



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**Analyse biochemischer Signalwege eines
visuellen Orientierungsgedächtnisses von
*Drosophila***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sara Kuntz
geboren am 24.05.1984 in München

Mainz, Oktober 2015

1. Einleitung	1
1.1. Repräsentation der räumlichen Umgebung im Gehirn	1
1.2. Die Anatomie des Gehirns von <i>Drosophila</i>	2
1.2.1. Der Zentralkomplex	4
1.3. Lernen und Gedächtnis von <i>Drosophila</i> – Koinzidenzdetektion	8
1.4. Visuelle Ortsgedächtnisse von <i>Drosophila</i>	11
1.5. Das visuelle Orientierungsgedächtnis von <i>Drosophila</i>	13
1.6. <i>Drosophila melanogaster</i> als Versuchsorganismus in der Verhaltensneurobiologie	16
1.6.1. Neurogenetische Manipulationen für die Verhaltensanalyse	17
1.7. Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Fliegenhaltung und –stämme	23
2.2. <i>Detour</i> -Paradigma	26
2.2.1. Pharmakologische Behandlung	28
2.3. Das <i>Buridan</i> -Paradigma	30
2.4. Histologie – Ganzpräparate (<i>Whole-Mounts</i>) von Gehirnen	31
2.5. <i>Western Blot</i>	33
2.6. Messung der Enzymaktivität in nativen Gelen	35
2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.8. Inverse PCR (iPCR)	38
2.9. Quantitative PCR auf Basis der reversen Transkription (RT-qPCR)	40
2.10. Lösungen und Chemikalien	42
2.11. Statistik	44
3. Ergebnisse	45
3.1. Der Einfluss der Proteinkinase G auf das Orientierungsgedächtnis	45
3.2. Die Nitritoxid-Synthase wird für das Arbeitsgedächtnis benötigt	50
3.3. Der diffusible Faktor H ₂ S wird für das Orientierungsgedächtnis benötigt	61
3.4. Verknüpfung des EBO/dSRF/dMRTF Signalweges mit NO und H ₂ S	63
3.5. Der cGMP-Level in den R3 Neuronen ist essentiell für das Orientierungsgedächtnis	79
3.6. Die Beteiligung der löslichen Guanylylzyklase am Orientierungs- gedächtnis	83

3.7. Der Einfluss der Ribosomalen-S6-Kinase II und die Verknüpfung mit der Proteinkinase G	85
3.8. Die Rolle des Transkriptionsfaktors dCREB für das Orientierungs- gedächtnis	88
3.9. <i>homer</i> als möglicher Kompetenzfaktor	97
3.10. Die Rolle des cAMP/Proteinkinase A-Signalweges	100
4. Diskussion	110
4.1. Die endogene Rolle von H ₂ S bei Lern- und Gedächtnisprozessen	111
4.2. Eine neue Rolle von NO beim Lernen von <i>Drosophila</i>	114
4.3. Die Regulation durch den Transkriptionskomplex dSRF/dMRTF	119
4.4. Ein hoher cGMP-Haushalt in den R3 Neuronen.....	122
4.4.1. <i>homer</i> als Kompetenzfaktor	127
4.5. NO als Kurzzeitkomponente in einem visuellen Arbeitsgedächtnis von <i>Drosophila</i>	128
4.6. Die Kurzzeitkomponente von Proteinkinase A und Synapsin in einem visuellen Arbeitsgedächtnis von <i>Drosophila</i>	130
4.7. Ein Modell zum visuellen Orientierungsgedächtnis von <i>Drosophila</i>	136
5. Zusammenfassung	147
6. Summary.....	148
7. Verzeichnisse	149
7.1. Literaturverzeichnis.....	149
7.2. Abbildungsverzeichnis.....	168
7.3. Tabellenverzeichnis.....	172
7.4. Abkürzungsverzeichnis	174
8. Anhang.....	178
8.1. Validierung rekombinanter Chromosome mittels PCR	178
8.1.1. Rekombination von UAS- <i>dSrf</i> und UAS- <i>dMrf</i>	178
8.1.2. Rekombination von UAS- <i>ign</i> und <i>ign</i> ^{58/1}	178
8.1.3. Rekombination von 189Y-GAL4 und <i>homer</i> ^{EP2141}	179
8.2. Validierung von Antikörpern	179
8.2.1. Antikörper gegen NOS	179
8.2.2. Antikörper gegen CBS	180

8.3. <i>Detour</i> -Paradigma	181
8.3.1. <i>Knock-down</i> von <i>dCREB</i>	181
8.3.2. GAL4-Kontrollen für das Rettungsexperiment von <i>ebo</i> ⁶⁷⁸ durch die Überexpression von <i>Cbs</i> und <i>Nos</i>	182
8.3.3. Genetische Interaktionen von <i>dCREB</i>	185
8.3.4. <i>Twins</i> - eine mögliche Phosphatase für dCREB	187
8.4. <i>Buridan</i> -Paradigma:	189
8.4.1. Genetische Interaktion zwischen <i>Nos</i> und <i>dMrtf</i>	189
8.4.2. Genetische Interaktion zwischen <i>Nos</i> und <i>ign</i>	191
8.5. Statistik.....	193

1. Einleitung

1.1. Repräsentation der räumlichen Umgebung im Gehirn

Navigieren in einer komplexen Umwelt ermöglicht es einem Organismus, sich zielgerichtet zu orientieren und fortzubewegen. Im Laufe der Evolution haben sich Orientierungsstrategien auf Basis der verschiedenen sensorischen Modalitäten entwickelt. Eine zielgerichtete, visuell orientierte Bewegung, eine Orientierung an olfaktorischen und/oder gustatorischen Merkmalen (Chemotaxis) oder auch eine akustische Orientierung (z.B. Echoortung). Gerade bei Tieren, die weite Distanzen zurücklegen ist die Orientierung am Sonnenstand, am magnetischen Feld der Erde oder auch an polarisiertem Licht weit verbreitet (Müller et al., 2015). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der visuellen Orientierung bei *Drosophila melanogaster*. Dabei ist das Wissen über die eigene Position im Raum bzw. die eigenen Bewegungen und Drehungen in Bezug zu visuellen Umgebungspunkten essentiell. Dies erfordert eine interne Repräsentation des Raumes. Diese Repräsentation kann als ein dynamisches Zellcluster betrachtet werden, dessen Aktivitätsmuster mit den Eigenschaften der äußeren Welt korreliert (Moser et al., 2014). Bei Vertebraten spielt der Hippocampus eine Schlüsselrolle für die räumliche Orientierung und das neuronale Netzwerk, welches die Eigenposition mit der Orientierung im Raum vermittelt, besteht hauptsächlich aus drei Zelltypen: den Ortszellen (*place cells*), den Rasterzellen (*grid cells*) und den Geschwindigkeitszellen (*speed cells*). Die Ortszellen vermitteln dem Tier die Eigenposition im Raum in Bezug zur allozentrischen Umgebung. Dabei hat jede Ortszelle ein räumlich eingegrenztes rezeptives Feld. Über die Rasterzellen wird die Bewegung des Tieres mit der veränderten Position im Raum verrechnet. Die Geschwindigkeitszellen geben diesem System an, mit welcher Geschwindigkeit sich das Tier im Raum bewegt. Mit diesen drei Komponenten lässt sich im Hippocampus eine räumliche Repräsentation der Umwelt erklären, welche sich mit der Eigenbewegung und –position des Tieres ständig aktualisiert und somit eine Orientierung in der Umwelt ermöglicht (Moser et al., 2014; Kropff et al., 2015).

Aber auch bei Invertebraten wurde eine räumliche Orientierung untersucht. In Ameisen und Bienen hat man bereits bemerkenswerte Orientierungsstrategien entdeckt. Das Konzept der Pfadintegration wurde schon früh postuliert. Die Forschung an der Wüstenameise *Cataglyphis* hat gezeigt, dass diese auf ihren explorativen Wanderungen

nach einer geeigneten Futterquelle kontinuierlich ihre Translations- und Rotationsbewegungen erfassen und speichern, und diese Information anschließend zu einem Vektor verarbeiten, der sie auf dem Rückweg geradewegs zurück zum Nest führt (Hartmann und Wehner, 1995). Die sozial lebende Honigbiene *Apis mellifera* führt ebenfalls weite Orientierungs- und Explorationsflüge auf der Suche nach Futterquellen durch. Mit Hilfe einer internen visuellen Landmarkenrepräsentation und durch Pfadintegration gelangt sie jedoch auf dem direkten Weg zurück zu ihrem Stock, um dort diesen direkten Weg zur Futterquelle durch den Schwänzeltanz an ihre Kolleginnen weiterzugeben (Menzel et al., 2006). Im Flug wird dabei der optische Fluss auf der Retina in Korrelation zur zurückgelegten Distanz verrechnet. Bei einem gehenden Insekt wird die Distanzmessung über die Messung der Beinbewegungen bzw. über die Bewegung der Gelenkrezeptoren vermittelt (Collett, 2009).

Auch bei *Drosophila* können Strategien zur gezielten Navigation und Orientierung in der Umwelt beobachtet werden, die in Kapitel 1.4 genauer erläutert werden. Dabei bieten Insekten mit ihren kleineren Gehirnen und der geringeren Anzahl von Neuronen ein ideales Modell, um Konzepte zu entwickeln und neuronale Mechanismen zu verstehen, die der visuellen Orientierung zu Grunde liegen. *Drosophila* im Speziellen bietet durch ein weitreichendes Angebot an experimentellen Manipulationstechniken eine einzigartige Chance, neuronale und biochemische Prozesse in sehr spezifischen und gezielten Neuronengruppen zu untersuchen.

