25% and 75% quartiles, whiskers the 10% and 90% quantiles, and stars the extreme values. The horizontal line at 58% positive choices indicates the chance level.

Apart from visual cues one more conceivable external reference system for an allothetic orientation could be the earth magnetic field. Flies are able to use magnetoreception for their orientation, whereby the blue-light sensor cryptochrome is suggested to function as the magnetoreceptor (Gegear et al. 2008). Therefore, flies which are either null mutants for *cryptochrome* (*cry⁰¹*) or which bear a mutated, function-less form of the chromophor (*cry^bss¹*) were tested in the standard detour paradigm. In a first measurement the memory performance of *cry⁰¹* and *cry^bss¹* mutant flies was not statistically different from wild-type flies (Fig. 5; N=10,10,11; H=3.88; p=0.14). Notably, at the same time the frequency of positive choices of *cry^bss¹* mutant flies was not significantly different from the chance level (Fig. 5; N=11; t=1.57; p=0.15). To analyze, whether the marker *spineless¹* (*ss¹*) is responsible for that indifferent phenotype, flies bearing just this marker were tested. In addition, measurements of *cry^bss¹* mutant flies were repeated twice. The marker *spineless¹* does not impair the memory and contrary to the first measurement *cry^bss¹* mutant flies showed a normal spatial orientation memory in the repetitions which was indistinguishable from wild-type (Fig.3; N=10,5,5,8 H=5.04, p=0.17). Taken together, the orientation strategy underlying the spatial orientation memory seems to be independent of visual cues, as well as of magnetoreception. We therefore

hypothesize that *Drosophila melanogaster* flies use an idiothetic form of orientation to orient themselves in the detour paradigm.

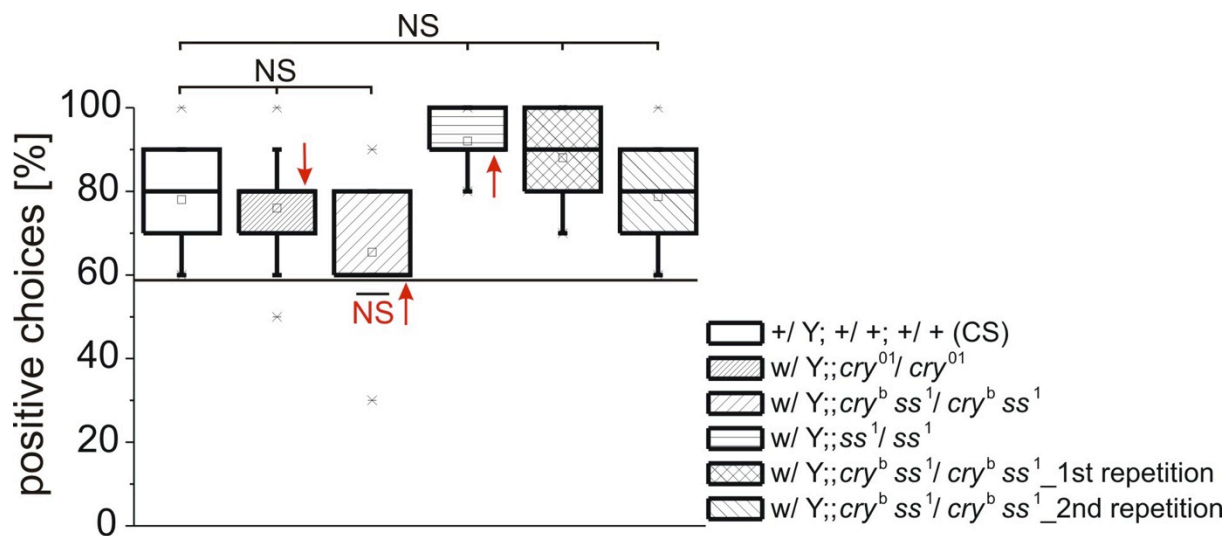


Fig. 5: Memory performance of *cryptochrome* mutant flies in the detour paradigm. Canton-S flies show normal orientation memory (median at 80%). In a first measurement *cry⁰¹* and *cry^bss¹* mutant flies do not differ from wild-type in their memory performance (N=10,10,11; H=3.88; p=0.14), whereas simultaneously *cry^bss¹* mutant flies do not behave significant different from chance level (N=11; t=1.57; p=0.15). On the contrary, in a second measurement the orientation memory of *cry^bss¹* mutant flies was not impaired, as it is not for *ss¹* mutant flies (N=10,5,5,8 H=5.04, p=0.17). Box plots: Bold horizontal lines represent the medians, squares the means, boxes the 25% and 75% quartiles, whiskers the 10% and 90% quartiles, and stars the extreme values. The red arrows point to the median. The horizontal line at 58% positive choices indicates the chance level.

4.2 Assessing the role of different structural central complex mutants in the spatial orientation memory

In Neuser et al. (2008) it has been shown that distinct subsets of the so called ring neurons are necessary and sufficient to mediate the memory formation. In order to examine the role of other central complex neuropils in establishing the spatial orientation memory, different structural central complex mutants have been tested in the detour paradigm.

Two of the four analyzed mutant strains, *ellipsoid-body open*^{KS263} (*ebo*^{KS263}), and *central-complex deranged*^{KS135} (*ccd*^{KS135}), were generated by chemical mutagenesis using ethylmethane sulfonate (EMS) as mutagen (Strauss and Heisenberg 1993). The mutant strain *agnostic*^{x1} (*agn*^{x1}) has been isolated in a behavioral study due to its low locomotor activity and *ocelliless*¹ (*oc*¹) has been first described due to the lack of the ocelli on top of the head. A lack

of the PB was detected later (Hirth et al. 1995). As some structural deformations do not occur in all animals or are variable in their expression within one strain, the structural defects of every single fly tested has been inspected using mass histology (Fig. 6).

The gene *ebo* has five known alleles, which all cause deformations of the EB. Animals of the allele *ebo*^{KS263} show a ventral cleft within the EB in about 61% of all cases, whereas in wild-type flies the EB is perfectly toroid-shaped (Fig. 6B). Neuser et al. 2008 have shown that *ebo*^{KS263} flies do not show any sign of a spatial orientation memory. In repeated experiments *ebo*^{KS263} flies did behave differently from the former measurement and the data were pooled. The memory performance of the EB mutants was not significantly different from chance level (Fig. 7; N=26; t=0.37; p=0.72), confirming the conclusion that the EB is necessary for the spatial orientation memory. Like in *ebo* mutant flies, the EB of *ccd*^{KS135} mutant animals shows a ventral cleft but in addition the noduli appear slightly deformed or fragmented (Fig. 6C,D). Within the detour paradigm the percentage of positive choices is not significantly different from chance level (Fig. 7; N=10; t=2.17; p=0.06). Therefore, these flies are not able to show the memory, which further confirms the necessity of the EB for the orientation memory. The mutant *agn*^{x1} also shows deformed or fragmented noduli (Fig. 6E). Again, flies of this mutant strain do not show a normal memory performance when tested in the detour paradigm (Fig. 7, N=10; t=2.17; p=0.06), suggesting that besides the EB, the noduli are necessary for spatial memory formation. The structural defect of *oc*^l flies in the PB has been first described by Hirth et al., 1995. Most parts of the PB are missing in *oc*^l flies, with exception of the two outermost glomeruli (Fig. 6F). In the detour paradigm *oc*^l flies are not able to show a spatial orientation memory and their percentage of positive choices is statistically not different from chance level (Fig. 7; N=10; t=-1.87; p=0.10). Wild-type Canton-S flies have been tested in parallel to ensure that the behavior *per se* is not influenced by external influences, which might have otherwise explained the negative results. The frequency of positive choices of Canton-S flies is highly significantly different from chance level (Fig. 7; N=15; t=7.14; p<0.001). That is, wild-type flies established a normal memory, which guaranties that the measurement conditions were suitable. Taken together, all examined substructures of the central complex, the EB, the NO and the PB are necessary to establish the memory.

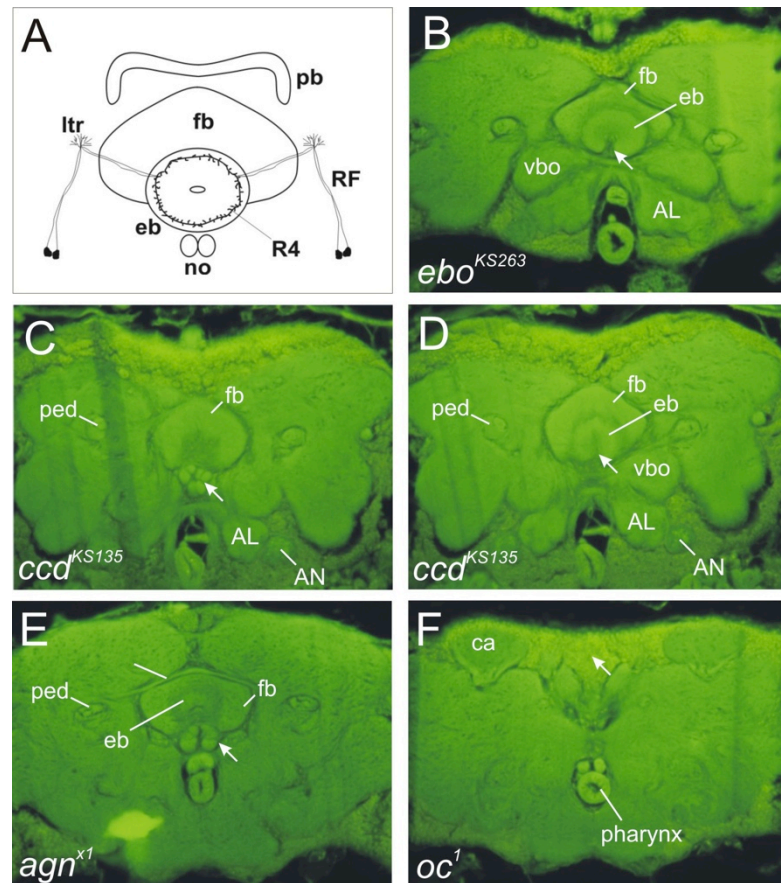


Fig. 6: Central complex defects of the structural mutants as they appear in paraffin sections (frontal view, B-F). A: Schematic frontal drawing of the central complex showing the arborization pattern of R4 ring neurons. The R4 neurites project from the perikarya via the RF tract to the ltr where they form spiny endings and then on to the EB where they are forming bleb-like endings. The RF tract comprises ring neuron and tangential fan-shaped body neuron tracts. B: *ebo*^{KS263} mutants show a ventral cleft within the EB (arrow). C,D: *ccd*^{KS135} mutant animals display two structural phenotypes: deformed NO and a ventral cleft in the EB (arrows). E: The NO are deformed in *agn*^{x1} mutant flies. F: In *oc*¹ mutants the PB is missing (arrow), except for the outermost glomeruli. AL: Antennal lobe, AN: Antennal nerve, ca: calyx, eb: ellipsoid body, fb: fan-shaped body, ltr: lateral triangle, no: noduli, ped: peduncle, RF: RF-tract, R4: ring neuron 4, vbo: ventral body.

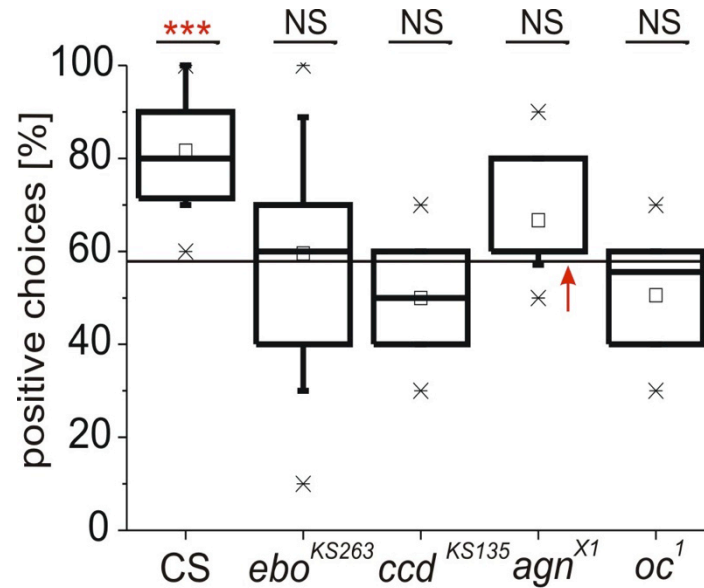


Fig. 7: The central complex is necessary for the orientation memory. Wild-type Canton-S flies are highly significantly above chance level ($N(\text{CS})=15$; $t=7.14$; $p<0.001$), whereas all examined structural mutant lines do not differ from chance level ($N(\text{ebo}^{\text{KS263}})=26$; $Z=0.37$; $p=0.72$; $N(\text{ccd}^{\text{KS135}})=10$; $Z=2.17$; $p=0.06$; $N(\text{agn}^{\text{X1}})=10$; $Z=2.17$; $p=0.06$; $N(\text{oc}^1)=10$; $Z=-1.87$; $p=0.1$). Box Plots: Bold horizontal lines represent the medians, squares the means, boxes the 25% and 75% quartiles, whiskers the 10% and 90% quantiles, and stars the extreme values. The red arrow points to the median of positive choices. The horizontal line at 58% positive choices indicates the chance level.