1.2. Die Anatomie des Gehirns von *Drosophila*

Das Gehirn von *Drosophila* wurde historisch erstmals von Power (1934) beschrieben. Die Nomenklatur der auffälligen Neuropile wie für die optischen Loben, die Antennalloben, die Pilzkörper, der Zentralkomplex und einige wichtige Kommissionen hat sich bis heute durchgesetzt (Abb. 1). Vor kurzem wurde versucht, die Terminologie weiter zu präzisieren und den Großteil des Gehirns, der bisher als unstrukturierte Cortexmasse klassifiziert wurde, weiter zu strukturieren und zu benennen (Ito et al., 2014). Deren Funktion ist aber weitestgehend ungeklärt.

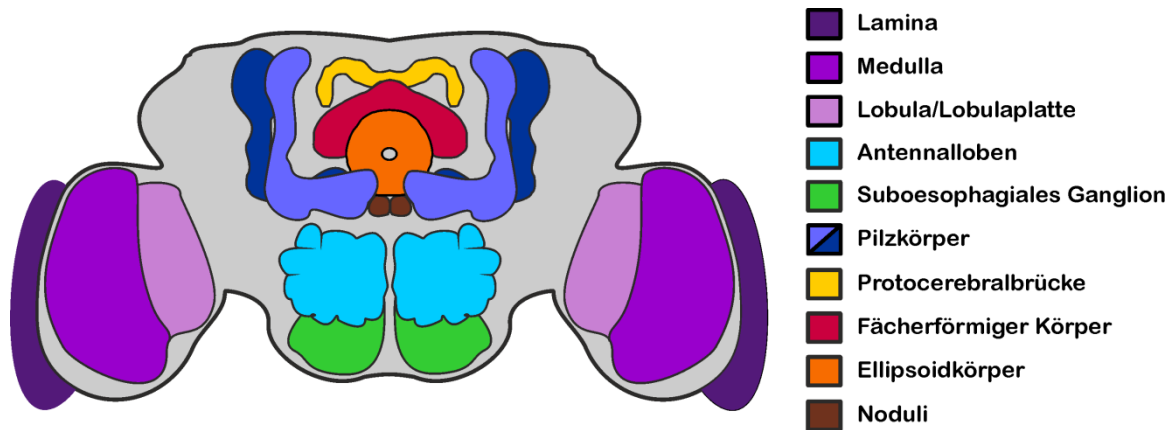


Abb. 1: Schematische Repräsentation der prominenten Neuropile im *Drosophila* Gehirn. Die optischen Loben liegen am weitesten lateral. Anterior ventral gelegen erscheinen zuerst die Antennalloben gefolgt vom suboesophagalen Ganglion. Die axonalen Auswüchse der Kenyonzellen bilden die Loben der Pilzkörper, welche zuerst von ventral nach dorsal wachsen (α -Loben) und anschließend nach medial ziehen (β - γ -Loben). Der Zentralkomplex setzt sich aus dem Ellipsoidkörper, den Noduli, welche ventral vom Ellipsoidkörper sitzen, dem fächerförmigen Körper, welcher den Ellipsoidkörper dorsal-posterior einbettet, und der Protocerebralbrücke, welche im posterioren Teil des Gehirns liegt, zusammen.

Die optischen Loben (Abb. 1; lila) bestehen aus der Lamina, der Medulla, der Lobula und der Lobulaplatte und sind für die primäre Verarbeitung visueller Informationen aus den neuronalen Supperpositionsäugen zuständig. Dabei wird zwischen Polarisationssehen, Farbsehen, Tiefenwahrnehmung und Bewegungssehen unterschieden (Borst, 2009; Zhu, 2013). Die Antennalloben (Abb. 1; hellblau) sind die erste Verarbeitungsebene olfaktorischer Information. Diese gelangt über die olfaktorischen Rezeptorneurone aus den Antennen oder den Maxillen in die Glomeruli der Antennalloben, wo synaptische Verbindungen zu lokalen Interneuronen und Projektionsneuronen geformt werden. Über die Projektionsneurone wird die verarbeitete olfaktorische Information in das laterale Horn und zu den Calyces der Pilzkörper weitergeleitet (Masse et al., 2009). Die Pilzkörper (Abb. 1; blau) sind ein paariges Neuropil, welches aus je ca. 2500 Kenyonzellen besteht. Die dendritischen Eingänge dieser Kenyonzellen bilden die großen Calyces. Die parallelen Axonbündel dieser Neurone formieren den Pedunculus und münden in der sogenannten Ferse (*heel*), bevor sich die axonalen Projektionen in die vertikalen (α/α' -) Loben und medialen (β/β' - und γ -) Loben gabeln (Ito et al., 1997; Fahrbach, 2006). Die α/β -Loben können weiter funktional in eine Kernschicht (*core*; α/β_c) und eine Oberflächenschicht (*surface*; α/β_s) der Kenyonzellen unterschieden werden und sind bei der olfaktorischen Konditionierung für die Diskriminierung der Wertigkeit von Düften verantwortlich (Perisse et al., 2013). Den Pilzkörpern werden

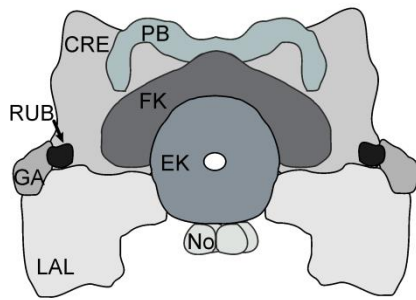
aufgrund ihrer vielen sensorischen Eingänge und ihrer extrinsischen Ausgänge zu anderen Neuropilen des Gehirns weitreichende Funktionen zugeordnet. Allen voran sind das olfaktorische Lernen und das olfaktorische Gedächtnis zu nennen (Heisenberg et al., 1985; Zars, 2000; Davis, 2011). Des Weiteren sind die Pilzkörper unter anderem an der Gedächtnisbildung bei der Balz-Konditionierung (McBride et al., 1999), bei der Kontextgeneralisation und dem Entscheidungsverhalten auf visuelle Stimuli im Flugsimulator (Liu et al., 1999; Tang und Guo, 2001), an der Regulation der Laufaktivität (Martin et al., 1998) und an der Regulation von Wach- und Schlafphasen (Joiner et al., 2006; Pitman et al., 2006) beteiligt.

Die Neuroanatomie des Zentralkomplexes wird im folgenden Abschnitt ausführlicher betrachtet, da dieser für ein Orientierungsgedächtnis bei *Drosophila* von besonderer Bedeutung ist und sich die Arbeit intensiv mit dem Zentralkomplex, vor allem dem Ellipsoidkörper beschäftigen wird.

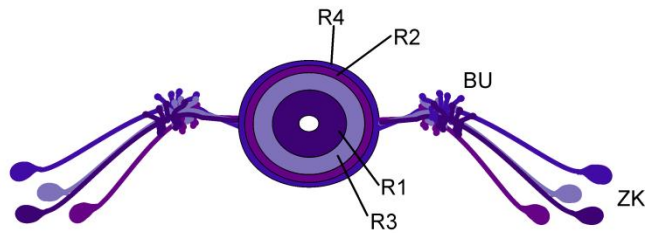
1.2.1. Der Zentralkomplex

Der Zentralkomplex ist eine unpaarige Struktur im Gehirn, welche in der Mitte zwischen beiden protocerebralen Hemisphären liegt und aus vier Substrukturen besteht: dem Ellipsoidkörper (Abb. 1; orange), dem fächerförmigen Körper (Abb. 1; rot), der Protocerebralbrücke (Abb. 1; gelb) und den paarig angeordneten Noduli (Abb. 1; braun; Hanesch et al., 1989). Weitere akzessorische Neuropile (Abb. 2A) sind die lateralen Triangel (heute *Bulb*), die *Crepine*, der *Rubus*, die *Gall* und die Ventralkörper (heute lateralen akzessorischen Loben; Hanesch et al., 1989; Ito et al., 2014; Wolff et al., 2015). Auch der Zentralkomplex erhält multimodale Ein- und Ausgänge von vielen Gehirnregionen und wird als höheres Zentrum für lokomotorische Kontrolle betrachtet (Strauss und Heisenberg, 1993; Strauss, 2002). Außerdem scheint der Zentralkomplex bei Insekten ein Zentrum für Orientierungsverhalten zu sein. Bei *Drosophila* ist dieses Neuropil für die Orientierung im Gravitationsfeld (Baker et al., 2007) und bei Heuschrecken, sowie bei Monarchfaltern für die Orientierung am Sonnenkompass (Heinze und Homberg, 2007; Heinze und Reppert, 2011) verantwortlich. Auch ein visuelles Ortsgedächtnis (Foucaud et al., 2010; Ofstad et al., 2011) und das visuelle Orientierungsgedächtnis (Neuser et al., 2008; Kuntz et al., 2012; Thran et al., 2013; Dissertation Neuser, 2012) wird dem Zentralkomplex zugeordnet, was von besonderem Interesse für diese Arbeit ist.

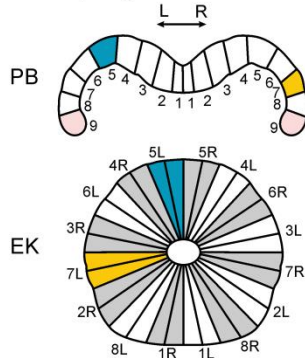
A Zentralkomplex



C Ringneurone des Ellipsoidkörpers



B Verknüpfung PB und EK



D Ringneuron - Einzelzelle

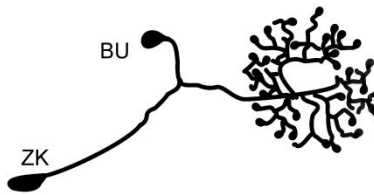


Abb. 2: Aufbau des Zentralkomplexes und des Ellipsoidkörpers. (A) Der Zentralkomplex besteht aus den vier Hauptneuropilen Protocerebralbrücke (PB), fächerförmiger Körper (FK), Ellipsoidkörper (EK) und den Noduli (No), sowie den akzessorischen Neuropilen *Crepine* (CRE), *Rubus* (RUB), *Gall* (GA) und den lateralen akzessorischen Loben (LAL). (B) Die Protocerebralbrücke kann in 18 Glomeruli gegliedert werden und der Ellipsoidkörper besteht aus 16 radialen Einheiten (*Wedges*), die jeweils in *Semi-Wedges* unterteilt werden können (rechts (R) und links (L)). Es besteht eine funktionale eins-zu-eins-Verknüpfung zwischen den Glomeruli und den radialen Einheiten, wobei die äußersten Glomeruli der Brücke ausgelassen sind. (C) Die prominentesten Neurone des Ellipsoidkörpers sind die Ringneurone, die in vier Subpopulationen (R1, R2, R3 und R4 Neurone) unterteilt werden. Die Zellkörper (ZK) liegen anterior im Gehirn und bilden ihre dendritischen Verästelungen in der Region des *Bulbs* (BU), bevor die axonalen Projektionen medial ziehen und eine ringförmige Struktur um den sogenannten Ellipsoidkörperkanal ausbilden. (D) Schematische Darstellung eines einzelnen Ringneurons der R3-Neuronpopulation. Die axonalen Auswüchse im Ring bilden in jeder radialen Einheit synaptische Strukturen (verändert nach Martín-Peña et al., 2014; Wolff et al., 2015).