4.3 ignorant null mutant flies but not flies of the P-Element insertion and the precise jump-out line display aberrant spatial memory

Neuser et al. (2008) have shown that the gene *ignorant* (*ign*) is necessary and its restoration within R3 and R4d neurons sufficient to establish the spatial orientation memory. *ign* encodes a ribosomal serine kinase (RSK), named S6KII kinase (Wassermann et al. 1994). P to date only this isoform has been detected in *Drosophila*, whereas in mammals four RSK isoforms are known (Anjum 2008). The *ign* null mutant *ign*^{58/1} has been generated by an imprecise jump-out of a P-Element inserted into the *ign* gene (Putz et al. 2004). In addition to the null mutant, the P-Element insertion line *ign*^{P1} and a precise jump out line *ign*^{IP1} have been tested in the detour paradigm; they displayed normal spatial orientation memory not significantly different from wild-type (Fig. 8; $N= 11, 13, 18, 11$; $H= 2.23$; $p= 0.32$).

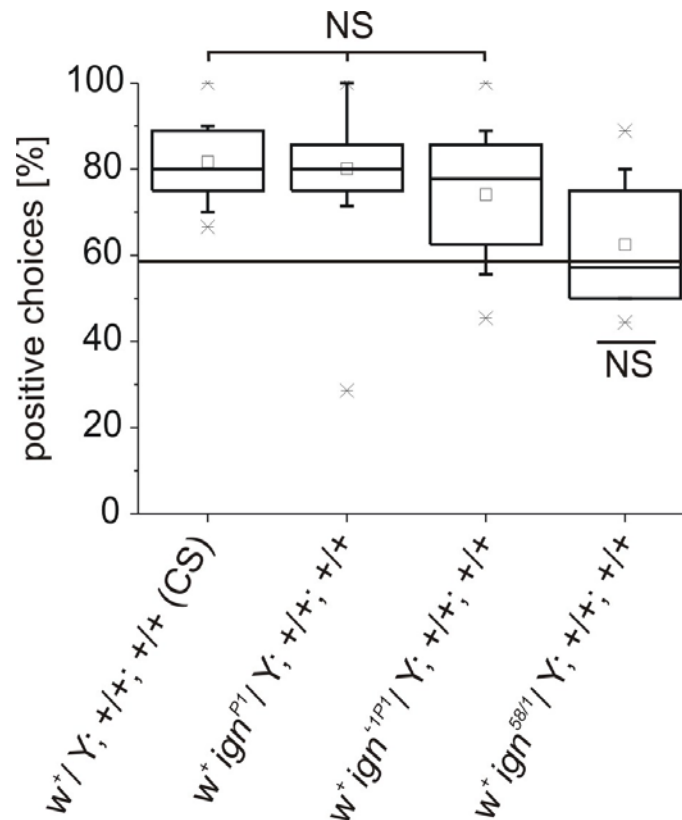


Fig. 8: The *ign* null mutant flies but not flies with a P-Element insertion or a precise jump-out display aberrant spatial memory. The spatial memory of the P-Element insertion line *ign^{P1}* and the precise excision line *ign^{IP1}* do not differ from wild-type CS flies (N= 11, 13, 18, 11; H= 2.23; p= 0.32). Contrary to that, an imprecise jump-out of the P-Element line (*ign^{58/1}*) leads to aberrant memory performance, indistinguishable from chance level (N=10; Z= 1.02; p= 0.33). Box Plots: Bold horizontal lines represent the medians, squares the means, boxes the 25% and 75% quartiles, whiskers the 10% and 90% quantiles, and stars the extreme values. The horizontal line at 58% positive choices indicates the chance level.

4.4 Investigation of possible S6KII interaction partners

The ribosomal serine kinase S6KII has been shown to interact with the ERK/MAPK cascade (Extracellular-signal Regulated Kinase / Mitogen-activated Protein Kinase). The *Drosophila* ERK homologue is *rolled* (*rl*) and the interaction between RL and S6KII leads to negative regulation of the ERK/RL-dependent differentiation of the eyes and wings (Kim et al. 2006). The binding of RSKs retains ERK in the cytoplasm, whereas their loss leads to nuclear translocation and enhanced transcription of RL in the eye. To examine whether this cascade plays a role in the spatial orientation memory, a hypomorphic loss-of-function mutant of the *rolled* gene, *rl^l* (Brunner et al. 1994; Biggs et al. 1994) and double-heterozygous *ign^{58/1}/rl^l* mutants have been tested in the detour paradigm. As *rl^l* heterozygous males displayed a spatial memory indistinguishable from wild-type (Fig. 9; N(*rl^l*)= 9, N(CS)= 13;

H= 2.8; $p= 0.25$) and double-heterozygous males show aberrant memory performance (Fig. 10A; N= 10; Z= 1.74; $p= 0.12$), a role of the ERK/MAPK pathway over RL in spatial memory formation can be excluded.

Furthermore, CK2 β activity (Casein Kinase 2 beta) seems to be required for S6KII action, at least concerning a function in circadian rhythmicity (Akten et al. 2009). S6KII null mutants display a shorter circadian period, show altered PER abundance and mutants of the regulatory CK2 β and catalytic CK2 α subunits composing the casein kinase 2 (CK2) protein are epistatic to a S6KII mutation (Akten et al. 2009). In order to reveal whether an interaction between CK2 β and S6KII is relevant to establish the spatial memory CK2 β heterozygous males and *ign^{58/1}/CK2 β* double-heterozygous females have been tested in the detour paradigm. CK2 β heterozygous males (Fig. 9; N(CK2 β)= 10, N(CS)= 13; H= 2.8; $p= 0.25$) and *ign^{58/1}/CK2 β* double-heterozygous females (Fig. 10B; N= 10, 10; U= 48; $p= 0.88$) displayed normal memory formation. This suggests that a direct interaction between S6KII and CK2 β is not necessary to mediate the spatial orientation memory.

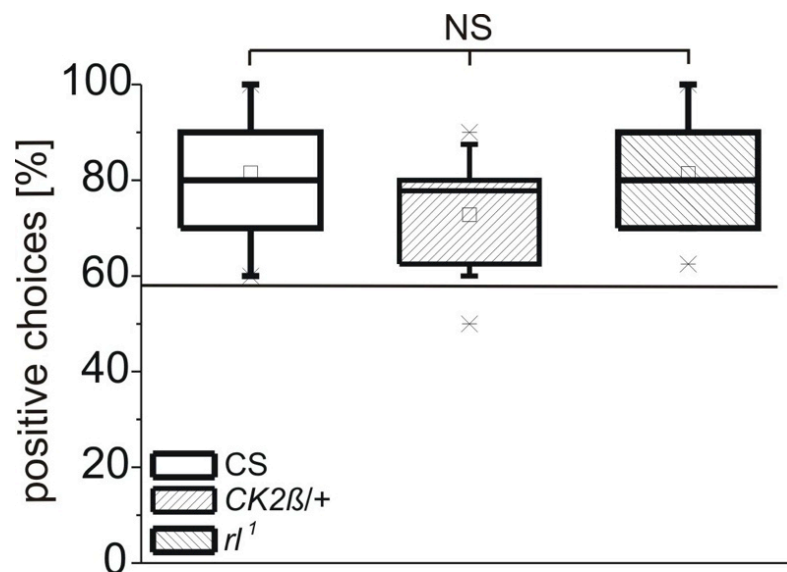


Fig. 9: Heterozygous *rl*¹ and CK2 β mutant males display normal memory performance. The spatial orientation memory of *rolled*¹ and CK2 β mutant flies is indistinguishable from wild-type CS flies (N= 13, 10, 9; H= 2.8; $p= 0.25$). Both mutations are localized to the 2nd chromosome. Box Plots: Bold horizontal lines represent the medians, squares the means, boxes the 25% and 75% quartiles, whiskers the 10% and 90% quantiles, and stars the extreme values. The horizontal line at 58% positive choices indicates the chance level.

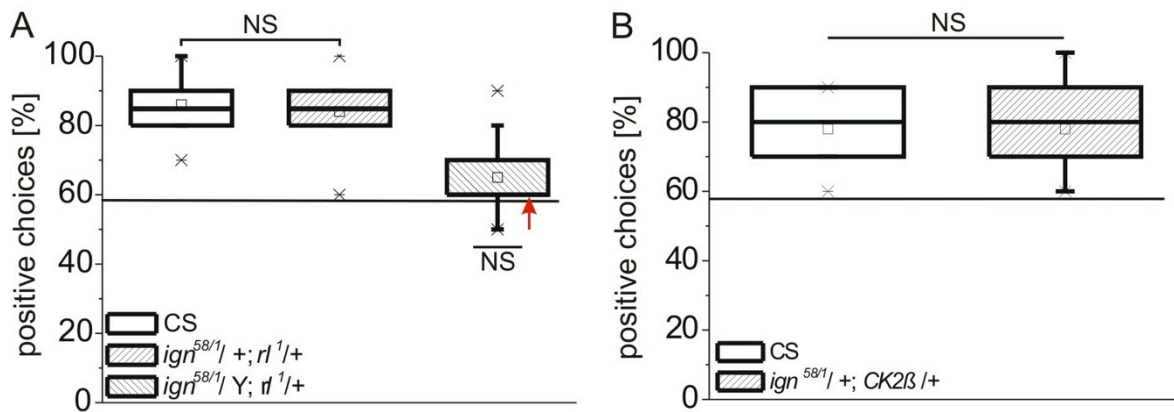


Fig. 10: Double-heterozygous mutants do not suggest a role of RL and CK2 β in spatial memory formation. (A) The *ign*^{58/1}/*r*^l double-heterozygous females display memory formation indistinguishable from wild-type CS flies (N= 10, 10; U= 47; p= 0.85). Contrary to that, memory performance of double-heterozygous *ign*^{58/1}/*r*^l male flies is not significantly different from chance level (N= 10; Z= 1.74; p= 0.12). (B) Double-heterozygous *ign*^{58/1}/*CK2β* mutant flies display a spatial memory indistinguishable from wild-type (N= 10, 10; U= 48; p= 0.88). Box Plots: Bold horizontal lines represent the medians, squares the means, boxes the 25% and 75% quartiles, whiskers the 10% and 90% quantiles, and stars the extreme values. The horizontal line at 58% positive choices indicates the chance level.

4.5 Examination of the role of different neurotransmitters in the spatial orientation memory

4.5.1 The GABA_A receptor subunit resistance to dieldrin (*Rdl*) seems not to play a role in spatial memory formation

GABA is the major inhibitory neurotransmitter in RNs (Hanesch et al. 1989). In a first attempt to verify whether GABA mediated neuronal transmission plays a role in the spatial orientation memory, two null mutants of the GABA_A receptor *Resistance to dieldrin*, *Rdl*¹ and *Rdl*^{f02294} have been tested in the detour paradigm. Both are homozygously lethal alleles. *Rdl*¹ was established by γ -irradiation (ffrench-Constant et al. 1991) and the *Rdl*^{f02294} allele results from an insertion of a piggy-Bac transposable element (Thibault et al. 2004). The original genotypes of these stocks are *w*; *Rdl*¹/TM3,*Sb* and *w*¹¹¹⁸; *Rdl*^{f02294}/TM6,*Tb*. For the detour experiments flies from stocks out-crossed to *w*(CS) for at least six generations have been used (Liu et al. 2007). They were out-crossed before the experiments to CS flies to eliminate the balancers. *Rdl*¹ flies and *Rdl*^{f02294} flies express normal memory performance not significantly different from wild-type CS flies (Fig. 11; N= 8, 10, 8; H= 1.89; p= 0.39). This might implicate that the GABA_A receptor RDL does not play a role in spatial memory formation. Alternatively, the level of reduction of the RDL protein could have been not sufficient enough to establish an impact on the spatial orientation memory. *Rdl*¹ and *Rdl*^{f02294}

flies display a 50% reduction of the RDL protein abundance compared to wild-type CS flies (Liu et al. 2007).

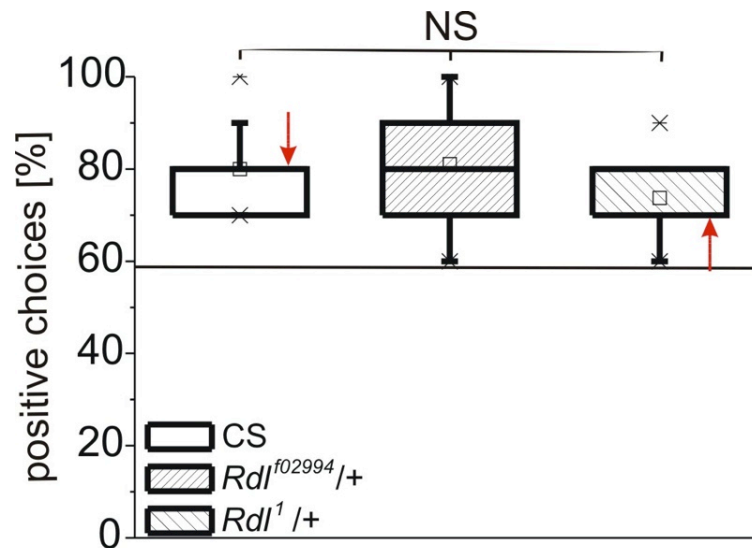


Fig. 11: *Rdl¹* and *Rdl^{f02994}* flies display normal spatial orientation memory. Heterozygous mutants of the GABA_A receptor *Resistance to dieldrin* (*Rdl*) perform not significantly different from wild-type Canton-S flies in the detour paradigm (N= 8, 10, 8; H= 1.89; p= 0.39). Red arrows point to the median. Box Plots: Bold horizontal lines represent the medians, squares the means, boxes the 25% and 75% quartiles, whiskers the 10% and 90% quantiles, and stars the extreme values. The horizontal line at 58% positive choices indicates the chance level.

4.5.2 *R3* and *R4d* ring neurons seem not to be cholinergic

Cholin acetyltransferase (Cha or ChAT) is the catalyzing enzyme of the neurotransmitter acetylcholine. Therefore, staining against Cha should display cholinergic neurons. Looking for the immunoreactivity of Cha, Yasuyamam and Salvaterra (1999) found, amongst other staining, a strong signal in the EB, suggestive to be R1 neurons. In order to examine whether R3 and R4d neurons are cholinergic, Cha-GAL80 flies were crossed to flies carrying the R3 and R4d driver line c232-GAL4 and the reporter UAS-mCD8::GFP (Aso et al. 2009). As GAL80 is a repressor of GAL4 and expressed in possibly every cholinergic neuron this should lead to full repression of GAL4 within R3 and R4d neurons, if these are cholinergic neurons. In that case, the green fluorescent protein (GFP; Yeh et al. 1995) would not be expressed and the green fluorescence of R3 and R4d neurons in immune-preparations of those brains would be missing. This was not the case, because in whole mount preparations R3 and R4d neurons displayed strong labeling when inspected under the confocal microscope (Fig. 12). The number of cell bodies was counted and a number between 23 and 27 per hemisphere was found. This finding is in line with earlier observations. Young et al. (2010)

analyzed the expression pattern of the GAL4 line c232 and counted approximately 20 neurons per hemisphere. Conclusively, R3 and R4d neurons are not cholinergic and acetylcholine seems not to be the neurotransmitter which mediates the spatial orientation memory within the R3 and R4d ring neurons.

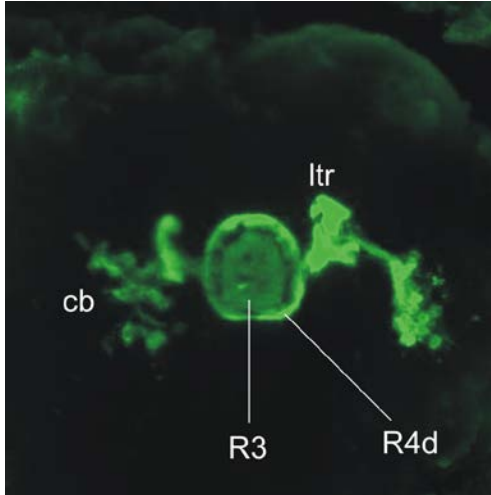


Fig. 12: Expression pattern of Cha-GAL80/Y;+UAS-mCD8::GFP; Cha-GAL80/c232-GAL4 flies. The whole set of R3 and R4d neurons addressed via the GAL4 driver c232 displays strong GFP fluorescence although the examined flies carried the repressor construct Cha-GAL80. cb: cell bodies, ltr: lateral triangle. A Z-projection of 98 focal sections (~ whole brain) is shown here. Whole mount preparation, antibody staining and confocal imaging as described in Poeck et al. (2008).

Diskussion

Suche nach Ressourcen, Fortpflanzungspartnern, Brut- oder Eiablageplätzen, Verstecken und die Verteidigung gegenüber Rivalen und Feinden sind überlebenswichtige Aufgaben eines jeden Lebewesens. All diese gründen auf einer gemeinsamen Fähigkeit, der zielgerichteten Orientierung. Diese wiederum basiert auf der sensorischen Wahrnehmung der Umgebung, auf dem Speichern und Wiederabrufen früherer Erfahrung und der Umsetzung dieser sensorischen und gespeicherten Informationen in motorische Aktionen.

Aber welche sensorischen Informationen sind in einem gegebenen Kontext relevant und wie werden diese Informationen in motorische Aktionen übersetzt? Wo findet im Gehirn der Übergang von der sensorischen Vorverarbeitung zur motorischen Kontrolle statt? Mit welchem Code werden dabei die Signale einer Station auf die nächste übertragen? Welche physiologischen Eigenschaften nutzen die vermittelnden Neurone? Hier setzt die vorliegende Arbeit an und die drei vorliegenden Veröffentlichungen komplementieren sich darin. In Neuser et al. 2008 wurde die Fähigkeit von Fruchtfliegen untersucht, ein räumliches Arbeitsgedächtnis zur Verbesserung ihrer Orientierung einzusetzen. Dies erfordert die sensorische Wahrnehmung des Zielobjektes, die Speicherung seiner Position, die kontinuierliche Integration von Eigen- und Objektposition, sowie die zielgerichtete Bewegung auf die gewählte Position hin. In Poeck et al. 2008, sowie in Triphan et al. 2010 geht es um die Umsetzung von akuter (und/oder gespeicherter) visueller Informationen auf die Schrittlänge bei laufenden bzw. kletternden Fliegen.

*Grundlagen eines räumlichen Arbeitsgedächtnisses bei *Drosophila melanogaster**

Räumliche Orientierung im Tierreich kann auf einer Vielzahl von Orientierungsstrategien beruhen welche prinzipiell zwei basalen Strategien untergeordnet werden können. Orientieren sich Tiere und Menschen anhand äußerer Referenzsysteme, so wird dies als allothetische Orientierung bezeichnet. Werden aber rein intrinsische (dem sich orientierenden Organismus innewohnende) Informationen benutzt, wird dies als idiothetische Orientierung bezeichnet. In beiden Fällen muss im Nervensystem des navigierenden Organismus seine eigene Position und die Position des Zielortes abgebildet sein, um diese in Bezug zueinander setzen zu können.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Fruchtfliegen genau diese Fähigkeiten besitzen, auch wenn das Zielobjekt nicht mehr sichtbar ist. Diese Fähigkeit beruht auf einem räumlichen Orientierungsgedächtnis und wurde im sogenannten „Detour“-Paradigma an Fruchtfliegen erstmals erkannt und untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass wildtypische

Fliegen, nachdem sie von ihrem ursprünglichen Kurs abgelenkt worden waren, zu 80% wieder auf die Position des primären, nicht mehr sichtbaren visuellen Zielobjektes zulaufen. Dabei stört die Präsentation eines zweiten Ablenkungsobjektes die Gedächtnisbildung nicht (Fig3, 4.1). Diese Präferenz zeigt, dass die neuronale Repräsentation des primären Zielobjektes im Gehirn stärker als die des Ablenkungsbalkens ist. Andernfalls würde die Fliege sich dem ursprünglichen Objekt nicht wieder zuwenden. Der Grund hierfür könnte sein, dass das primäre Objekt viel länger als das Ablenkungsobjekt präsentiert wird. Im Standardexperiment dauert die Präsentation des primären Objektes mehrere Sekunden, die des Ablenkungsobjektes dagegen nur 1s. Die Länge der Präsentation kann auf bis zu 4s ausgeweitet werden, ohne dass signifikante Auswirkungen auf das räumliche Gedächtnis für das erste Zielobjekt auftreten. Erst ab 4s Ablenkungsdauer (Fig. 1e, Neuser et al. 2008) kann man tendenziell eine Verschlechterung der Gedächtnisleistung erkennen. Die tatsächliche Länge des untersuchten räumlichen Gedächtnisses konnte jedoch nicht evaluiert werden, da die verwendete Testarena zu klein war und bei einer Ablenkungsdauer von mehr als 4s die Fliegen den Rand der Arena erreicht hatten, bevor der Ablenkungsbalken verschwunden war.

Die tendenzielle Annäherung des Medians für die Orientierungsentscheidung an das Zufallsniveau bereits bei 4s Ablenkungsdauer lässt darauf schließen, dass es sich bei dem vorliegenden räumlichen Gedächtnis um ein Arbeitsgedächtnis handelt, das definitionsgemäß nicht länger als 30s dauert, weil die Umwelt sich sowieso kontinuierlich verändert. Aus diesem Grund muss ein Arbeitsgedächtnis definitionsgemäß stetig aufgefrischt werden. In Affen kann ein solches räumliches Arbeitsgedächtnis im „optomotor delay response task“ (ODR; Funahashi 2005) gemessen werden. Dieser ist mit dem hier verwendeten „Detour“-Paradigma vergleichbar. In beiden Paradigmen folgt auf die primäre Fixierungsperiode die Präsentation eines zweiten visuellen Stimulus, dann die Verzögerungsperiode, in der keine weiteren Stimuli präsentiert werden und die schließlich die Antwortperiode. Während jedoch Affen durch Belohnung angehalten werden, sich die Position des zweiten visuellen Stimulus zu merken, zeigen Fruchtfliegen eine Gedächtnisleistung bezüglich des primären visuellen Stimulus, ohne dafür belohnt worden zu sein. Interessant wäre es bei Affen zu untersuchen, welcher Stimulus ohne Belohnung fixiert werden würde. Aber worin liegt die Motivation der Fliegen, Objekte im homogenen Raum zu fixieren? Auf der einen Seite stellt die Testsituation in der Laufarena einen unnatürlichen Lebensraum da, wodurch die Fliegen bestrebt sein könnten, dieser unangenehmen Lage zu entkommen. Auf der anderen Seite zeigen Fliegen in solchen Arena-Experimenten eine spontane Präferenz, dunkle Objekte zu fixieren (Götz 1980; Heisenberg und Wolf 1984). Dabei wird durch Hinwendung des Tieres das fixierte Objekt in

das frontale Sehfeld transportiert (Wehner und Horn 1975) und dessen Identität hauptsächlich mittels des Azimuts bestimmt (Schuster 1996).

Der Ausbildung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses unterliegt die Fähigkeit, zielgerichtete Bewegung hin zu sichtbaren und nicht mehr sichtbaren Objekten zu zeigen. So lange den Fliegen Objekte in der Laufarena präsentiert werden, handelt es sich dabei um eine allothetische Form der Orientierung. Die Zielobjekte stellen das externe Referenzsystem dar. Werden jedoch die Objekte ausgeblendet, könnte die Orientierung in idiothetischer Form erfolgen. Um dies zu verifizieren wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit versucht alle externen Referenzsysteme, speziell jedweden visuellen Eingang und die Rezeption von Magnetfeldern, auszuschalten (Fig. 4 und 5, 4.1). Selbst dann waren die Fliegen in der Lage, das räumliche Orientierungsgedächtnis auszubilden. Dies suggeriert, dass die Fliegen in der Lage sind, ihre eigene Bewegungsfolge zu speichern, zu rekapitulieren und zu integrieren. Sie scheinen, ähnlich wie die Wüstenameise *Cataglyphis fortis* (Wohlgemuth et al. 2001), idiothetische Orientierung unter Verwendung innerer Azimutfortschreibung und eines Schrittzählers nutzen zu können. Damit übereinstimmend wurde schon früher ein idiothetisches Kontrollsystem für die Vermittlung zielgerichteter Bewegung bei *Drosophila melanogaster* postuliert (Strauss und Pichler 1998). Cheung et al. 2008 beschreiben ein mathematisches Modell des sogenannten „elementaren Schrittes“, der basalen Einheit einer zielgerichteten Laufbewegung. Das Modell beweist, dass idiothetische Orientierung zielgerichtete Bewegung ermöglicht. In der Biologie wird dies als Pfadintegration bezeichnet.

Als zentrales Neuropil für die Pfadintegration, die Kontrolle der Lokomotion und zielgerichteter Bewegung gilt in Insekten der ZK (Vitzhum et al. 2010; Strauss 2002). Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der ZK auch für die Ausbildung des räumlichen Orientierungsgedächtnisses notwendig ist. Frühere Experimente haben gezeigt, dass speziell der EB eine wesentliche Rolle bei der Beibehaltung eines eingeschlagenen Kurses spielt (Mronz 2004; Pichler und Strauss 1998). Dies konnte anhand von Strukturmutanten bestätigt und auf die ZK-Neuropile PB und NO ausgeweitet werden (Fig. 7, 4.1). Da alle Strukturmutanten in der Lage waren, sichtbare Zielobjekte zu fixieren und sich darauf zuzubewegen, können Defekte in Lokomotion oder Fixierung als Ursache für Defekte im „Detour“-Paradigma ausgeschlossen werden. Demzufolge ist der ZK für die Gedächtnisleistung notwendig. Im Gegensatz dazu hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass die Pilzkörper für die Orientierungsgedächtnisbildung obsolet sind (Fig. 1g; Neuser et al. 2008). Weiterhin konnten die R1, R3 und R4d Ringneurone durch konditionale Tetanus Toxin Expression als Teil des neuronalen Netzwerkes räumlicher Gedächtnisleistung identifiziert

werden. Die Axone der Ringneurone ziehen in die lateralen Triangel, wo sie Dendriten ausbilden und von dort weiter in den EB, um präsynaptische Arborisationen in konzentrischen Ringen auszubilden. Den verbleibenden Ringneuron-Populationen R2 und R4m wird eine Rolle in der Ethanol-Toleranz und -Sensitivität zugeschrieben (Urizar et al. 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass R2 und R4m Ringneurone hinreichend für die *rutabaga*-abhängige Assoziation einer Hitzebestrafung mit einigen Parametern visueller Stimuli am Flugsimulator sind (Pan et al. 2009). Die Untersuchung der Notwendigkeit dieser Populationen innerhalb des „Detour“-Paradigmas war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da die entsprechenden Fliegenlinien Expression im Thorax aufwiesen, was bei der induzierten Expression von Tetanus Toxin zu starken Lokomotionsdefekten führte. Bislang ist unbekannt, wer die prä- und postsynaptischen Partner der Ringneurone sind. Dies gilt auch für die neurophysiologische Identität der Neurone. Einige Hinweise liefern Immunofärbungen gegen Neurotransmitter. γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der häufigste inhibitorische Neurotransmitter in Invertebraten (Hosie et al. 1997). Hanesch et al. (1989) beschrieben positive GABA-Immunoreaktivität der Ringneurone. Außerdem treibt GAD1-GAL4 Expression in GABAergen Neuronen; diese umfasst u.a. den EB und die lateralen Triangel (Enell et al. 2007). Des Weiteren brachten Immunofärbungen des vesikulären GABA Transporters vGAT eine starke Färbung des EB hervor (Enell et al. 2007), was auf präsynaptische Endigungen GABAerger Neurone innerhalb des EB schließen lässt. Diese Ergebnisse suggerieren, dass die Ringneurone GABAerge Neurone beinhalten. Dementsprechend sollten postsynaptische Neurone GABA Rezeptoren exprimieren. Adulte Expression des GABA_A Rezeptors RDL (Resistance to dieldrin; Aronstein und French-Constant 1995) scheint u.a. vermehrt innerhalb des EB detektierbar zu sein (Liu et al. 2007) und Färbungen gegen GABA_B Rezeptoren treten gehäuft in einer äußeren Schicht des EBs auf (Enell et al. 2007). Es ist also wahrscheinlich, dass sich entsprechende postsynaptische Endigungen im Zielneuropil der RN finden lassen. Sowohl GABA_A, als auch GABA_B Rezeptoren spielen eine Rolle bei der Trennung von Duftinformationen in den Antennalloben. Gleichfalls könnten GABAerge Neurone den Raum in verschiedene Bereiche des Koordinatensystems unterteilen und so Richtungsinformationen vermitteln. Allerdings konnte im Zuge dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Rolle des RDL Rezeptors im räumlichen Orientierungsgedächtnis gefunden werden. Weiterhin kann innerhalb des EBs starke Immunoreaktivität gegen das Acetylcholin katalysierende Enzym Cholin Acetyltransferase (ChAT) gefunden werden (Yasuyama and Salvaterra 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass zumindest die untersuchten R3 und R4d Neurone

cholinerg sind, da ihr GFP Expressionsmuster auch unter Verwendung von ChAT-GAL80 unverändert bleibt.