Die Protocerebralbrücke liegt im caudalen Bereich des Gehirns und kann in 18 funktionelle Glomeruli gegliedert werden. Je Hemisphäre gibt es neun Glomeruli (Abb. 2B; Wolff et al., 2015). Es gibt sowohl horizontale als auch kolumnäre Informationswege in der Brücke bzw. zu anderen Zentralkomplexneuropilen (Hanesch et al., 1989). Eine Funktion der Protocerebralbrücke liegt in der Modifizierung der Schrittlänge und wahrscheinlich auch der Schrittfrequenz; sie ist damit essentiell für Bewegungskoordination und Richtungssteuerung (Strauss et al., 2002). Des Weiteren ist die horizontale Orientierung des Kletterverhaltens (Triphan et al., 2010) und das

Körpergrößengedächtnis (Dissertation Krause, 2015) bei *Drosophila* abhängig von der Protocerebralbrücke.

Der fächerförmige Körper wird in 16 vertikale Säulen und in neun horizontale Schichten gegliedert. Sowohl die Anzahl der Säulen, als auch die Anzahl der Schichten kann jedoch nicht eindeutig festgelegt werden (Wolff et al., 2015). Der fächerförmige Körper ist bei *Drosophila* unter anderem essentiell für die visuelle Konditionierung und Mustererkennung im Flugsimulator (Liu et al., 2006; Pan et al., 2009), sowie für das Schlafverhalten (Donlea et al., 2014). Die Noduli liegen ventral zum fächerförmigen- und Ellipsoidkörper und können wiederum auch in drei verschiedene Schichten mit verschieden hoher synaptischer Dichte eingeteilt werden (Wolff et al., 2015). Ihre spezifische Funktion ist jedoch weitestgehend unbekannt. Es gibt Hinweise, dass die Noduli ebenfalls an der Modulation der Lokomotion oder Aktivität beteiligt sind (Bausenwein et al., 1994; Martin et al., 1998).

Der Ellipsoidkörper ist teilweise vom fächerförmigen Körper eingefasst und liegt leicht schräg im Gehirn, so dass der dorsale Teil weiter nach posterior reicht. Bei *Drosophila* hat der Ellipsoidkörper eine Toroid-förmige Struktur und wird neben intrinsischen Kleinfeldneuronen auch aus den sogenannten Ringneuronen gebildet (Hanesch et al., 1989; Renn et al., 1999). Die Zellkörper dieser Ringneurone liegen weiter anterior im Cortex des Fliegenhirns, die axonalen Auswüchse wachsen nach posterior und medial, um dann dendritische Verästelungen auf Höhe des Ellipsoidkörpers zu formen, in der Region der lateralen Triangel (*Bulb*; Abb. 2C). Schließlich bilden die Ringneurone eine ringförmige Struktur um den Ellipsoidkörperkanal aus, wo sie in radialen Einheiten auswachsen (Abb. 2D). Der Ellipsoidkörper zählt 16 radiale Einheiten (Abb. 2B). Die Subpopulationen der Ringneurone bilden eine ringförmige Struktur unterschiedlichen Durchmessers und unterschiedlicher Größe. Außerdem variiert die Position im Ellipsoidkörper, so dass klassisch zwischen vier Subtypen von Ringneuronen unterschieden wird: R1, R2, R3 und R4 Neurone (Abb. 2C; Renn et al., 1999). Aus der Heuschrecke ist bekannt, dass visuelle Information über die optischen Tuberkel zu den lateralen Triangeln (Heuschrecke: lateraler akzessorischer Lobus) und somit in den Ellipsoidkörper (Heuschrecke: Zentralkörper) eingespeist werden. Bei *Drosophila* wurden ebenfalls Neurone gefunden, welche diese beiden Neuropile verbinden (Chiang et al., 2011; www.flycircuit.tw). Insgesamt gibt es etwa 60 Ringneurone und in jedem der Subtypen scheint es sowohl exzitatorische cholinerge, glutamaterge und serotonerge Ringneurone zu geben, als auch inhibitorische GABAerge

Ringneurone (Martín-Peña et al., 2014). In den Ringneuronen können sowohl Marker für prä- als auch für postsynaptische Strukturen gefunden werden (Zhang et al., 2013; unpublizierte Daten der AG Strauss). Außerdem wurden drei verschiedene Klassen von Synapsen gefunden: Erstens die einfache Synapse, bei der eine aktive Zone der Präsynapse über einer postsynaptischen Zelle steht und die nächste benachbarte aktive Zone $> 0,5 \mu\text{m}$ entfernt ist (Abb. 3A). Zweitens eine multiple Synapse, bei der mehrere nahe aktive Zonen ($< 0,5 \mu\text{m}$) auf eine Postsynapse projizieren (Abb. 3B) und drittens eine Koinzidenzsynapse, bei der zwei unabhängige aktive Zonen zweier Neurone exakt auf dieselbe Position eines dritten Neurons projizieren (Abb. 3C; Martín-Peña et al., 2014).

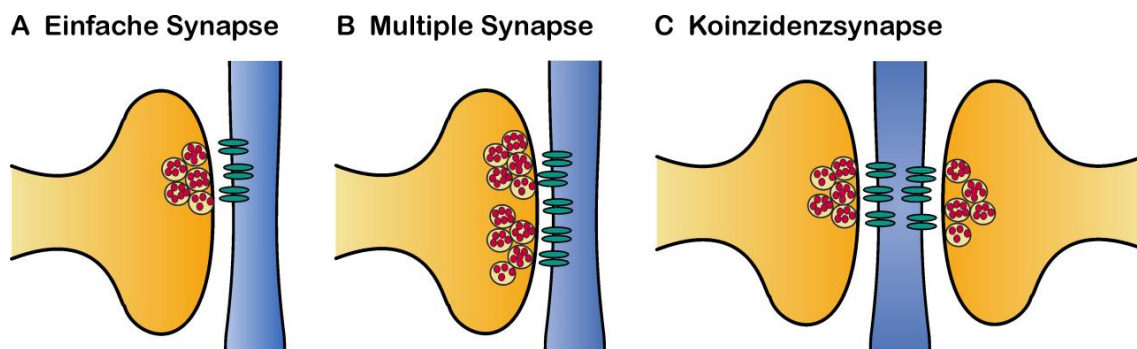


Abb. 3: Synapsentypen im Ellipsoidkörper (nach Martín-Peña et al., 2014). (A) Die einfache Synapse besteht aus einer aktiven Zone in der Präsynapse und der dazugehörigen Rezeptororganisation in der Postsynapse. (B) Bei der multiplen Synapse liegen zwei benachbarte aktive Zonen sehr nah beieinander ($< 0,5 \mu\text{m}$) und projizieren auf eine Postsynapse. (C) Die Koinzidenzsynapse besteht aus zwei unabhängigen aktiven Zonen zweier Neurone, die exakt auf derselben Position auf ein drittes Neuron projizieren.

Des Weiteren gibt es intrinsische Neurone, die eine funktionelle eins-zu-eins Verknüpfung der 16 radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers mit einem definierten Glomerulus der Protocerebralbrücke verbinden. Diese Neurone, deren Dendriten in den 16 radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers arborisieren, lassen entweder die auf jeder Hemisphäre innersten oder äußersten Glomeruli der Protocerebralbrücke aus (Hanesch et al., 1989; Lin et al., 2013; Wolff et al., 2015). Über diese Kleinfeldneurone ist der Informationsaustausch zwischen den einzelnen Zentralkomplexneuropilen gewährleistet.

Funktional wurde dem Ellipsoidkörper ein visuelles Arbeits- (Neuser et al., 2008) und Ortsgedächtnis (Foucaud et al., 2010; Ofstad et al., 2011), sowie ebenfalls die visuelle Mustererkennung und -konditionierung im Flugsimulator (Wang et al., 2008;

Pan et al., 2009) zugeordnet. Außerdem wurde auch eine Gedächtnisspur für das olfaktorische Mittel- (Zhang et al., 2013) und Langzeitgedächtnis (Wu et al., 2007) in den Ringneuronen gefunden.

1.3. Lernen und Gedächtnis von *Drosophila* – Koinzidenzdetektion

Um die molekularen und zellulären Grundlagen von Lern- und Gedächtnisprozessen besser zu verstehen, wurden diverse Tiermodelle zur Erforschung dieser Mechanismen etabliert. Bei Tieren versteht man im Allgemeinen unter Lernen die anhaltende Anpassung von Verhaltensweisen aufgrund von Erfahrungen. Diese Verhaltensanpassungen werden als Gedächtnis bezeichnet und können von kurz- oder langzeitiger Dauer sein (Dudai, 2002). Informationen werden nicht nur unterschiedlich lange gespeichert, sondern auch modifiziert, wieder gelöscht oder miteinander verknüpft (Kandel et al., 2014). Diese Veränderungen äußern sich in Form von zellulären Veränderungen – z.B. die Änderung des Aktivitätslevels einer Zelle durch vermehrte Expression oder Modifizierung von Ionenkanälen, oder strukturelle Zellveränderungen wie Neuritenwachstum und Ausbildung von neuen Synapsen (Davis, 2011). Die Forschung an einfachen Modellorganismen wie *Aplysia* oder *Drosophila* haben bis heute großen Anteil an der Identifizierung molekularer Mechanismen des Lernens und an dem Verständnis für neuronale Plastizität (Kandel et al., 2014). Bei *Drosophila* wurde als Modell die Bildung olfaktorischer Kurz- und Langzeitgedächtnisse ausgiebig untersucht (Tully und Quinn, 1985; Davis, 2005). Um aber die genetische und neuronale Basis, sowie die verschiedenen Verhaltensebenen des Lernens von *Drosophila* weiter zu studieren, wurden auch diverse andere Paradigmen, z.B. für die Analyse von visuellen oder räumlichen Gedächtnissen, entworfen (Kapitel 1.4; Kahsai und Zars, 2011).

Bei der assoziativen olfaktorischen Konditionierung von *Drosophila* wird ein Duft mit einem attraktiven Stimulus (Zuckerbelohnung; Tempel et al., 1983) oder einem aversiven Stimulus (Elektroschock; Tully und Quinn, 1985) gekoppelt. Anschließend wird die Hinwendung oder Abwendung der Fliege zum Duft getestet. Die Verknüpfung des konditionierten und des unkonditionierten Stimulus wird beim olfaktorischen Gedächtnis den Pilzkörperneuronen zugeordnet (Abb. 4). Die olfaktorische Prozessierung eines Duftes gelangt über cholinerge Projektionsneurone der Antennalloben zu den Calyces der Pilzkörper. Die Wertigkeit des unkonditionierten Stimulus (Zucker oder Elektroschock) wird über dopaminerge Neurone vermittelt,

welche den Pilzkörper jeweils an spezifischen Regionen innervieren. Der Abruf eines aversiven Gedächtnisses und folglich der Auslöser eines Vermeidungsverhaltens wird von den Oberflächenneuronen der α/β -Neurone (α/β_s) vermittelt, während ein appetitives Gedächtnis und eine Hinwendungsreaktion von der gesamten Population (α/β_s - und α/β_c -Neurone) vermittelt wird (Waddell, 2013; Perisse et al., 2013). Die Koinzidenzdetektion des olfaktorischen und des modulatorischen Reizes wird der Adenylylzyklase (kodiert durch *rutabaga* (*rut AC*)) zugeschrieben. Die Neurotransmitter der modulatorischen Neurone binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, woraufhin sich die β/γ -Untereinheiten von der α -Untereinheit des G-Proteins abgespalten und die α -Untereinheit die *rut AC* aktiviert. Gleichzeitig resultiert die Signaltransduktion des Duftreizes in einer erhöhten Calcium (Ca^{2+})-Ausschüttung in der Kenyonzelle und der Verbund von Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) bindet ebenfalls an die *rut AC*. Die gleichzeitige Aktivierung der *rut AC* durch Ca^{2+} /CaM und ein G-Protein vermittelt die Koinzidenz zwischen Duft und unconditioniertem Stimulus. Die Aktivität der *rut AC* führt zu einer vermehrten Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der PKA, so durchläuft diese eine Konformationsänderung, wodurch die katalytischen Untereinheiten dissoziieren und Zielsubstrate phosphorylieren. Als Kurzzeitkomponente kann PKA Ionenkanäle durch Phosphorylierung modifizieren und so das Antwortverhalten der Zelle verändern. Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element-binding protein*) dient hingegen der Induktion von zusätzlicher Genexpression und wird für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses benötigt. Da die Dynamik des cAMP-Levels für Lernvorgänge entscheidend ist, ist ein weiterer essentieller Bestandteil dieser beispielhaften cAMP-Lernkaskade die Phosphodiesterase (PDE; kodiert von *dunce*), welche cAMP wieder abbaut und somit eine sensitive Regulation des cAMP-Levels gewährleistet (Davis, 2005).

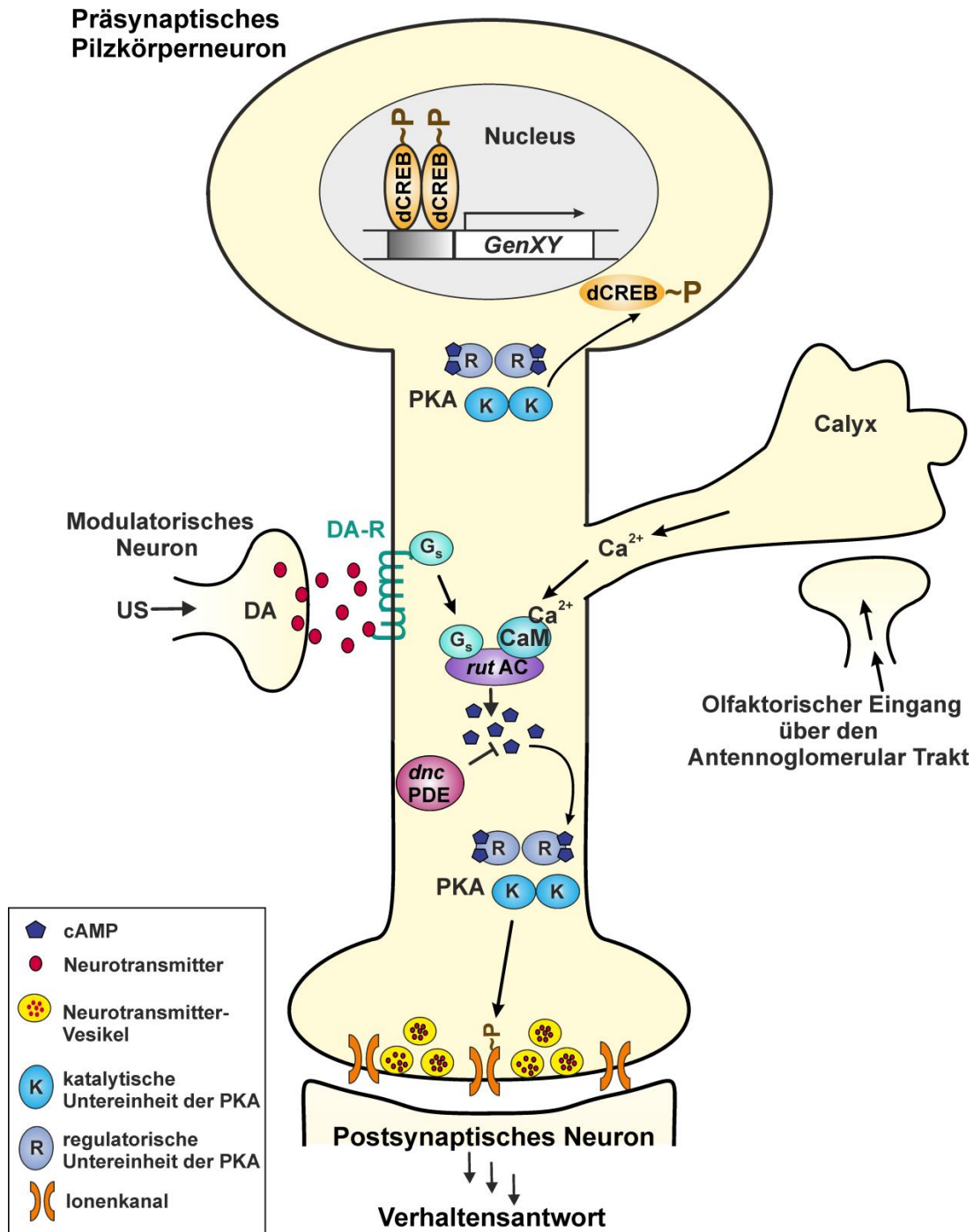


Abb. 4: Modell der klassischen Duftkonditionierung bei *Drosophila*. Ein Duft wird über den Antennenglomerular Trakt zu den Calyces der Pilzkörper übermittelt. Die Transduktion des olfaktorischen Reizes resultiert in einer erhöhten Ca^{2+} -Ausschüttung, Ca^{2+} kann an Calmodulin (CaM) binden. Parallel wird der unconditionierte Stimulus über ein modulatorisches, dopaminerges Neuron vermittelt. Die Aktivierung des Dopamin-Rezeptors (DA-R) führt zur Abspaltung einer aktiven G_s -Untereinheit. Die Koinzidenzdetektion von Duft und Bestrafung/Belohnung erfolgt durch die doppelt regulierte Adenyllyzyklase, welche von *rutabaga* kodiert wird (*rut AC*). Sowohl die G_s -Untereinheit als auch Ca^{2+} /CaM sind für die Aktivierung notwendig und führen zur vermehrten cAMP-Produktion. Die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) führt zur Aktivität der katalytischen Untereinheit, welche Modulationen in der Zelle vornimmt; z.B. Phosphorylierung von Ionenkanälen oder Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors dCREB zur Induktion von Genexpression. cAMP wird durch die *dunce* Phosphodiesterase (*dnc PDE*) wieder abgebaut und das cAMP-Signal somit dynamisch reguliert (verändert nach Waddell und Quinn, 2001).

Um Gedächtnisformen verschiedener Dauer zu unterscheiden, gibt es sowohl anatomische, als auch biochemische Mechanismen zur Differenzierung. Die Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses (15 Minuten bis drei Stunden) ist von der Aktivität der α'/β' -Loben und des γ -Lobus abhängig, während für das Langzeitgedächtnis (neun bis 12 Stunden) vor allem die α/β -Loben benötigt werden (Güven-Ozkan und Davis, 2014). Weiterhin können biochemische Komponenten die Unterschiede zwischen Kurzzeit- und Langzeitlernen erklären (Zars, 2010). Einen Beitrag zur weiteren Charakterisierung der biochemischen Komponenten eines kurzlebigen Arbeitsgedächtnisses bei *Drosophila* soll diese Arbeit leisten.