Innerhalb der lateralen Triangel scheinen RN Zielneurone dopaminergere Zellen des PPM3 Clusters zu sein (Kim et al. 2003), welche ihrerseits den Dopaminrezeptor DopR exprimieren (Kong et al. 2003). Demzufolge erhalten zumindest Teile der Ringneurone exzitatorischen Input über dopaminerge Zellen. Nichtsdestotrotz gibt es bislang keine Hinweise dafür, dass Dopamin an der Bildung des räumlichen Gedächtnisses beteiligt ist. So weisen auf das zentrale Nervensystem bezogen Dopamin defiziente Fruchtfliegen ein effizientes räumliches Gedächtnis auf (Riemensperger et al. 2011). Ebenso scheint ein durch aversive operante Konditionierung gebildetes Ortsgedächtnis unabhängig vom dopaminergen System zu sein, wobei das serotonerge System bei diesem Gedächtnis eine Rolle spielt. Immunofärbungen gegen Serotonin detektierten R3 und R4 Ringneurone (Hanesch et al. 1989). Dementsprechend sollten zukünftige Untersuchungen die Rolle des serotonergen Systems im neuronalen Netzwerk räumlicher Orientierung beinhalten. Vieles spricht dafür, dass die RN primär GABAerge Neurone sind und zumindest teilweise dopaminergen Input erhalten. Die Charakterisierung dieser Neurone und ihrer Partner steht jedoch noch ganz am Anfang, was vor allem deutlich wird, wenn man die potentielle Rolle von Neuropeptiden an Funktionen wie zum Beispiel Lokomotion und Expression innerhalb des ZK betrachtet (Kahsai et al. 2010; Khasai et al. 2011).

Erste Untersuchungen zu Lernen und Gedächtnis brachten zwei Gene hervor - *dunce* (*dnc*) und *rutabaga* (*rut*), welche Komponenten der zyklischen AMP (cAMP) Kaskade kodieren (Dudai et al. 1976). Transkription des *dunce* Gens führt zur Expression der cAMP Phosphodiesterase (Byers et al. 1981; Qiu et al. 1991) und *rutabaga* kodiert eine Typ I Ca²⁺/Calmodulin-stimulierte Adenyl Cyclase (Livingstone et al. 1984; Levin et al. 1992). Beiden Genen wird eine Rolle in einer Vielzahl von Verhaltensweisen bezüglich Lernen und Gedächtnis zugeschrieben (Keene and Waddell 2007), wobei RUT möglicherweise als Koinzidenzdetektor innerhalb der klassischen olfaktorischen Konditionierung agieren könnte (Zars et al. 2000; Mao et al. 2004). Einen Hinweis darauf, dass die cAMP Kaskade an der Vermittlung des räumlichen Orientierungsgedächtnisses beteiligt ist, konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Die entsprechenden Mutanten *rut*²⁰⁸⁰ und *dnc*¹ wurden im Detour Paradigma getestet, wobei *dnc*¹ mutante Fliegen eine normale Gedächtnisleistung zeigten (Fig. 2 in Neuser et al. 2008). Überraschenderweise konnten *rut*²⁰⁸⁰ mutante Fliegen nicht gemessen werden, da sie kein Fixationsverhalten auf die präsentierten Objekte zeigten. Dies steht im Gegensatz zu visuellen Fixationsuntersuchungen im stationären Flug (Liu et al.

2006). Im Flug werden sowohl horizontale als auch vertikale Bewegungskomponenten für die Kurskontrolle genutzt, wohingegen im Laufen vertikale Bewegungskomponenten möglicherweise nicht gebraucht werden. Dieser Unterschied könnte zusätzliche Mechanismen im Flug nötig machen und eine Erklärung für das fehlende Fixationsverhalten laufender *rut*²⁰⁸⁰ mutanter Fliegen sein.

Im Gegensatz dazu ergab die Untersuchung einer weiteren Lernmutante *ignorant*^{58/1} (*ign*^{58/1}; Putz et al. 2004), dass die durch das *ign* Gen kodierte ribosomale Serin Kinase S6KII notwendig und in R3 und R4d Ringneuronen hinreichend für die Vermittlung des räumlichen Gedächtnisses ist (Fig. 3, 4, in Neuser et al. 2008). Diese S6KII Kinase wird auch bei der klassischen olfaktorischen, sowie bei der operanten Konditionierung gebraucht (Putz et al. 2004), wobei in beiden Fällen das notwendige neuronale Expressionsmuster unbekannt ist. Außerdem konnte eine erhöhte Zahl synaptischer Boutons an der neuromuskulären Endplatte von *ign*^{58/1} Larven gemessen werden (Fischer et al. 2009). Interessanterweise werden sowohl der *Drosophila* S6KII, als auch dem entsprechenden Ortholog in Vertebraten – RSK2 - eine Rolle bei der Vermittlung von Lernen und Gedächtnis zugeschrieben, wobei hier eine Homologie von 60% mit der RSK2 in Mäusen vorliegt (Wassarmann 1994). So weisen RSK2 knockout Mäuse ein defektes Arbeitsgedächtnis und ein langsames räumliches Gedächtnis auf (Yang et al. 2004) und Mutationen im humanen RSK2 Gen verursachen eine X-chromosomale Erbkrankheit mit geistiger Beeinträchtigung, das Coffin-Lowry-Syndrome (Trivier 1996). Des Weiteren interagieren Ribosomale Serin Kinasen, wie RSK2 in Vertebraten mit der ERK/MAPK Kaskade (Frodin and Gammeltoft 1999). In *Drosophila melanogaster* ist bekannt, dass im Zuge der Augen- und Flügelentwicklung S6KII inhibitorisch auf ERK wirkt (Kim et al. 2006). Träfe dies für das räumliche Gedächtnis auch zu, würde die Inhibition in den Nullmutanten wegfallen und eine „Überaktivierung“ des ERK Weges den mutanten Phänotyp bedingen. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da doppel-heterozygote Mutanten der *Drosophila* ERK (*rolled*¹) und *ign*^{58/1} weiterhin aberrante Gedächtnisleistung zeigten. Skoulakis und Davis (1996) zeigten mit Hilfe der *leonardo* Mutante, dass die MAPK Kaskade eine Rolle bei der klassischen Konditionierung von Fruchtfliegen spielt. Weitere Untersuchungen zur Rolle der MAPK Kaskade am räumlichen Gedächtnis könnten mit Hilfe dieser Mutante durchgeführt werden. Als weiterer S6KII Interaktionspartner gilt die Casein Kinase II. So wurde für die oszillatorische Funktion des circadianen Proteins PER beschrieben, dass CK2β notwendig für die Aktivierung von S6KII ist (Akten et al. 2009). Im Gegensatz dazu konnte eine Rolle der Casein Kinase CK2β für das räumliche Gedächtnis nicht gezeigt werden. Hinweise auf die

Funktion eines Proteins liefert neben der molekularen Interaktion die zelluläre Lokalisation des Proteins. Die S6KII RNA Abundanz ist im Nervensystem höher, als in jedem anderen Gewebe (FlyAtlas database; Chintapalli et al. 2007). Allerdings war es bisher nicht möglich, durch Antikörperfärbung die Verteilung von S6KII innerhalb des Zentralhirns darzustellen, ohne S6KII künstlich überzuexprimieren (Kim et al. 2006; Akten et al. 2009). Die Verwendung von genomisch GFP-markiertem RSK liefert Hinweise auf eine präsynaptische Lokalisation der S6KII Kinase (Fischer et al. 2009). Außerdem weist dieses Fusionsprotein ein erhöhtes Expressionsniveau in den Calyces der Pilzkörper, sowie in der PB und im EB auf (Daten nicht gezeigt), was aber im Zuge dieser Arbeit nicht näher verifiziert werden konnte. Dies mag zum Teil an der relativ starken Expression im gesamten Gehirn liegen. Demzufolge werden sensitivere Antikörper oder andere Färbekonditionen benötigt, um das Expressionsmuster innerhalb adulter Gehirne zu bestimmen.

Zu guter Letzt zeigt die Arbeit, dass S6KII nicht nur notwendig, sondern in R3 und/oder R4d Ringneuronen auch hinreichend für die Vermittlung des räumlichen Gedächtnisses ist. Gemessen an der weitreichenden Expression der S6KII mRNA umfassen die R3 und R4d Neurone eine vergleichsweise winzige Zellpopulation. Young et al. (2010) zählten unter Verwendung derselben, im Zuge dieser Arbeit verwendeten GAL4-Linie c232 pro Hemisphäre ungefähr 20 Neurone; hier wurden in sechs Gehirnen 23-27 Zellkörper pro Hemisphäre detektiert. Überraschenderweise reicht es, *ignorant* in nur einzelnen Populationen von Ringneuronen zu retten (R3, R4d), wohingegen auch die Blockade der R1 Ringneurone mit TNT eine defekte Gedächtnisleistung hervorruft. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Stilllegung der synaptischen Übertragung in den R1 Neuronen keine Auswirkung auf das Gedächtnis selbst hat, sondern z.B. auf das Ein- oder Auslesen. Alternativ könnten die R1 Neurone eine andere Signalkaskade nutzen, als die R3 und die R4d Neurone. Die R1 Neurone projizieren in den anterioren Teil und die R3, R4d Neurone in den posterioren Teil des EB. Neben der anatomischen könnte hier auch eine molekulare Segregation der Untereinheiten vorliegen.

Wie könnte nun das neuronale Netzwerk des räumlichen Gedächtnisses aussehen? Das visuelle System ist retinotop aufgebaut, d.h. abhängig von der Position eines Objektes feuert ein entsprechendes Set visueller Neurone. Diese räumlich distinkte Aktivierung wird durch laterale Inhibition ausgeschärft. Nachgeschaltete Neurone übertragen diese Information vermutlich auch retinotop auf höhere Hirnareale. Die entsprechenden nachgeschalteten Neurone könnten somit die Position eines Objektes im Raum kodieren. Im Fall von Vertebraten erhöhen Ortsneurone ihre Feuerfrequenz umso mehr je besser ausgerichtet sich

die Körperachse des Tieres zum Objekt befindet. Diese würden demnach das Ergebnis einer Übereinstimmung zwischen Objektposition und Eigenposition darstellen, was eine Integrationsstelle notwendig macht. Darauf basierende räumliche Gedächtnisse könnten wieder von anderen Neuronen repräsentiert werden. Für *Drosophila melanogaster* kann man folgendes Bild zeichnen.

Die visuelle Zielsteuerung auf ein Objekt scheint durch das HFS vermittelt zu werden. Dem postulierten Modell nach würde die Position eines Objektes in der Brücke kodiert werden (Triphan et al. 2010). Die latero-laterale Ausdehnung der Brücke steht für die Azimutposition des Zielobjektes. Die Weiterleitung der Information erfolgt durch Neurone des HFS, die mittels Projektion in die Ventralkörper und über die dort vermuteten Eingänge auf absteigende Neurone die Schrittlänge erhöhen und so zielgerichtete Bewegungen initiieren. Über diesen neuronalen Pfad würde also die lokomotorische Komponente gesteuert werden. F-Neurone, die in den FB projizieren, sind wiederum an der Speicherung konditionierter Parameter visueller Objekte beteiligt. Eine Integration der beiden Eingangsinformationen ‚Ort eines Objektes‘ und ‚Art eines Objektes‘ könnte demnach im FB erfolgen und das HFS würde den Ort eines Objektes kodieren, wenn der visuelle Stimulus sichtbar ist. Wie werden aber Objektpositionen gespeichert, wenn die Objekte nicht mehr sichtbar sind? Hier kommt der EB ins Spiel. Für die Vermittlung eines räumlichen Arbeitsgedächtnisses werden die Ringneurone gebraucht. Die Formierung eines solchen Gedächtnisses benötigt die Information über die Eigenposition, die Speicherung der Objektposition und die Integration der beiden Informationen. Dementsprechend braucht das Gedächtnis mindestens drei Relay-Stationen: Eine Objektpositions-relevante Schaltstelle, eine Schaltstelle, die der Eigenposition dient und eine Integrationsschaltstelle. Da es sich im vorliegenden Fall um ein sehr kurzes, sprich Arbeitsgedächtnis handelt, soll in diesem Modell angenommen werden, dass eine diskrete Speicherschnittstelle nicht zwingend notwendig ist. Vielmehr sollte die Informationsspeicherung über anhaltende neuronale Aktivität erfolgen. Dill et al. postulierten 1993, dass stabile Objektfixation über ein anhaltendes stabiles Abbild des Objektes auf der Retina hervorgerufen wird. Demzufolge würden alle nachgeschalteten Neurone kontinuierlich aktiviert werden und so die Informationserhaltung gewährleisten. Verschwindet dieses Objekt nun kurzfristig aus dem Gesichtsfeld, könnte anhaltende neuronale Aktivität, wie für die PFC Neurone von Affen im delay task beschrieben (Funahashi 2006), eine kurzfristige Speicherung der Position ermöglichen. Weiterhin wird angenommen, dass die Ringneurone Teil des Netzwerkes sind, das die Eigenposition vermittelt. Die ringförmige Anordnung der Neurone könnte eine Abbildung der Umwelt in

einem 360° Ring suggerieren. Hartmann und Wehner beschrieben 1995 ein solches Modell für die Pfadintegration. Erst kürzlich wurde ein visueller Eingang in die lateralen Triangel ausgehend von den optischen Tuberkeln identifiziert (Pereanu et al. 2011). Vermutlich erfolgt dieser über dopaminerge Neurone (Kong et al. 2010). Weiterhin wird angenommen, dass die Ringneurone primär GABAerg sind. Dies würde bedeuten, dass die Orientierungsrichtung der Fliege eine Aktivierung inhibierender Neurone an der entsprechenden Position im Koordinatensystem hervorruft. Die Ringneuronen wären somit die „Raumtrenner“ und würden ähnlich der inhibitorischen Neurone in den Antennalloben für die Auftrennung eingehender Information sorgen. Ungeklärt ist, welche Neurone postsynaptisch zu den Ringneuronen sind. Eine Kandidatengruppe wären die kolumnären Neurone des ZK. Angenommen, diese Neurone wären konstitutiv aktiv, dann hätte die Aktivierung diskreter Ringneurone zur Folge, dass diese Aktivität auf einen bestimmten Bereich innerhalb der 360° eingeschränkt würde, passend zur Eigenposition des Tieres. Die kolumnären Neurone verbinden zum Teil mehrere Neuropile des ZK miteinander. Zu ihnen zählen zum Beispiel die Neurone des HFS. Hier könnte zum Beispiel innerhalb des FB die Integrationsstelle beider Netzwerke sein. Auf der einen Seite ziehen kolumnäre Neurone vom EB zum FB und leiten so die Informationen bezüglich der Eigenposition weiter. Auf der anderen Seite wird die Objektposition über das HFS in den FB geleitet. Die HFS Neurone besitzen dort sowohl prä-, als auch postsynaptische Endigungen, was für eine Informationsintegration an dieser Stelle sprechen könnte. Hier könnten auch die Informationen eines visuellen Gedächtnisses von Objektparametern integriert werden. Die resultierende Information könnte dann weiter über die Fasern des HFS an die Ventralkörper übertragen werden und dort über Verschaltungen in den Thorax in motorische Kontrolle der Schrittlänge übersetzt werden.

Damit eröffnen sich die folgenden, zukünftigen Fragestellungen. Wie stehen das kurzlebige Arbeitsgedächtnis und das länger andauernde Ortsgedächtnis miteinander in Verbindung? Sind sie voneinander völlig unabhängig oder kann das Arbeitsgedächtnis in eine längere anhaltende Gedächtnisform umgeschrieben werden? Falls ja, sind dafür mehrerer Wiederholungen nötig? Ist es Voraussetzung, dass für die Bildung eines Langzeitgedächtnisses die Bildung eines mittleren und diesem die Bildung eines Arbeitsgedächtnisses vorangeht? Auf der anderen Seite sollten zukünftige Studien bezüglich des räumlichen Arbeitsgedächtnisses in *Drosophila melanogaster* die Identifikation des neuronalen Netzwerkes beinhalten. Neben neurogenetischen Untersuchungen könnte versucht werden, neurophysiologische Untersuchungen zu etablieren. In Affen hat man herausgefunden, dass Neurone des dorsolateralen präfrontalen Cortex während der Stimuluspräsentation räumlich

selektive phasische Aktivität aufweisen. In *Drosophila melanogaster* wäre es besonders interessant zu sehen, ob die Neurone der Brücke oder des EB Ortsneurone sind. Während der Verzögerungsperiode können tonisch anhaltende Feuerraten im PFC von Affen gemessen werden (Wilson et al. 1993). Diese dauern bis über die Antwortphase an, sind räumlich selektiv und können normalerweise nicht oder nur verkürzt gemessen werden, wenn das Tier keine oder eine falsche Antwort gibt. Hier könnte also das Gedächtnis lokalisiert sein. Des Weiteren weisen PFC Neurone in Affen eine periodische Aktivität während der Antwortphase auf, was einen Hinweis auf die Ausgangsneurone liefert. Eine Information löst somit unterschiedlichste Reaktionen innerhalb von Neuronengruppen aus. Solche Studien liefern wichtige Hinweise für die Lokalisation eines Gedächtnisses, allerdings sollte man beachten, dass die Modalitäten und Qualitäten eines Stimulus an verschiedenen Stellen gespeichert werden könnten. So zeigte eine Studie in *Drosophila melanogaster*, dass unterschiedliche Merkmale visueller Stimuli durch unterschiedliche neuronale Untereinheiten im FB repräsentiert werden (Liu et al. 2006). Außerdem könnte Redundanz dazu führen, dass verschiedene Neuronengruppen parallel und unabhängig voneinander notwendig für eine Gedächtnisleistung sein könnten. So scheinen für das *rutabaga*-abhängige Gedächtnis visueller Parameter nicht nur die F-Neurone, sondern auch Untereinheiten von RN hinreichend zu sein (Pan et al. 2009).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Aufmerksamkeit. Eine Fokussierung der Aufmerksamkeit und damit die Filterung irrelevanter Informationen verstärkt das Arbeitsgedächtnis (Awh et al. 2006). So kann eine aberrante Gedächtnisleistung vielseitige Ursachen haben: die gestörte Fähigkeit, die Aufmerksamkeit zu fokussieren oder relevant zu verschieben, die gestörte Prozessierung oder Auslesung einkommender bzw. ausgehender Informationen, eine aberrante Informationsspeicherung, sowie eine fehlende Integrationsfähigkeit für relevante Informationen. Nimmt man noch hinzu, dass verschiedene Orte und Signalwege für all dies Aufgaben existieren könnten, ergibt sich damit ein äußerst kompliziert Bild. Dieses Bild zu klären, neuronale Netzwerke zu charakterisieren, ist das ehrgeizige Ziel neurobiologischer Forschung.

Das neuronale Netzwerk visuell stimulierter zielgerichteter Bewegung

Den beiden weiter publizierten Arbeiten (Poeck et al. 2008; Triphan et al. 2010) gemein sind die Präsentation eines visuellen Stimulus und die der Fruchtfliegen innewohnende Motivation, diesen anzusteuern. In Poeck et al. (2008) wird die Strukturmutante *tay bridge*¹ molekular analysiert und die daraus resultierenden Konstrukte benutzt, um die Umsetzung visueller Information in gerichtete Bewegung im ZK zu studieren. Folgende Verhaltensparadigmen kamen zum Einsatz: Schnelle Phototaxis (Benzer 1967), Buridan'sches Paradigma (Götz 1980; Strauss et al. 1992) und optomotorische Kompensation in einer LED-Laufarena (Strauss et al. 1997). In Triphan et al. (2010) wird ein komplexeres, von visuellem Eingang abhängiges motorisches Verhalten, das Kletterverhalten über Lücken im sogenannten Lückenüberwindungs-Paradigma (Pick et al. 2005), untersucht. Innerhalb dieses Paradigmas kann zum einen die Fähigkeit, korrekte Entscheidungen in Abhängigkeit von der Lückenbreite zu treffen analysiert werden, da wildtypische Fliegen unüberwindbare Lücken meiden. Zum anderen müssen die Fliegen beim Klettern über die Lücke die Richtung halten, eine Fähigkeit, deren neuronale Grundlagen erforscht wurden.

Welche Neuronengruppen vermitteln visuelle Orientierung? Aberrante Koordination und Regulation des Laufverhaltens sind eng korreliert mit anatomischen Deformationen der Neuropile des Zentralkomplexes (Strauss und Heisenberg 1993; Strauss 2002). Demzufolge wurden in beiden Publikationen Fliegen untersucht, die strukturelle Deformationen im ZK und speziell in der PB besitzen. Während die Brücke in *tay bridge*¹ Fliegen eine sagittale Einschnürung in der Mitte aufweist, fehlt die Brücke in *ocelliless*¹ Fliegen nahezu gänzlich; nur die zwei äußersten Glomeruli (No. 8 in jeder Hemisphäre) und manchmal anderes brüchiges PB-Material entwickeln sich. Poeck et al. (2008) zeigen, dass die lokomotorische Kontrolle in *tay bridge*¹ Fliegen gestört ist. Sie laufen weniger als halb so langsam wie wildtypische Fliegen und weisen nur ¼ der Laufaktivität wildtypischer Fliegen auf. Diese Ergebnisse sind konkordant mit früheren Laufanalysen von PB-Strukturmutanten: *no-bridge*^{KS49} (Strauss et al. 1992) und *eyeless*^{JD} (Callaerts et al. 2001) und werden vermutlich durch ein fehlendes Vermögen bedingt, die Schrittlänge höheren Geschwindigkeiten oder Drehbewegungen anzupassen (Strauss et al. 1992). Außerdem sind *tay bridge*¹ Fliegen nicht in der Lage, rotierende Muster zu kompensieren, was jedoch mit Neuronen des FB assoziiert wird. Die visuelle Zielgenauigkeit in PB-Strukturmutanten ist gestört. Sowohl *tay bridge*¹, als auch *ocelliless*¹ Fliegen können zwar korrekte Entscheidungen betreffend überwindbarer Lücken treffen, sie sind aber weniger in der Lage, die Zielplattform am gegenüber liegenden

Ende der Lücke korrekt anzusteuern. Sobald sie den Kletterversuch initiiert haben, rudern sie öfter in die Leere als wildtypische Fliegen.

Demnach scheint eine intakte PB nötig, um Laufgeschwindigkeit (über Schrittlänge), Laufaktivität und Zielgenauigkeit bei der Ansteuerung visueller Stimuli korrekt zu vermitteln. Um dies zu verifizieren, wurden in beiden Publikationen Rettungsversuche der anatomischen und verhaltensspezifischen Phänotypen in *tay bridge*¹ Fliegen unter Verwendung verschiedener GAL4-Linien durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass mit der Rettung des anatomischen Phänotyps in *tay bridge*¹ mutanten Fliegen auch eine Rettung der Verhaltensphänotypen einhergeht. Im Fall des Lückenparadigmas geht die Rettung jedoch verloren, präsentiert man den Fliegen nur die Oberfläche und nicht auch eine Seitenfläche der Zielplattform. In diesem Fall fehlt der starke, frontale visuelle Eingang, der demnach notwendig ist, um visuelle Zielgenauigkeit zu erreichen. Zur Identifizierung der für die Rettung relevanten Neuronenpopulationen wurden die Expressionsmuster der entsprechenden GAL4-Linien miteinander verglichen und ein gemeinsames Expressionsmuster gefunden: das Horizontale Fasersystem (HFS; Hanesch et al. 1989). Dieses isomorphe Neuronenset scheint notwendig für die lokomotorische Kontrolle und die zielgenaue Bewegung bei der Ansteuerung visueller Objekte zu sein.

Das Horizontale Fasersystem (HFS) gehört zu den kolumnären Kleinfeldneuronen und besteht aus 16 Faserbündeln zu je 3 bis 4 Neuronen. Diese verbinden entlang der transversen Achse jeden PB Glomerulus mit einem der acht vertikalen FB Segmente und projizieren anschließend in die Ventralkörper (Abb. 13). Dabei besitzen die HFS Neurone folgende Polarität: Postsynaptische Endigungen in der PB, prä- und postsynaptische Endigungen innerhalb des FB und präsynaptische Arborisationen in den Ventralkörpern (Hanesch et al. 1989, Young et al. 2010). Eingangssignale erhält das HFS also innerhalb der PB und des FB, Ausgangssignale werden auf Neurone der Ventralkörper übertragen.