1.4. Visuelle Ortsgedächtnisse von *Drosophila*

Auch bei *Drosophila* wurden bereits Experimente zu einem räumlichen und/oder visuellen Ortsgedächtnis durchgeführt. In der sogenannten *Heat-Box* wird eine Fliege mit Hilfe der operanten Konditionierung darauf trainiert, dass sie eine Hälfte der Box vermeidet, da sich diese mit unangenehm hohen Temperaturen aufheizt, sobald die Fliege diese Hälfte der Box betritt. Sowohl die Konditionierungs- als auch die Testphase findet im Dunkeln statt, so dass die Fliege nur auf taktile Information und auf Pfadintegration als Orientierungsstrategie zurückgreifen kann (Wustmann und Heisenberg, 1997; Putz und Heisenberg, 2002). Ein weiteres Ortsgedächtnis wurde in einem Paradigma beschrieben, welches analog zu dem *Morris water-maze* für Mäuse (Morris, 1984) entworfen wurde. Während Mäuse durch die Orientierung an visuellen Objekten eine versunkene Plattform in einem mit Wasser gefüllten Schwimmbecken wiederfinden können, so braucht *Drosophila* als Orientierung visuelle Muster, um einen kühlen Fleck als sicheren Ort innerhalb einer erhitzten Arenaplatte wiederzufinden (Foucaud et al., 2010). Die R1 Neurone des Ellipsoidkörpers werden für dieses Ortsgedächtnis benötigt (Ofstad et al., 2011). Fliegen besitzen außerdem ein Gedächtnis für visuelle Landmarken. Im Flugsimulator können sie auf Objekte unterschiedlicher Größe, Farbe und Orientierung trainiert werden und lernen, den Anflug dieser zu vermeiden, wenn die Objekte mit einem bestrafenden Hitzereiz verbunden sind. Die visuelle Mustererkennung wurde den Strukturen des fächerförmigen Körpers und den R2/R4m Neuronen des Ellipsoidkörpers zugeordnet (Liu et al., 2006; Wang et al., 2008; Pan et al., 2009).

Die Repräsentation von visuellen Objekten bzw. Landmarken konnte erstmals auch mit Hilfe der *Calcium-Imaging* Methode direkt mit neuronaler Aktivität in der Region

der lateralen Triangel (*Bulb*) der Ringneurone korreliert werden. In diesem experimentellen Aufbau wird eine Fliege am Kopf fixiert, läuft jedoch frei beweglich auf einem schwebenden Ball in einer virtuellen Arena (*Buchner-Ball*). Der Fliege können nun attraktive Landmarken auf einem Monitor gezeigt werden und gleichzeitig kann parallel die neuronale Aktivität mit fluoreszierenden Proteinen und einem zwei-Photonen-Mikroskop visualisiert werden. Die dendritischen Regionen in den lateralen Triangeln (*Bulb*) der individuellen Ringneurone werden durch visuelle Objekte aktiviert und zeigen ein präferenzielles Antwortverhalten auf Landmarken bestimmter Höhen und Winkel im visuellen Blickfeld der Fliege, so dass eine Art retinotop Karte für die lateralen Triangel erstellt werden konnte (Seelig und Jayaraman, 2013). In einer zweiten Studie derselben Arbeitsgruppe wurde der experimentelle Aufbau erweitert, indem die Fliege nun eine vertikale Landmarke unter ihrer eigenen Kontrolle im visuellen Blickfeld halten kann (*closed-loop* Experiment), während gleichzeitig weiterhin die neuronale Aktivität beobachtet wird. Identifiziert wurde eine kolumnäre Neuronenpopulation des Zentralkomplexes (eb-pb-vbo Neurone (Hanesch et al., 1989); EIP Neurone (Lin et al., 2013); EBw.s-PBg.b-gall.b Neurone (Wolff et al., 2015)), welche Informationen aus einer radialen Einheit des Ellipsoidkörpers (*Wedge*) abgreift und in spezifische Glomeruli der Protocerebralbrücke projiziert (Abb. 2B). Diese Neurone beinhalten eine Kompass-ähnliche Repräsentation der Orientierung der Fliege in Relation zu einer visuellen Landmarke. Sie werden nicht nur durch visuelle Stimuli aktiviert, sondern auch die Eigenbewegung der Fliege induziert Aktivität in diesen Neuronen. Verschwindet eine visuelle Landmarke, so behalten diese Neurone die Repräsentation der Landmarke/die Orientierung über einige Sekunden (bis über 30 s) in Dunkelheit (Seelig und Jayaraman, 2015).

Fliegen orientieren sich also nicht nur nach den akuten visuellen Eingängen, sondern sind in der Lage, eine Gedächtnisspur für vorherige Positionen oder präferierte Richtungen anzulegen. Ein visuelles Orientierungsgedächtnis für eine Landmarke, welche aus dem Sichtfeld der Fliege verschwindet, wurde schon früher bei *Drosophila* beschrieben (Neuser et al., 2008). Für diese Art eines visuellen Arbeitsgedächtnisses benutzt die Fliege sowohl visuelle als auch ideothetische (also selbst-generierte) Informationen, um durch Pfadintegration an das ursprüngliche Ziel zu gelangen. Die biochemischen Prozesse, die an diesem Gedächtnis beteiligt sind, sind jedoch weitestgehend unbekannt. Im Folgenden wird sich die Arbeit mit der Identifizierung biochemischer Komponenten dieses visuellen Orientierungsgedächtnisses beschäftigen.

1.5. Das visuelle Orientierungsgedächtnis von *Drosophila*

Ein Großteil des Gehirns von *Drosophila* dient der Verarbeitung visueller Informationen. Frühe Experimente zur Orientierung von frei laufenden Fliegen zeigten bereits, dass dunkle Objekte bzw. Landmarken vor einem hellen Hintergrund die Aufmerksamkeit der Fliege auf sich ziehen (Götz, 1980) und dass die Attraktivität des Objekts mit einer kürzeren Distanz steigt (Schuster et al., 2002). Es wurde das sogenannte *Detour*-Paradigma entwickelt, um ein visuelles Orientierungsgedächtnis von *Drosophila* zu untersuchen (Dissertation Mronz, 2004; Neuser et al., 2008). Eine Fliege mit gestutzten Flügeln befindet sich dabei in einer Arena, in der ihr zwei attraktive Landmarken präsentiert werden. Läuft die Fliege für wenige Sekunden auf einen Balken zu, so wird dieser ausgeblendet und es erscheint ein Ablenkungsbalken im 90 ° Winkel. Die Fliege folgt dem neuen sensorischen Input und steuert nun auf den neuen Balken zu. Dieser verschwindet jedoch nach einer Sekunde ebenfalls und es gibt keine visuellen Informationen für die Fliege in der Arena. Wildtypische Fliegen führen nun in 80 % der Fälle erneut eine Kehrtwende aus und laufen wieder in die Richtung der ursprünglich zuerst angesteuerten Landmarke. Dieses Verhalten verdeutlicht, dass die Fliege die Position des ursprünglichen Ziels gespeichert haben muss (eine detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus befindet sich in Kapitel 2.2; Abb. 7). Da der Abruf dieses Gedächtnisses auch in vollkommener Dunkelheit ohne externe Reize funktioniert, muss es sich um ein ideothetisches Gedächtnis handeln, welches auf Pfadintegration beruht (Dissertation Neuser, 2012). Dieses Prinzip der Navigation steht einer Orientierungsstrategie gegenüber, bei der sich andere Insektenarten auch an prägnanten Landmarken in der Umwelt orientieren und ein Gedächtnis in Form einer visuellen Landkarte der Umwelt ausbilden. Bei dieser Form wird ein externes Referenzsystem für die eigene Navigation genutzt (Menzel et al., 2006; Collett et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wird dieses visuelle Orientierungsgedächtnis auch als Arbeitsgedächtnis bezeichnet. Der Begriff des Arbeitsgedächtnisses stammt ursprünglich aus der Psychologie und wurde klassischerweise für ein Kurzzeitgedächtnis, welches über eine sehr begrenzte Dauer und Kapazität verfügt, verwendet. Das Zurückgreifen auf die nicht mehr akut vorhandene sensorische Information ermöglicht weiterhin ein zielgerichtetes Verhalten (Baddeley, 2012; Cowan, 2008; Ma et al., 2014). Die vorübergehende Bereitstellung und Prozessierung von visueller und ideothetischer Information, die schließlich durch eine zentrale Verarbeitung trotz

äußerer Störfaktoren zu einem zielgerichteten Verhalten führt, ist auch im untersuchten Orientierungsgedächtnis gegeben, so dass im Folgenden auch von Arbeitsgedächtnis gesprochen werden kann.

Die Analyse mehrerer Strukturmutanten im *Detour*-Paradigma ergab, dass der Zentralkomplex im Allgemeinen und vor allem der Ellipsoidkörper essentiell für ein funktionsfähiges visuelles Arbeitsgedächtnis bei *Drosophila* sind (Dissertation Neuser, 2012). So weist die Mutante *ellipsoid-body-open (ebo)*, welche einen deformierten Ellipsoidkörper hat, einen vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses auf. In einem weiteren Experiment wurde durch die Expression von Tetanustoxin die synaptische Transmission jedes Subsystems der Ringneurone ausgeschaltet. Sowohl in den R1, R3 als auch in den R4 Neuronen führt dies zum vollständigen Verlust des visuellen Orientierungsgedächtnisses. Expression von Tetanustoxin in R2 Neuronen führt zur Immobilität von Fliegen, so dass diese nicht im *Detour*-Paradigma getestet werden können (unpublizierte Daten der AG Strauss). Die Ringneurone des Ellipsoidkörpers sind also eine essentielle und notwendige Struktur für das visuelle Arbeitsgedächtnis. Im Gegensatz dazu zeigen Experimente, bei denen die Pilzkörper der Fliegen chemisch ablatiert wurden, dass diese bekannte Lernstruktur bei *Drosophila* nicht für die Ausbildung dieses Gedächtnisses benötigt wird (Neuser et al., 2008).