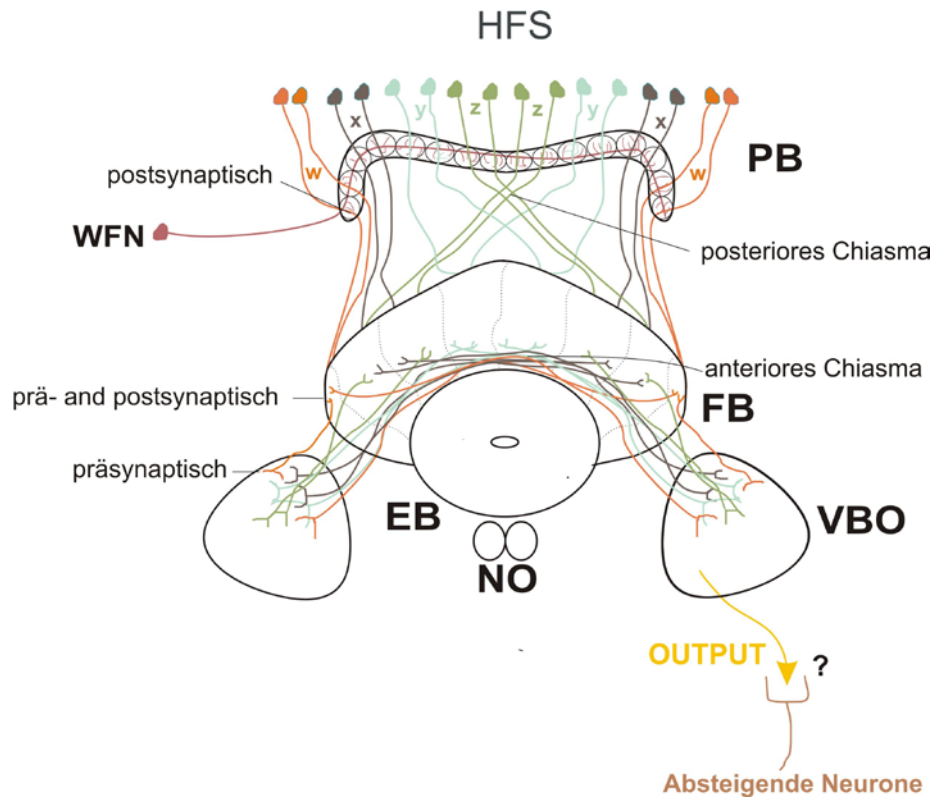


Abb. 13: Das horizontale Fasersystem (HFS) (adaptiert von Hanesch et al. 1989). Das HFS besteht aus 16 Faserbündeln, die jeweils 3-4 Neurone umfassen und die Glomeruli (No.8-1 pro Hemisphäre) der Protocerebralbrücke (PB) mit den vertikalen Segmenten des Fächerförmigen Körpers (FB) verbinden. Dabei sind jeweils zwei Faserbündel benachbarter Glomeruli zu vier Trakten w, x, y und z zusammengefasst. Die Faserbündel der Glomeruli 1-3 und 4-7 kreuzen die korrespondierenden Bündel der anderen Hemisphäre sowohl posterior (posteriore Chiasma), als auch anterior (anteriore Chiasma) des FB. Vom FB aus terminieren die Fasern in die Ventralkörper (VBO), wobei die Fasern der PB Glomeruli 1-7 in den kontralateralen VBO und Fasern des 8. Glomerulus in den ipsilateralen VBO projizieren. Wide-field Neurone (WFN) ziehen von einem lateralen Ende der Brücke bis zum anderen Ende, zählen jedoch nicht zum HFS.

Um die Rolle des HFS an der lokomotorischen Kontrolle bei der Ansteuerung visueller Objekte zu überprüfen, wurde in Poeck et al. (2008) die präsynaptische Transmitterübertragung in den Neuronen des HFS mittels konditionaler Expression des Neurotoxins Tetanus (TNT; Sweeney et al. 1995) blockiert. Unter Einsatz des temperatursensitiven GAL4-Repressors (McGuire et al. 2002) GAL80^{ts} konnte die Expression des Toxins zeitlich beschränkt nur im adulten Tier und somit entwicklungsunabhängig erfolgen. Im HFS TNT exprimierende Fliegen laufen langsamer und sind weniger aktiv und zwar in gleichem Maße wie *tay-bridge*¹ Fliegen. Dieses Ergebnis untermauert die Annahme, dass das HFS Teil des neuronalen Netzwerks visuell gesteuerter Orientierung ist.

Die Expressionsmuster von GAL4-Linien umfassen selten nur eine Neuronengruppe. Außerdem kann das Expressionsmuster durch die Entwicklung des Tieres variieren. Manipuliert man Neurone durch die Expression eines Effektors, schließt dies ohne konditionale Restriktion nicht aus, dass die beobachteten Phänotypen auf der Effektorexpression zu irgendeinem Zeitpunkt in der Entwicklung beruhen. Hinzu kommt, dass in der älteren Literatur häufig die Expression in den optischen Loben und den thorakalen Ganglien nicht überprüft wurde, was zu falschen Rückschlüssen bei der Korrelation von Verhalten mit anatomischen Strukturen führen kann. Die hier aufgeführten Resultate basieren aber auf verschiedenen Ansätzen: Strukturmutanten, Rettungsversuche mittels verschiedener GAL4-Linien und konditionale Manipulation der Kandidatenneurone, so dass ein gefestigtes Modell postuliert werden kann.

Das Modell geht von der Annahme aus, dass die Glomeruli der PB die Position eines visuellen Objektes, genauer die Horizontalwinkel (Azimut) von Objekten in der Außenwelt abbilden. Entsprechend würden die sagittalen Glomeruli das frontale visuelle Sehfeld repräsentieren und die lateralen Glomeruli Positionsinformationen des visuellen Randfeldes hinter der Fliege abbilden. Passend dazu sind die hier untersuchten Strukturmutanten mit Läsionen der sagittalen PB-Glomeruli nicht in der Lage, frontal liegende Objekte zielgenau anzusteuern. Außerdem verbessert die Rettung des anatomischen *tay-bridge*¹ Phänotyps die zielgerichtete Ansteuerung nicht, wenn man den frontalen visuellen Eingang durch spezielle Sehobjekte minimiert. Letzteres suggeriert, dass in der Brücke keine Form von Positionsgedächtnis gebildet wird und zeigt, dass kontinuierlicher visueller Eingang für die Zielsteuerung nötig ist.

Angenommen, ein visuelles Zielobjekt befindet sich auf einer Seite des Gesichtsfeldes, dann würde eine asymmetrische Aktivierung der PB Glomeruli folgen. Da fixierte Objekte im frontalen visuellen Feld stabilisiert werden (Wehner and Horn 1975), erfordert die direkte zielgerichtete Ansteuerung des Objektes eine Drehung des Tieres zum Objekt hin. Die Drehbewegung wiederum erfordert eine Erhöhung der Schrittlänge auf der kontralateralen Körperseite. Die Anpassung der Schrittlänge an erhöhte Laufgeschwindigkeiten und Drehbewegungen sind jedoch in Fliegen mit defekter PB gestört (Strauss 2002; Callaerts et al. 2001; Strauss et al. 1992). Die vorliegenden Analysen zeigen, dass die Expression von cDNA-Rettungskonstrukten innerhalb des HFS die anatomischen und verhaltensspezifischen mutanten Phänotypen in *tay-bridge*¹ Fliegen retten konnte. Deswegen nimmt das Modell weiterhin an, dass das HFS die zielgerichtete Bewegung auf das Objekt vermittelt. Da die Fasern des HFS in die kontralateralen Ventralkörper projizieren, könnte dort über

Verschaltungen mit absteigenden Neuronen die Aktivierung der entsprechenden Motorneurone auf der kontralateralen Körperseite erfolgen und so die Drehbewegung zum Objekt vermittelt werden. Positive Immunofärbungen in der PB gegen den GABA_A Rezeptor *Resistance to dieldrin* (RDL, ffrench-Constant et al. 1991; Liu et al. 2007) könnten suggerieren, dass gleichzeitig auch eine Schrittlängenverkürzung auf der Objektseite durch Inhibition erzeugt wird. Befindet sich ein Objekt im frontalen Gesichtsfeld, würde dies dem Modell nach zur Aktivierung der sagittalen Glomeruli beider Hemisphären führen. Die Information würde über das HFS an beide Ventralkörper geleitet werden und so auf beiden Seiten die Schrittlänge und damit die Laufgeschwindigkeit erhöht werden. Zusammenfassend ergibt sich also folgendes Modell: Die PB bildet die Azimutposition von Objekten in der Außenwelt ab und das HFS vermittelt die entsprechende zielgerichtete Bewegung. Bei dieser Form allothetischer Orientierung würde die PB eine topographische Karte der Außenwelt abbilden. Die ausmachenden Neurone wären demnach „Ortsneurone“ für Objektpositionen, die dann, wenn ein Objekt sich an einer bestimmten Position befindet, feuern; den Glomeruli der PB könnten Felder im Koordinatensystem zugeordnet werden. Diese Felder wären aber abhängig von der Körperausrichtung des Tieres und nicht innerhalb eines externen Koordinatensystems festgelegt. Da hierfür kontinuierlicher visueller Eingang notwendig ist, werden in diesem System, im Gegensatz zu den Ortsneuronen und –feldern im Hippocampus von Mäusen, keine Positionsgedächtnisse geformt. Ein ähnliches Modell wurde für die Orientierung nach polarisiertem Sonnenlicht in der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* postuliert. Hier konnte anhand intrazellulärer Ableitungen in den PB Glomeruli aufgezeigt werden, dass die Brücke als eine topographische Karte der E-Vektor Orientierung polarisierten Sonnenlichtes fungiert (Vitzhum et al. 2002; Heinze und Homberg 2007, 2009a, 2009b).

Die diskutierte Form zielgerichteter Bewegung bedarf vor allem der Verarbeitung visueller Eingänge. Wo und wie visuelle Informationen den ZK erreichen und wie sie prozessiert werden, ist bislang weitgehend unbekannt. In anderen Insektenspezies wurden Neurone beschrieben, welche die visuellen Systeme mit dem ZK verbinden (Schabe: Honegger und Schürmann 1975; Heuschrecke: Homberg et al. 2003; Grashüpfer: Goodmann und Williams 1976). In *Drosophila melanogaster* könnte visueller Eingang über die in Hanesch et al. (1989) beschriebenen Neurone erfolgen, welche die optischen Foci und die PB verbinden. Des Weiteren könnte visueller Eingang in das HFS über synaptische Verbindungen innerhalb des FB, z.B mit den sogenannten F Neuronen erfolgen. Liu et al. (2006) konnten zeigen, dass die F-Neurone eine wichtige Rolle bei der negativen Konditionierung visueller Objektattribute spielen. Diese Neurone ziehen von außerhalb des

ZK liegenden Neuropilen in den FB und bilden dort präsynaptische Endigungen aus (Li et al. 2009). Des Weiteren wurden Eingänge in die PB ausgehend von der akzessorischen Medulla beschrieben (Helfrich-Förster 2005).

Gleichwohl bedarf es hier weitergehender Untersuchungen, um das neuronale Netzwerk zielgerichteter Bewegung näher zu bestimmen. Eine solche Analyse sollte auf Verhaltensebene sowohl die Ausschaltung einzelner Neuronenpopulationen mittels binärer Systeme, als auch die Untersuchung existierender (Strauss 1995; 2002) und zukünftiger (Ryder 2004) Strukturmutanten und der daraus resultierenden Verhaltensphänotypen beinhalten. Auf anatomischer Ebene bietet sich die Färbung prä- und postsynaptischer Endigungen definierter Neurone zur Analyse der Richtung des Informationsflusses an. Abschließend bieten die vorgelegten Analysen einen guten Ansatzpunkt zur Beschreibung des neuronalen Netzwerkes zur Kontrolle zielgerichteter Bewegungen.

Literatur

Akten B, Tangredi MM, Jauch E, Roberts MA, Ng F, Raabe T, Jackson FR. (2009) Ribosomal s6 kinase cooperates with casein kinase 2 to modulate the *Drosophila* circadian molecular oscillator. *J. Neurosci.* 29, 466-75.

Ashburner M, Golic KG, Hawley RS. (2005) *Drosophila: A Laboratory Handbook*, Second Edition Edition, (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H. (2009) The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J. Neurogenet.* 23, 156-72.

Awh E, Vogel EK, Oh SH. (2006) Interactions between attention and working memory. *Neuroscience* 139, 201-8.

Baddeley A. (1981) The concept of working memory: a view of its current state and probable future development. *Cognition* 10, 17-23.

Baines RA, Uhler JP, Thompson A, Sweeney S T, Bate M. (2001) Altered electrical properties in *Drosophila* neurons developing without synaptic transmission. *J. Neurosci.* 21, 1523-1531.

Biggs WH 3rd, Zavitz KH, Dickson B, van der Straten A, Brunner D, Hafen E, Zipursky SL. (1994) The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway. *EMBO J.* 13, 1628-35.

Boutros M, Kiger AA, Armknecht S, Kerr K, Hild M, Koch B, Haas SA, Paro R Perrimon N. (2004) Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 303, 832-835.

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neurosci.* 8, 1263–1268.

Brand AH, Perrimon N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Brunner D, Oellers N, Szabad J, Biggs WH, Zipursky SL, Hafen E. (1994) A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76, 875-888.

Byers D, Davis RL, Kiger JAJ. (1981) Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 289, 79–81.

Callaerts P, Leng S, Clements J, Benassayag C, Cribbs D, Kang YY, Walldorf U, Fischbach KF, Strauss R. (2001) *Drosophila Pax-6/eyeless* is essential for normal adult brain structure and function. *J Neurobiol.* 46, 73-88.

Cajal SR, Sanchez D. (1915) Contribucion al conocimiento de los centros nerviosos del los insectos. *Trab. Lab. Invest. Biol.* 13, 1–167.

Cheung A, Zhang S, Stricker C, Srinivasan MV. (2008) Animal navigation: general properties of directed walks. *Biol. Cybern.* 99, 197-217.

Chintapalli VR, Wang J, Dow JA. (2007) Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat. Genet.* 39, 715-20. Review.

Diegelmann S, Fiala A, Leibold C, Spall T, Buchner E. (2002) Transgenic flies expressing the fluorescence calcium sensor Cameleon 2.1 under UAS control. *Genesis* 34, 95-98.

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblaue 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.

Dill M, Wolf R, Heisenberg M. (1993). Visual pattern recognition in *Drosophila* involves retinotopic matching. *Nature* 365(6448), 751-753.

Dudai Y, Jan YN, Byers D, Quinn WG, Benzer S. (1976) *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1684–1688.

Duffy JB. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis.* 34, 1-15. Review.