Um mehr über die biochemische Natur dieses Gedächtnisses zu erfahren, wurden klassische *Drosophila* Lernmutanten im *Detour*-Paradigma getestet. Der cAMP-Signaltransduktionsweg hat eine fundamentale und zentrale Rolle für die Gedächtnisbildung bei *Drosophila* (Kahsai und Zars, 2011; Waddell und Quinn 2001; Kapitel 1.3). Die beiden prominentesten Lernmutanten dieses Signalweges sind *rutabaga (rut)* (Tully und Quinn, 1985) und *dunce (dnc)* (Dudai et al., 1976), welche für eine Adenylylzyklase (AC) und eine Phosphodiesterase (PDE) kodieren (Livingstone et al., 1984; Davis und Kiger, 1981) und deren gegensätzliche Funktionalität im Auf- bzw. Abbau von cAMP für ein dynamisches cAMP-Level sorgt. Die bisherigen Experimente zur Beteiligung des cAMP-Signalweges am visuellen Orientierungsgedächtnis der Fliege waren nicht eindeutig. Da *rut* Mutanten keine gerichtete Orientierung auf Landmarken zeigen, können diese nicht im *Detour*-Paradigma getestet werden. Die *dnc*¹ Mutante hat zwar in vielen Lernparadigmen für assoziatives Lernen (Dudai et al., 1976) oder operante Konditionierung (Wustmann et al., 1996) einen Phänotyp, jedoch ist *dnc*¹ nur ein hypomorphes Allel, welches immer noch etwa 50 % PDE-Restaktivität aufweist (Davis und Kiger, 1981). Testet man die *dnc*¹ Mutante im *Detour*-Paradigma so zeigen

sie zwar nur 70 % positive Anläufe auf das ursprüngliche Ziel, unterscheiden sich jedoch nicht vom Wildtyp (Neuser et al., 2008).

Das *ignorant (ign)* Gen, welches für das *Drosophila* Ortholog der Ribosomalen S6 Kinase II (RSKII) kodiert (Wassarman et al., 1994; Putz et al., 2004), ist nicht am cAMP-Signalweg beteiligt, sondern an der MAP-(*mitogen activated protein*)-Kinase Signaltransduktion (Kim et al., 2006; Sweatt, 2001). Die Verhaltensanalyse verschiedener *ign* Allele zeigt, dass das *ign* Gen sowohl für die klassisch aversive als auch für die operante Konditionierung benötigt wird (Putz et al., 2004). Analysiert man im *Detour*-Paradigma Fliegen, welche das Nullallel *ign*^{58/1} tragen, so weisen diese einen vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses auf, welcher durch die adulte Expression der *ign* cDNA in den R3/R4d Neuronen gerettet werden kann (Neuser et al., 2008). Zur weiteren Untersuchung der biochemischen Komponenten wurde die *foraging (for)* Mutante im *Detour*-Paradigma analysiert. *For* kodiert für eine von zwei cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) bei *Drosophila* (Kalderon und Rubin, 1988) und das Protein konnte im Ellipsoidkörper und in den lateralen Dreiecken lokalisiert werden (Belay et al., 2007). In weiteren Experimenten wurde die Beteiligung der PKG an der olfaktorischen assoziativen Konditionierung in Larven (Kaun et al., 2007) und adulten Tieren (Mery et al., 2007) nachgewiesen. Mutanten dieses Gens haben ebenfalls ein reduziertes Orientierungsgedächtnis (Diplomarbeit Kuntz, 2010).

Die Analyse der *ebo* Mutante ergab weitere Einblicke in die Zellbiologie dieses visuellen Arbeitsgedächtnisses. Das *ebo* Gen kodiert bei *Drosophila* für Exportin 6 (Thran et al., 2013) und ist für den Transport von globulärem Aktin vom Zellkern ins Zytoplasma verantwortlich (Stüven et al., 2003). In der Mutante akkumuliert Aktin vermehrt im Zellkern und behindert so vermutlich den Transkriptionskomplex dSRF/dMRTF (*Serum Response Factor/Myocardin-related transcriptional factor*) (Abb. 5; Thran et al., 2013). Der negative Einfluss von globulärem Aktin auf die Lokalisation und Aktivität von MRTF wurde bereits in Säugerzellen gezeigt (Vartiainen et al., 2007). Auch bei *Drosophila* konnte eine Verknüpfung dieser beiden Komponenten durch eine genetische Interaktion hergestellt werden. Doppelt heterozygot mutante Tiere für *ebo* und *dMrft* zeigen einen vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses auf. Im Gegensatz zu diesem zellautonomen Prozess der Regulation des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF durch globuläres Aktin, weist die Verhaltensanalyse der *ebo* Mutante darauf hin, dass das defizitäre Gedächtnis durch Expression der *ebo* cDNA in allen vier Ringsystemen gerettet werden kann. Des

Weiteren kann der defekte Phänotyp der *dSrf* (kodiert von *blistered*) Mutante auch in drei von vier Ringneurontypen (R1, R2 und R3) gerettet werden (Thran et al., 2013). Dies steht ebenfalls im Gegensatz zu der *ign* Mutante, welche ausschließlich in den R3/R4d Neuronen benötigt wird (Neuser et al., 2008). Außerdem erfolgt die Rettung des *ebo* mutanten Gedächtnisphänotyps unabhängig vom strukturellen Defekt des Ellipsoidkörpers im Adultstadium (Thran et al., 2013).

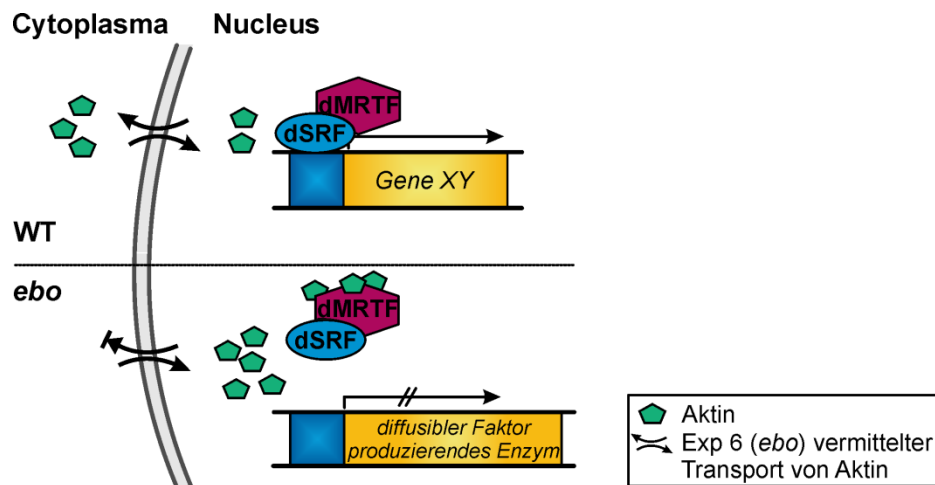


Abb. 5: *ebo* vermittelter Transport von Aktin (nach Thran et al., 2013). In der wildtypischen Situation wird der Export von Aktin aus dem Zellkern über Exportin 6 (*ebo*) vermittelt. Der Transkriptionskomplex aus dSRF/dMRTF reguliert die Expression verschiedenster Gene. In der *ebo* Mutante akkumuliert Aktin im Nucleus und bindet an dMRTF, wodurch die Aktivität des Transkriptionskomplexes unterbunden wird. Aufgrund der Redundanz von *ebo* und *dSrf* in allen vier Ringsystemen des Ellipsoidkörpers für das visuelle Orientierungsgedächtnis wurde die Hypothese formuliert, dass der Genlocus eines diffusiblen Faktor-produzierenden Enzyms unter der regulatorischen Kontrolle des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF steht.

Die Redundanz von *ebo* und *dSrf* in allen vier Ringsystemen führt zu der Hypothese, dass ein diffusibler Faktor an der Bildung des visuellen Arbeitsgedächtnisses von *Drosophila* beteiligt sein muss und dass dieser diffusible Faktor von Enzymen produziert wird, deren Gene unter der Regulation des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF stehen.

1.6. *Drosophila melanogaster* als Versuchsorganismus in der Verhaltensneurobiologie

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde die Taufliege *Drosophila melanogaster* als geeigneter Modellorganismus zur Erforschung grundlegender biologischer Mechanismen erkannt. Die langjährige Forschung führte unter anderem dazu, dass es heute vielzählige genetische Werkzeuge gibt (siehe Kapitel 1.6.1), das

Genom vollständig sequenziert ist (Adams et al., 2000) und die Taufliege somit für die Neurowissenschaften ein ideales System darstellt, um den Zusammenhang zwischen Genen, neuronalen Strukturen und Verhaltensweisen herzustellen. Das Interesse der Neuro- und Verhaltensbiologie liegt heutzutage vor allem darin, die verantwortlichen Mechanismen der steuernden Nervensysteme zu verstehen, sowie weshalb, wann und wie ein bestimmtes Verhalten ausgelöst wird.

Trotz des vergleichsweise kleinen Nervensystems mit etwa 100 000 – 150 000 Neuronen (Chiang et al., 2011; Jenett et al., 2012) und bisher 17 215 sequenzierten Genen (dos Santos et al., 2015) stellt die Fliege einen optimalen Modellorganismus zum Erforschen der Funktionalität des Gehirns dar (zum Vergleich: Mensch: 10^{11} Nervenzellen, 30 000 Gene; Seyffert, 2003), da *Drosophila* viele Gemeinsamkeiten mit Vertebraten teilt. Dazu zählt ein dreiteiliges Gehirn (Proto-, Deuto- und Tritocerebrum vs. Vorder-, Mittel- und Rautenhirn), das vergleichbare Neurotransmittersystem und ein reichhaltiges und vielfältiges Verhaltensrepertoire (Zordan und Sandrelli, 2015). Die Verhaltensanalysen und die Analyse des Einflusses von Genen auf das Verhalten wurde bereits in den 1970 iger Jahren von Seymour Benzer begonnen (Benzer, 1967) und wurde bis heute ausgeweitet. So wird an *Drosophila* unter anderem Balzverhalten (z.B. Yamamoto und Koganezawa, 2013), circadiane Rhythmik (z.B. Zordan und Sandrelli, 2015); Lernen und Gedächtnis (z.B. Kahsai und Zars, 2011), Suchtverhalten (z.B. Devineni und Heberlein, 2013) oder Aggression (z.B. Anholt und Mackay, 2012) studiert. Die einfachere Konnektivität des Nervensystems, die guten Manipulationstechniken und die kurze Generationszeit der Fliege in Verbindung mit einer niedrigen ethischen Schwelle bieten daher eine Möglichkeit, komplexe Mechanismen zu untersuchen und zu verstehen.

1.6.1. Neurogenetische Manipulationen für die Verhaltensanalyse

Das UAS/GAL4-System (*upstream activating sequence*/Transkriptionsfaktor; Brand und Perrimon, 1993) hat die genetischen Manipulationsmöglichkeiten bei *Drosophila* maßgeblich beeinflusst. Dabei stellte sich das natürliche Vorkommen von Transposons als nützlich heraus. Die bei *Drosophila* am häufigsten verwendeten Transposons heißen P-Elemente. Natürliche P-Elemente kodieren für eine Transposase, ein Enzym welches es dem P-Element ermöglicht, aus seinem bisherigen Integrationsort herauszuspringen und an einen anderen Ort der DNA neu zu integrieren. Bei künstlichen P-Elementvektoren wird die Sequenz der Transposase entfernt und stattdessen die

gewünschte DNA-Sequenz eingebaut. Anschließend wird der Vektor mittels Keimbahntransformation in das Genom der Fliege integriert (Seyffert, 2003). Auf der Grundlage eines Transkriptionaktivierungssystems aus der Hefe wurde ein binäres System für *Drosophila* entwickelt, welches eine zielgerichtete Überexpression, sowie ektopische oder xenotopische Genexpression ermöglicht. Zum einen wird eine transgene Linie hergestellt, die in Form eines P-Elements die cDNA des Transkriptionaktivatorproteins GAL4 enthält. Wird dieses P-Element nun ins Genom der Fliege integriert, so gelangt es zufällig unter die Kontrolle eines endogenen *Enhancers*, welcher das Expressionsmuster des GAL4 Proteins (*enhancer-trap* Linien) bestimmt. Durch Einkreuzen der $\Delta 2, 3$ -Transposase kann das P-Element an diverse Stellen im Genom springen und auf diese Weise können die verschiedensten Expressionsmuster (GAL4-Treiberlinien) entstehen. Der zweite Teil des binären Systems umfasst ein P-Element mit der GAL4-Bindesequenz, die sogenannte UAS-Sequenz. Hinter das UAS-Fragment kann jede beliebige Sequenz kloniert werden. Durch Kombination dieser beiden Transgene wird GAL4 in einem definierten Muster exprimiert und bindet in denselben Zellen an die UAS-Sequenz, welche die Expression des Gens von Interesse aktiviert (Abb. 6A; Brand und Perrimon, 1993). Die räumlich kontrollierte Expression wurde um eine zeitlich kontrollierende Komponente erweitert. Das temperatur-sensitive Protein GAL80^{ts} wirkt bei niedrigen Temperaturen (18 °C) als Repressor des GAL4 Proteins und inhibiert dessen transkriptionelle Aktivität. Bei höheren Temperaturen hingegen (30 °C) löst sich GAL80^{ts} von GAL4, was in der Aktivierung der UAS-Sequenz resultiert (McGuire et al., 2003). Auf diese Weise kann die Expression eines Transgens zeitlich gesteuert werden, so dass die Kontroll- und experimentelle Situation in demselben Tier getestet werden kann (Abb. 6B).

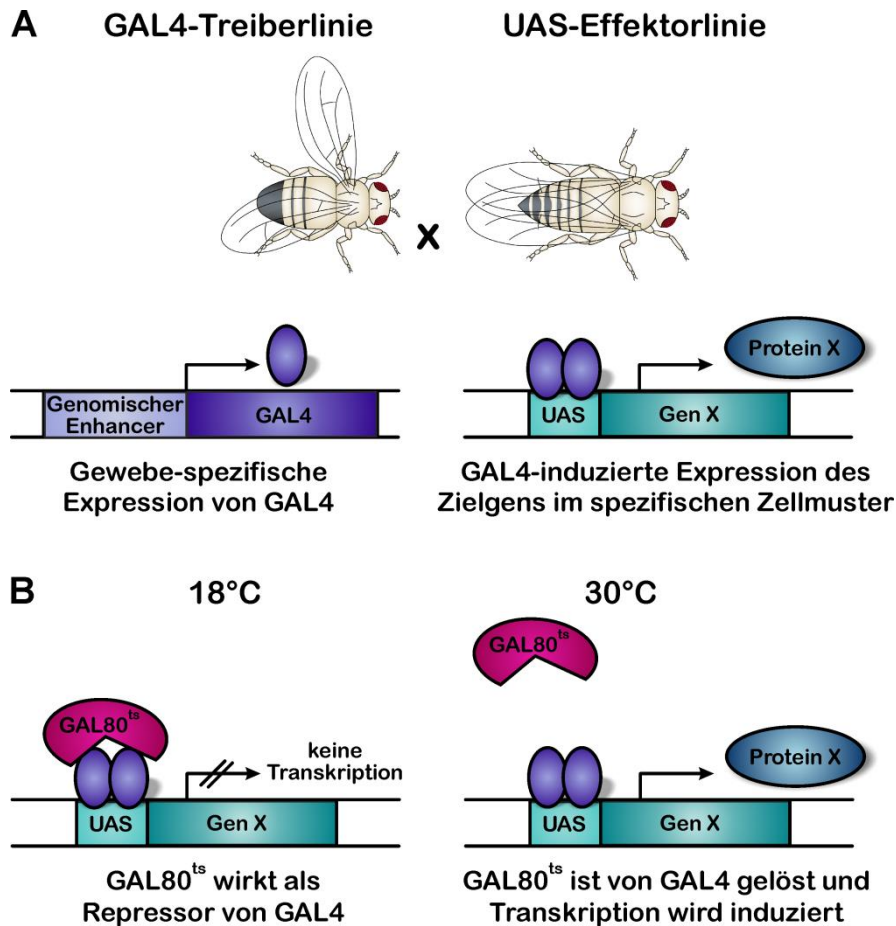


Abb. 6: Das UAS/GAL4 System. (A) Dieses binäre System dient der Gewebe-spezifischen Expression von Genen in der Fliege. Der Expressionsort der GAL4-Treiberlinie wird entweder von einem genomischen Enhancer oder von einem klonierten Enhancer bestimmt. GAL4 bindet an die UAS-Sequenz, wodurch die Transkription des Transgens initiiert wird. (B) Die räumlich gezielte Expression kann um eine zeitliche Komponente ergänzt werden. Bei 18 °C bindet der Temperatur-sensitive Repressor GAL80^{ts} an GAL4 und inhibiert so die Transkription des Zielgens. Durch Erhöhung der Temperatur auf 30 °C löst sich GAL80^{ts} von GAL4 und die Expression des Transgens im spezifischen Zellmuster findet statt.

Mit dem UAS/GAL4-System können diverse Konstrukte in der Fliege gezielt exprimiert werden. So kann z.B. eine gezielte Überexpression eines Gens induziert werden oder im genetischen Hintergrund einer Nullmutante dieses Gen nur in definierten Gehirnstrukturen zurückgegeben werden, um den defekten Phänotyp zu retten und die relevanten Strukturen zu identifizieren. Die Visualisierung des Expressionsmusters einer GAL4-Linie ist über Expression eines fluoreszierenden Proteins möglich.

Eine Erweiterung des UAS/GAL4-Systems stellt die Integration des P-Elements über eine PhiC31-Integrase dar, wodurch das P-Element durch eine spezifische Rekombinase immer an dieselbe definierte Stelle im Genom integriert und Positionseffekte damit minimiert werden. Das Expressionsmuster von GAL4 wird über beliebige

Promotorsequenzen, die ebenfalls in das P-Element kloniert werden, bestimmt. Mit Hilfe des *split*-GAL4-Systems (Luan et al., 2006) können die Expressionsmuster der GAL4-Linien weiter eingegrenzt und Einzelzell-Linien generiert werden. Durch Verwendung eines zweiten binären Transkriptionaktivierungssystems, dem LexA/LexAop-System (Lai und Lee, 2006) können zwei Transgene parallel und getrennt voneinander induziert werden (Pfeiffer et al., 2010). Des Weiteren wurde in zwei großangelegten Projekten eine enorme Menge an GAL4-Linien kreiert, indem genomische DNA-Bruchstücke als transkriptionale *Enhancer* verwendet wurden, um eine GAL4-Kollektion, die sämtliche Neurone umfasst, zu bekommen. Sowohl die *FlyLight*-Kollektion (*HHMI Janelia Research Campus*; Jenett et al., 2012) als auch die *VT*-Kollektion (*Vienna Drosophila Resource Center*) stehen mit jeweils > 7 000 verschiedenen GAL4-Linien zur Verfügung.