Enell L, Hamasaka Y, Kolodziejczyk A, Nässel DR. (2007) gamma-Aminobutyric acid (GABA) signaling components in *Drosophila*: immunocytochemical localization of GABA(B) receptors in relation to the GABA(A) receptor subunit RDL and a vesicular GABA transporter. *J. Comp. Neurol.* 505, 18-31.

Fischer M, Raabe T, Heisenberg M, Sendtner M. (2009) *Drosophila* RSK negatively regulates bouton number at the neuromuscular junction. *Dev. Neurobiol.* 69, 212-20.

ffrench-Constant RH, Roush RT. (1991) Gene mapping and cross-resistance in cyclodiene insecticide-resistant *Drosophila melanogaster* (Mg.). *Genet. Res.* 57, 17-21.

ffrench Constant RH, Mortlock DP, Schaffer Cd, Mac Intyre RJ, Roush RT. (1991). Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an

invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7209-7213.

Frödin M, Gammeltoft S. (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. Mol. Cell Endocrinol. 151, 65-77.

Funahashi, S. (2006) Prefrontal cortex and working memory processes. Neurosci. 139, 251–261.

Gegear RJ, Casselman A, Waddell S, Reppert SM. (2008) Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. Nature. 454, 1014-8.

Götz KG. (1980) Visual guidance in *Drosophila*. Basic Life Sci. 16, 391-407.

Goodman CS, Williams JL. (1976) Anatomy of the ocellar interneurons of acridid grasshoppers. II. The small interneurons. Cell Tissue Res. 175, 203-25.

Hamada FN, Rosenzweig M, Kang K, Pulver SR, Ghezzi A, Jegla TJ, Garrity PA. (2008) An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. Nature 454, 217-20.

Hanesch U, Fischbach K-F, Heisenberg M. (1989) Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. Cell Tissue Res. 257, 343-66.

Hartmann, G, Wehner R. (1995). The ant's path integration system: A neural architecture. Biol. Cybern. 73, 483–493.

Helfrich-Foerster C. (2005) Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. Genes Brain Behav. 4, 65–76.

Heinze S, Homberg U. (2007) Maplike representation of celestial E-vector orientations in the brain of an insect. Science 315, 995-7.

Heinze S, Gotthardt S, Homberg U. (2009b) Transformation of polarized light information in the central complex of the locust. J. Neurosci. 29, 11783-93.

Heinze S, Homberg U. (2009a) Linking the input to the output: new sets of neurons complement the polarization vision network in the locust central complex. J. Neurosci. 29, 4911-21.

Heisenberg M. (1994) Central brain function in insects: genetic studies on the mushroom bodies and central complex in *Drosophila*. Neural basis of behavioural adaptations. Adv Zool vol 39. Schildberger K, Elsner NG, editors. , Stuttgart, Berlin: Fischer. S. 61–79.

Heisenberg M, Wolf R. (1985) Vision in *Drosophila*. Genetics of Microbehavior Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokyo.

Hirth F, Reichert H. (1999) Conserved genetic programs in insect and mammalian brain development. *Bioessays* 21, 677-84. Review.

Homberg U. (2004) In the search of the sky compass in the insect brain. *Naturwissenschaften* 91, 199–208

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, 415-30.

Homberg U, Kingan TG, Hildebrand JG. (1987) Immunocytochemistry of GABA in the brain and suboesophageal ganglion of *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* 248, 1-24.

Honegger HW, Schürmann FW. (1975) Cobalt sulphide staining of optic fibres in the brain of the cricket, *Gryllus campestris*. *Cell Tissue Res.* 159, 213-25.

Hosie AM, Aronstein K, Sattelle DB, French-Constant RH. (1997) Molecular biology of insect neuronal GABA receptors *Trends Neurosci.* 20, 578-83. Review.

Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ. (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn. Mem.* 5, 52-77.

Jan L. Suman, Ilja Frissen, Manish N. Sreenivasa, Ernst MO. (2009) Walking straight into circles. *Curr. Biol.* 19, 1538-1542.

Kahsai L, Martin J-R, Winther AM. (2010) Neuropeptides in the *Drosophila* central complex in modulation of locomotor behavior. *J. Exp. Biol.* 213, 2256-2265.

Kahsai L, Winther AM. (2011) Chemical neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: distribution of multiple neuropeptides in relation to neurotransmitters. *J. Comp. Neurol.* 519, 290-315.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (2000) Principles of Neural Science. McGraw-Hill Companies. 4th Edition.

Keene AC, Waddell S. (2007) *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 341-54. Review.

Kim M, Lee JH, Koh H, Lee SY, Jang C, Chung CJ, Sung JH, Blenis J, Chung J. (2006). Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during *Drosophila* development. *EMBO J.* 25, 3056-67.

Kim YC, Lee HG, Seong CS, Han KA. (2003) Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr Patterns.* 3, 237-45.

Kim M, Lee JH, Koh H, Lee SY, Jang C, Chung CJ, Sung JH, Blenis J, Chung J. (2006) Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during *Drosophila* development. *EMBO J.* 25, 3056-67.

Kitamoto, T. (2001) Conditional modification of behaviour in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *J. Neurobiol.* 47, 81-92.

Klar T A, Hell SW. (1999) Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Optics Letters* 24, 954–956.

Kong EC, Woo K, Li H, Lebestky T, Mayer N, Sniffen MR, Heberlein U, Bainton RJ, Hirsh J, Wolf FW. (2010) A pair of dopamine neurons target the D1-like dopamine receptor DopR in the central complex to promote ethanol-stimulated locomotion in *Drosophila*. *PLoS One* 5, 9954.

Lai, S. L., Lee, T. (2006) Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nature Neurosci.* 9, 703–709.

Lee T, Luo L. (1999) Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Neuron.* 22, 451-61.

Levin LR, Han PL, 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.

Li W, Pan Y, Wang Z, Gong H, Gong Z, Liu L. (2009) Morphological characterization of single fan-shaped body neurons in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 336, 509-19.

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, 551-6.

Liu X, Krause WC, Davis RL. (2007) GABA_A receptor RDL inhibits *Drosophila* olfactory associative learning. *Neuron* 56, 1090-102.

Livingstone MS, Sziber PP, Quinn WG. (1984) Loss of calcium/ calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* 37, 205–215.

Mao Z, Roman G, Zong L, Davis RL. (2004) Pharmacogenetic rescue in time and space of the rutabaga memory impairment by using Gene-Switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 198–203.

McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL. (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila* *Science* 302, 1765-8.

Mronz M. (2004) Die visuell motivierte Objektwahl laufender Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) – Verhaltensphysiologie, Modellbildung und Implementierung in einem Roboter In Department of Genetics and Neurobiology, Dissertation. (Würzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität).

Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 24, 13940-5.

Nakai J, Ohkura M, Imoto K. (2001) A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnol.* 19, 137–141.

Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R. (2008) Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature.* 453, 1244-7.

O'Keefe J, Dostrovsky J. (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 1971 34,171-5.

Pan Y, Zhou Y, Guo C, Gong H, Gong Z, Liu L. (2009) Differential roles of the fan-shaped body and the ellipsoid body in *Drosophila* visual pattern memory. *Learn. Mem.* 16, 289-95.

Pereanu W, Younossi-Hartenstein A, Lovick J, Spindler S, Hartenstein V. (2011) Lineage-based analysis of the development of the central complex of the *Drosophila* brain. *J. Comp. Neurol.* 519, 661-89.

Pick S, Strauss R. (2005) Goal-driven behavioral adaptations in gap-climbing *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 1473-8.

Pielage J, Steffes G, Lau DC, Parente BA, Crews ST, Strauss R, Klämbt C. (2002) Novel behavioral and developmental defects associated with *Drosophila* single-minded. *Dev. Biol.* 249, 283-99.

Pitman JL, DasGupta S, Krashes MJ, Leung B, Perrat PN, Waddell S. (2009) There are many ways to train a fly. *Fly (Austin).* 3, 3-9 Review.

Poeck B, Triphan T, Neuser K, Strauss R. (2008) Locomotor control by the central complex in *Drosophila*-An analysis of the *tay bridge* mutant. *Dev. Neurobiol.* 68, 1046-58.

Potter CJ, Tasic B, Russler EV, Liang L, Luo L. (2010) The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell.* 141, 536-48.

- Power ME.** (1943) The brain of *Drosophila melanogaster*. J. Morphol. 72, 517–559.
- Putz G, Bertolucci F, Raabe T, Zars T, Heisenberg M.** (2004) The S6KII (rsk) gene of *Drosophila melanogaster* differentially affects an operant and a classical learning task. J. Neurosci. 24, 9745-51
- Qiu YH, Chen CN, Malone T, Richter L, Beckendorf SK, Davis RL.** (1991) Characterization of the memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*. J. Mol. Biol. 222, 553–565.
- Renn SC, Armstrong JD, Yang M, Wang Z, An X, Kaiser K, Taghert PH.** (1999) Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex. J. Neurobiol. 41, 189-207.
- Riemensperger T, Isabel G, Coulom H, Neuser K, Seugnet L, Kume K, Iché-Torres M, Cassar M, Strauss R, Preat T, Hirsh J, Birman S.** (2011) Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108, 834-9.
- Rister J, Pauls D, Schnell B, Ting CY, Lee CH, Sinakevitch I, Morante J, Strausfeld NJ, Ito K, Heisenberg M.** (2007) Dissection of the peripheral motion channel in the visual system of *Drosophila melanogaster*. Neuron 56, 155-70.
- Rørth PA.** (1996) Modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 12418–12422.
- Spradling AC, Rubin GM.** (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. Science 218, 341-7.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LS, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJ, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Voshall LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH, Lewis S.** (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. Science 287, 2204-15.
- Ryder E, Blows F, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Coulson D, Drummond J, Webster J, Gubb D, Gunton N, Johnson G, O'Kane CJ, Huen D, Sharma P, Asztalos Z, Baisch H, Schulze J, Kube M, Kittlaus K, Reuter G, Maroy P, Szidonya J, Rasmuson-Lestander A, Ekström K, Dickson B, Hugentobler C, Stocker H, Hafen E, Lepesant JA, Pflugfelder G, Heisenberg M, Mechler B, Serras F, Corominas M, Schneuwly S, Preat**

T, Roote J, Russell S. (2004) The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 167, 797-813.

Sanes JR, Zipursky SL. (2010) Design principles of insect and vertebrate visual systems. *Neuron*. 66, 15-36.

Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C. (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. 359, 832-5.

Schroll, C, Riemensperger T, Bucher D, Ehmer J, Völler T, Erbguth K, Gerber B, Hendel T, Nagel G, Buchner E, Fiala A. (2006) Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. *Curr. Biol*. 16, 1741–1747.

Schuster S. (1996) Objektbezogene Suchstrategien bei der Fliege *Drosophila*. Doktorarbeit. Universität Tübingen.

Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S, Heisenberg M. (2003) Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J. Neurosci*. 23, 10495-502.

Skoulakis EM, Davis RL. (1996) Olfactory learning deficits in mutants for *leonardo*, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein. *Neuron* 17, 931-44.

Strausfeld NJ. (1976) Atlas of an insect brain. New York: Springer.

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. *J. Neurogenet*. 8, 125-55.

Strauss R, Heisenberg M. (1993) A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci*. 13, 1852-61.

Strauss R, Schuster S, Götz KG. (1997) Processing of artificial visual feedback in the walking fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol*. 200, 1281-96.

Strauss R., Pichler J. (1998) Persistence of orientation toward a temporarily invisible landmark in *Drosophila melanogaster* *J. Comp. Physiol. A* 182, 411–23.

Strauss R. (1999) Altered spatio-temporal orientation and course control in walking *Drosophila* mutants with structural central-complex defects in the brain. *J Neurogenet*. 13:71.

Strauss R. (2002) The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 633-8. Review.

Sweeney, S. T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H. & O’Kane, C. J. (1995) Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14, 341–351.

Thibault ST, Singer MA, Miyazaki WY, Milash B, Dompe NA, Singh CM, Buchholz R, Demsky M, Fawcett R, Francis-Lang HL, Ryner L, Cheung LM, Chong A, Erickson C, Fisher WW, Greer K, Hartouni SR, Howie E, Jakkula L, Joo D, Killpack K, Laufer A, Mazzotta J, Smith RD, Stevens LM, Stuber C, Tan LR, Ventura R, Woo A, Zakrajsek I, Zhao L, Chen F, Swimmer C, Kopczynski C, Duyk G, Winberg ML, Margolis J. (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nature Genet.* 36, 283-7.

Toba, G, Ohsako T, Miyata N, Ohtsuka T, Seong KH, Aigaki T. (1999) The gene search system. A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151, 725–737.

Triphan T, Poeck B, Neuser K, Strauss R. (2010) Visual targeting of motor actions in climbing *Drosophila*. *Curr. Biol.* 20, 663-8.

Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A. (1996) Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384, 567-570.

Urizar NL, Yang Z, Edenberg HJ, Davis RL. (2007) *Drosophila homer* is required in a small set of neurons including the ellipsoid body for normal ethanol sensitivity and tolerance. *J. Neurosci.* 27, 4541-51.

Vitzthum H, Muller M, Homberg U. (2002) Neurons of the central complex of the locust *Schistocerca gregaria* are sensitive to polarized light. *J. Neurosci.* 22, 1114-25.

Vosshall LB. (2007) Into the mind of a fly. *Nature.* 450, 193-7. Review.

Wang J, Ma X, Yang JS, Zheng X, Zugates CT, Lee CH, Lee T. (2004) Transmembrane/juxtamembrane domain-dependent Dscam distribution and function during mushroom body neuronal morphogenesis. *Neuron* 43, 663-72.

Wang Z, Pan Y, Li W, Jiang H, Chatzimanolis L, Chang J, Gong Z, Liu L. (2008) Visual pattern memory requires foraging function in the central complex of *Drosophila*. *Learn. Mem.* 15, 133-42.

Wassermann DA, Solomon NM, Rubin GM. (1994) The *Drosophila melanogaster* ribosomal S6 kinase II-encoding sequence. *Gene* 144, 309-10.

Webb B. (2002) Robots in invertebrate neuroscience. *Nature* 417, 359-63. Review.

Wehner R, Horn E. (1975) The effect of object distance on pattern preferences in the walking fly, *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 31, 641-3.

Wehner R. (2003) Desert ant navigation: how miniature brains solve complex tasks J. *Comp. Physiol. A* 189, 579–88.

Wessnitzer J, Webb B. (2006) Multimodal sensory integration in insects--towards insect brain control architectures. *Bioinspir. Biomim.* 1, 63-75. Review.

Wilson FA, Scallan SP, Goldman-Rakic PS. (1993) Dissection of object and spatial processing domains in primate prefrontal cortex. *Science*. 260, 1955-8.

Wilson RI, Laurent G. (2005) Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *J. Neurosci.* 25, 9069-79.

Wohlgenuth, S., Ronacher, B. and Wehner, R. (2001). Ant odometry in the third dimension. *Nature* 411, 795-798.

Wolf R, Wittig T, Liu L, Wustmann G, Eyding D, Heisenberg M. (1998) *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning. *Learn. Mem.* 5, 166-78.

Xu T, Rubin GM. (1993). Analysis of genetic mosaics in developmental *Drosophila melanogaster*, *Development* 117, 1223–1237.

Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A, Karsenty G. (2004) ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117, 387-98.

Yasuyama K, Salvaterra PM. (1999) Localization of choline acetyltransferase-expressing neurons in *Drosophila* nervous system. *Microsc. Res. Tech.* 45, 65-79. Review.

Yeh E, Gustafson K, Boulianne GL. (1995) Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 7036-40.

Yin JCP, Wallach JS, Wilder EL, Klingensmith J, Dang D, Perrimon N, Zhou H, Tully T, Quinn WG. (1995) A *Drosophila* CREB/CREM homolog encodes multiple

isoforms, including a cyclic AMP-dependent protein kinase-responsive transcriptional activator and antagonist. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5123-5130.

Young JM, Armstrong JD. (2010) Structure of the adult central complex in *Drosophila*: organization of distinct neuronal subsets. *J. Comp. Neurol.* 518, 1500-24.

Yu W, Hardin PE. (2006) Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *J. Cell Sci.* 119, 4793-5. Review.

Zars T. (2009) Spatial orientation in *Drosophila*. *J. Neurogenet.* 23, 104-10. Review.

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

Erklärung:

Gemäß § 11 Absatz 3 der Promotionsordnung der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz vom 30. April 1990 versichere ich, dass:

- Die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.
- Die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt wurde und alle Hilfsmittel in der Arbeit angegeben sind.
- Ich zuvor keine akademischen Grade erworben habe oder versucht habe zu erwerben.

Würzburg,

Kirsa Neuser

Summary

Goal-directed orientation enables animals to cope with vital tasks, like retrieval of resources, mating partners and safe spots. For that, it is essential to discern the environment sensorially, to store and recall former experiences and to integrate these informations into motor actions.

Which groups of neurons in the brain of the fruit fly mediate goal-directed orientation? Which sensory informations are relevant in a given context and how are these informations translated into motor actions? Where in the brain is the sensory information and stored information integrated into motor control commands?

The central complex, a compound of four central brain neuropils in *Drosophila melanogaster*, acts as interface between visual processing and motor control output. The neuropils are the protocerebral bridge, the fan-shaped body, the ellipsoid body and the noduli.

This study shows that fruit flies possess a spatial visual working memory. This memory can replace acute visual information when the sight onto the target is lost. For that, fruit flies must be able to sense targets, to store the position of these visual objects, to continuously integrate the own and the object position and to translate the sensory information into goal-directed movements. By the use of conditional expression of tetanus toxin via the GAL4/UAS/GAL80^{ts} system, it is shown here, that the ring neurons, which project into the ellipsoid body, are necessary for the spatial working memory. Furthermore, it is shown that flies null-mutant for the ribosomal serin kinase S6KII are losing their goal-directed orientation, as soon as the target disappears. Partial rescue of S6KII solely in a distinct subset of ring neurons, R3 and R4d, is sufficient to restore the memory in an otherwise mutant animal. This working memory seems to be based on idiothetic orientation.

While the working memory becomes relevant to the fly after the disappearance of target objects, this study also deals with goal-directed locomotion towards visible objects. The focus was on the question, which central brain neurons are necessary for visual fixation. By the use of structural central brain mutants it has been shown, that the protocerebral bridge is necessary to enhance walking speed, walking activity and to bring about goal-directed orientation towards visual stimuli. In particular the horizontal fiber system, which projects from the protocerebral bridge to the fan-shaped body and terminates outside the central complex in the ventral bodies, seems to be necessary for locomotor control and goal-directed movements in walking flies. This has been shown by blocking synaptic transmission within these neurons using conditional expression of tetanus toxin via the GAL4/UAS/GAL80^{ts} system and by partial rescue experiments in the brain-structure mutants.

Based on the current results and earlier studies, a model is proposed of how goal-directed locomotion of the fruit fly towards visual objects is mediated neuronally. According to the model, the protocerebral bridge holds a representation of the azimuthal positions of objects and the horizontal fiber system encodes the where-information for goal-directed movements. The animal's own position in relation to a target object is mediated by the ring neurons and the ellipsoid body. If the object disappears from sight the own relative position can be retrieved ideothetically, and integrated with previous experience with the object stored in the fan-shaped body (what-information). The resulting information is then transmitted via the horizontal fiber system onto descending neurons via the ventral bodies to the motor centers in the ventral ganglion.

Zusammenfassung

Zielgerichtete Orientierung ermöglicht es Lebewesen, überlebenswichtige Aufgaben, wie die Suche nach Ressourcen, Fortpflanzungspartnern und sicheren Plätzen zu bewältigen. Dafür ist es essentiell, die Umgebung sensorisch wahrzunehmen, frühere Erfahrungen zu speichern und wiederabzurufen und diese Informationen zu integrieren und in motorische Aktionen umzusetzen.

Welche Neuronengruppen vermitteln zielgerichtete Orientierung im Gehirn einer Fliege? Welche sensorischen Informationen sind in einem gegebenen Kontext relevant und wie werden diese Informationen sowie gespeichertes Vorwissen in motorische Aktionen übersetzt? Wo findet im Gehirn der Übergang von der sensorischen Verarbeitung zur motorischen Kontrolle statt?

Der Zentralkomplex, ein Verbund von vier Neuropilen des Zentralhirns von *Drosophila melanogaster*, fungiert als Übergang zwischen in den optischen Loben vorverarbeiteten visuellen Informationen und prämotorischem Ausgang. Die Neuropile sind die Protocerebralbrücke, der Fächerförmige Körper, der Ellipsoidkörper und die Noduli.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fruchtfliegen ein räumliches Arbeitsgedächtnis besitzen. Dieses Gedächtnis kann aktuelle visuelle Information ersetzen, wenn die Sicht auf das Zielobjekt verloren geht. Dies erfordert die sensorische Wahrnehmung von Zielobjekten, die Speicherung der Position, die kontinuierliche Integration von Eigen- und Objektposition, sowie die Umsetzung der sensorischen Information in zielgerichtete Bewegung. Durch konditionale Expression von Tetanus Toxin mittels des GAL4/UAS/GAL80^{ts} Systems konnte gezeigt werden, dass die Ringneurone, welche in den Ellipsoidkörper projizieren, für das Orientierungsgedächtnis notwendig sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Fliegen, denen die ribosomale Serinkinase S6KII fehlt, die Richtung verlieren, sobald keine Objekte mehr sichtbar sind und, dass die partielle Rettung dieser Kinase ausschließlich in den Ringneuronenklassen R3 und R4d hinreichend ist, um das Gedächtnis wieder herzustellen. Bei dieser Gedächtnisleistung scheint es sich um eine idiothetische Form der Orientierung zu handeln.

Während das räumliche Arbeitsgedächtnis nach Verschwinden von Objekten relevant ist, wurde in der vorliegende Arbeit auch die Vermittlung zielgerichteter Bewegung auf sichtbare Objekte untersucht. Dabei wurde die zentrale Frage bearbeitet, welche Neuronengruppen visuelle Orientierung vermitteln. Anhand von Gehirnstrukturmutanten konnte gezeigt werden, dass eine intakte Protocerebralbrücke notwendig ist, um Laufgeschwindigkeit, Laufaktivität und Zielgenauigkeit bei der Ansteuerung visueller Stimuli

korrekt zu vermitteln. Dabei scheint das Horizontale Fasersystem, welches von der Protocerebralbrücke über den Fächerförmigen Körper auf den Zentralkomplex assoziierte Neuropile, die Ventralkörper, projiziert, notwendig für die lokomotorische Kontrolle und die zielgenaue Bewegung zu sein. Letzteres konnte zum einen durch Blockade der synaptischen Transmission anhand konditionaler Tetanus Toxin Expression mittels des GAL4/UAS/GAL80^{ts} Systems im Horizontalen Fasersystem gezeigt werden; zum anderen auch durch partielle Rettung der in den Strukturmutanten betroffenen Gene.

Den aktuellen Ergebnissen und früheren Studien folgend, ergibt sich dabei ein Modell, wie zielgerichtete Bewegung auf visuelle Stimuli neuronal vermittelt werden könnte. Nach diesem Modell bildet die Protocerebralbrücke die Azimuthpositionen von Objekten ab und das Horizontale Fasersystem vermittelt die entsprechende lokomotorische Wo-Information für zielgerichtete Bewegungen. Die Eigenposition in Relation zum Zielobjekt wird über die Ringneurone und den Ellipsoidkörper vermittelt. Wenn das Objekt aus der Sicht verschwindet, kann die Relativposition ideothetisch ermittelt werden und integriert werden mit Vorinformation über das Zielobjekt, die im Fächerförmigen Körper abgelegt ist (Was-Information). Die resultierenden Informationen könnten dann über das Horizontale Fasersystem in den Ventralkörpern auf absteigende Neurone gelangen und in den Thorax zu den motorischen Zentren weitergeleitet werden.

Curriculum Vitae

Dipl.Biol. Kirsa Neuser

Institute of Physiology, Neurophysiology
Julius Maximilians-University Würzburg
Röntgenring 9, D-97070 Würzburg

T +49 (0)931 31-84224

F +49 (0)931 31-82741

M +49 (0)176 21878218

kirsa.neuser@uni-wuerzburg.de

1977 born in Wetzlar, Germany

Appointments and Education

- 1997-2004** Student of Biology, University Würzburg
major subjects: Neurobiology, Prof. Dr. E. Buchner, Prof. Dr. M. Heisenberg
Plantphysiology, Prof. Dr. R. Kaldenhoff
Immunology & Virology, Dr. J. Schneider-Schaulies, Prof. Dr. A
Schimpl
- 06/2004** Diploma thesis “Mushroom body function in olfactory associative learning in larval *Drosophila*”, Institute of Genetics and Neurobiology, University Würzburg, Dr. Bertram Gerber, Prof. Martin Heisenberg, Degree: Diplom-Biologin Univ. (1,0)
- 2004-2010** PhD student, Institute of Genetics and Neurobiology, University Würzburg; as of 11/2006, Institute of Neurobiology, University Mainz, Prof. R. Strauss
- 2005** Birth of my daughter Anouk Neuser
- 2010-2011** Post-Doc, Department of Physiology, Institute of Neurophysiology, University Würzburg

Grants

- 2010** EMBO Grant for the ESF-EMBO Symposium – Functional Neurobiology in Minibrains: From Flies to Robots and Back Again, Sant Feliu de Guixols, Spain.

Peer-reviewed publications

Riemensperger T, Isabel G, Coulom H, Neuser K, Seugnet L, Kume K, Iché-Torres M, Cassar M, Strauss R, Preat T, Hirsh J, Birman S. 2011. Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 108: 834-9.

Triphan T, Poeck B, Neuser K, Strauss R. 2010. Visual targeting of motor actions in climbing *Drosophila*. **Curr Biol**. 20: 663-8.

Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R. 2008. Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. **Nature**. 453: 1244-7.

Poeck B, Triphan T, Neuser K, Strauss R. 2008. Locomotor control by the central complex in *Drosophila*-An analysis of the *tay bridge* mutant. **Dev Neurobiol**. 68: 1046-58.

Neuser K, Husse J, Stock P, Gerber B. 2005. Appetitive olfactory learning in *Drosophila* larvae: effects of repetition, reward strength, age, gender, assay type and memory span. **Animal Behaviour**. 69: 891-898

Talks at international scientific meetings

2006 **Neuser K.** and Strauss R. (2006). Walking flies need an intact ellipsoid body for complex visual orientation tasks. 11th European *Drosophila* Neurobiology Conference: Neurofly 2006, Leuven

Teaching experience

2004-2010 Teaching Assistant, Student Practical Course: Neurobiology, University Würzburg

2004-2010 Teaching Assistant, Student Practical Course: Genetic, University Würzburg

2006-2009 Teaching Assistant, Student Practical Course: Neurobiology, University Mainz

Supervision of young academics

2006 Diploma student: Thomas Peter, University Würzburg

Scientific collaborations

2009-2011 Cooperation with Prof. Serge Birman, IBDML - Development Biology Institute of Marseille Luminy, University Marseille, France. A behavioral study of adult *Drosophila* unable to synthesize dopamine in the brain.

since 2011 Cooperation with PD. Katie O'Connor-Giles – University of Wisconsin, Madison, Fife function in *Drosophila melanogaster*