Über die gezielte Expression von Transgenen können neuronale Strukturen und somit deren Aktivität oder Funktion maßgeblich manipuliert werden (Sivanantharajah und Zhang, 2015). So existieren verschiedene Konstrukte, um die Aktivität von Neuronen zu reduzieren (*silencing*). Die Expression von *Tetanus-Toxin* unterbindet die Exozytose der Neurotransmitter (Sweeney et al., 1995), *Shibire^{ts}* blockiert temperatursensitiv ebenfalls die synaptische Transmission (Kitamoto, 2001) oder *Kir2.1*, ein inwärts gerichteter Kalium-(K⁺)-Kanal, welcher das Membranpotential weiter senkt und somit die Ausbildung von Aktionspotentialen unterbindet (Paradis et al., 2001). Durch die Expression eines einwärts gerichteten Natrium(Na⁺)-Kanals (*NaChBac*; Nitabach et al., 2006) oder eines Hitze-aktivierbaren Kationkanals (*TrpAI*; Rosenzweig et al, 2005) kann die Wahrscheinlichkeit der Erregbarkeit eines Neurons erhöht bzw. durch Temperaturerhöhung die Erregung ausgelöst werden. Die neuronale Aktivität kann durch die Expression eines Ca²⁺-sensitiven fluoreszierenden Reporters (GCaMP6; Chen et al., 2013) im lebenden Tier visualisiert und gemessen werden. Ebenfalls kann die Aktivität eines Neurons über Licht induziert werden. Mit Hilfe von rotwelligem Licht, welches für *Drosophila* nicht sichtbar ist, öffnet sich der *Chrimson*-Kanal und aktiviert so ausschließlich die Neurone, in denen der Kanal exprimiert wurde (Klapoetke et al., 2014).

Mutanten können heutzutage nicht nur über Röntgenbestrahlung oder Chemikalien-basierter Mutagenese erzeugt werden, sondern ebenfalls auch gezielt durch die Verwendung von verschiedensten Transposons (Venken und Bellen, 2014). Des Weiteren kann die *CRISPR/Cas9*-Methode zur gezielten Deletion oder Integration von

kleineren DNA-Sequenzen verwendet werden und bietet daher eine sehr zielgerichtete Manipulation des Genoms (Xu et al., 2015).

Ein weiteres genetisches Werkzeug zur Reduzierung eines Genproduktes beruht auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi). Bei diesem natürlichen Abwehrmechanismus eukaryotischer Zellen wird doppelsträngige RNA (dsRNA) erkannt und mit Hilfe des *Dicer-RISC*-Komplexes abgebaut. Das RNAi-Konstrukt zur Herunterregulierung eines Genproduktes besteht aus einer Gen-spezifischen palindromischen Sequenz, deren Transkription in der Zelle zur Ausbildung von doppelsträngigen Haarnadelstrukturen führt. Diese dsRNA wird vom *Dicer*-Komplex in kleine RNA-Abschnitte von etwa 25 Nukleotiden geschnitten und in einzelsträngige RNA zerlegt. Diese Einzelstränge können nun an ihre komplementären Strukturen in der endogenen mRNA (*messenger RNA*) binden, wodurch erneut dsRNA entsteht, welche abgebaut wird. Dieser Mechanismus führt zur deutlichen Reduzierung oder zum kompletten Abbau der mRNA des Zielgens (Dietzl et al., 2007; Ni et al., 2008).

1.7. Zielsetzung

Der vorliegenden Arbeit liegt die Analyse eines visuellen Orientierungsgedächtnisses bei *Drosophila* zu Grunde. Eine Fliege, die beim Anlaufen einer Landmarke durch einen zweiten, kurzzeitigen visuellen Stimulus von ihrem Weg abgelenkt wird, erinnert sich nach Ausblenden des Ablenkungsstimulus ohne weitere erneute visuelle Reize an die Position der ursprünglichen Landmarke und kehrt auf diesen Weg zurück (Dissertation Mronz, 2004; Neuser et al., 2008). Für diese Art von Arbeitsgedächtnis werden der Zentralkomplex und insbesondere die Ringneurone des Ellipsoidkörpers benötigt. Außerdem ist bereits bekannt, dass die *ign* RSKII adult-spezifisch in den R3/R4d Neuronen des Ellipsoidkörpers für dieses Gedächtnis gebraucht wird (Neuser et al., 2008). Ebenso wurde die Abhängigkeit dieses Gedächtnisses von der *for* PKG bereits etabliert (Diplomarbeit Kuntz, 2010). Beide Kinasen sind bei *Drosophila* für die Beteiligung an Lern- und Gedächtnisprozessen bekannt (Putz et al., 2004; Kaun et al., 2007; Mery et al., 2007; Wang et al., 2008). Mit Hilfe von neurogenetischen Methoden sollen weitere biochemische Komponenten dieses Signalwegs identifiziert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation eines diffusiblen Faktors, welcher für das visuelle Orientierungsgedächtnis bei *Drosophila* benötigt wird. Die Hypothese, dass ein diffusibler Faktor an diesem Gedächtnis beteiligt ist, ergab sich aus

der Analyse der *ebo* Mutante. *ebo* kodiert für Exportin 6 (Thran et al., 2013), welches eine maßgebliche Rolle für den Export von Aktin aus dem Zellkern einnimmt (Stüven et al., 2003). Daraus resultiert in der *ebo* Mutante eine Aktinakkumulation im Zellkern (Thran et al., 2013), welches einen negativen Einfluss auf den Transkriptionskomplex SRF/MRTF hat (Vartiainen et al., 2007) und somit deren transkriptionelle Aktivität behindert. Aufgrund dieses zellautonomen Prozesses, war es umso erstaunlicher, dass der *ebo* mutante Phänotyp im *Detour*-Paradigma durch Expression der *ebo* cDNA in allen vier Ringsystemen des Ellipsoidkörpers gerettet werden kann (Thran et al., 2013). Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen, dass *ign* RSKII für das Orientierungsgedächtnis ausschließlich in R3 und/oder R4d Neuronen benötigt wird (Neuser et al., 2008). Das Rettungsexperiment von *ebo* weist darauf hin, dass über die Transkriptionsfaktoren dSRF/dMRTF ein Gen reguliert wird, welches für ein Enzym kodiert, das einen diffusiblen Faktor produziert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifikation des diffusiblen Faktors.

Das dritte Ziel dieser Arbeit ist die Evaluierung einer möglichen Rolle des cAMP/PKA-Signalweges für das visuelle Orientierungsgedächtnis. Es ist bekannt, dass dieser Signalweg für vielfältige Lern- und Gedächtnisprozesse essentiell ist und er wurde in diversen Tiermodellen etabliert (Kandel et al., 2014). Die Analyse klassischer Lernmutanten dieses Signalwegs ergab bisher jedoch keine eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich einer Beteiligung am Orientierungsgedächtnis (Neuser et al., 2008). Durch die Analyse weiterer Komponenten dieses Signalweges soll die Beteiligung am visuellen Arbeitsgedächtnis eindeutig geklärt werden.

Aufgrund der einfachen und vielfältigen Manipulationsmöglichkeiten des Modellorganismus *Drosophila* kann die Analyse biochemischer Signalwege dieses visuellen Orientierungsgedächtnisses einen Beitrag zum Verständnis genereller Eigenschaften und Mechanismen von Kurzzeit- bzw. Arbeitsgedächtnissen leisten.

2. Material und Methoden

2.1. Fliegenhaltung und –stämme

Alle Fliegen wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei einer Raumtemperatur von 25 °C, einer Luftfeuchtigkeit von ~60 % und einem Licht-Dunkel-Zyklus von 14/10h (Hellphasenbeginn 07:00 Uhr) aufgezogen. Die Tiere wurden in durchsichtigen Plastikgläsern mit einem Volumen von 80 cm³ gehalten. Die Gläser waren mit luftdurchlässigen Stopfen verschlossen und enthielten etwa 20 ml Futterbrei. Das Futter bestand aus Wasser, Hefe, Maismehl, Sojamehl, Malzextrakt, Zuckerrübensirup, Agar und Nipagin. Falls die Versuchstiere für ein Experiment auf 30 °C inkubiert wurden, so erhielten diese vor Beginn des Verhaltensexperiments 15 Minuten Zeit zur Akklimatisierung auf die Raumtemperatur.

Als wildtypischer Referenzstamm wurde Canton-Spezial (CS) verwendet. Alle weiteren verwendeten Mutanten und transgenen Linien, die verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme mit Angabe der betroffenen Chromosomen, der Bezugsquelle und gegebenenfalls einer Referenz.

Stamm	Chromo-som	Bezugsquelle	Referenz
Canton-Spezial (CS)		Stammsammlung Institut für Zoologie III Neurobiologie, Uni Mainz, AG Roland Strauß	
<i>blistered</i> ² (<i>sp</i> ² <i>bs</i> ²)	II	Bloomington Stock Center; BL 403	Donlea et al., 2009
<i>CrebB</i> ^{S162} /FM7a	I	Bloomington Stock Center; BL 4720	Akalal et al., 2010
<i>Cystathionine β-synthase</i> <i>EY04457</i> (<i>Cbs</i> ^{EY04457})	I	Bloomington Stock Center; BL 19839	Bellen et al., 2004
<i>Eip55E</i> ^{KGO2526}	III	Bloomington Stock Center; BL 13752	Trinh et al., 2008
<i>ellipsoid-body-open</i> ⁶⁷⁸ (<i>ebo</i> ⁶⁷⁸)	I	Martin Heisenberg	Strauss und Heisenberg, 1993; Thran et al., 2013
<i>foraging - Rover</i> (<i>for</i> ^R)	II	Marla Sokolowski	de Belle und Sokolowski, 1987
<i>foraging - sitter</i> (<i>for</i> ^S)	II	Marla Sokolowski	de Belle und Sokolowski, 1987

<i>foraging - sitter</i> ⁰² (<i>for</i> ⁰²)	II	Bloomington Stock Center; BL 9843	dos Santos et al., 2015
<i>homer</i> ^{EP2141}	II	Bloomington Stock Center; BL 17027	Diagana et al., 2002
<i>homer</i> ^{R102}	II	Bloomington Stock Center; BL 9564	Diagana et al., 2002
<i>ignorant</i> ^{58/1} (<i>ign</i> ^{58/1})	I	Martin Heisenberg	Putz et al., 2004
<i>Myocardin-related transcription factor</i> ^{A7} (<i>Mrtf</i> ^{A7})	III	Pernille Rørth	Somogyi und Rørth, 2004
<i>Nitric oxide synthase</i> ^{A15} (<i>Nos</i> ^{A15})	II	Patrick O'Farrell	Yakubovich et al., 2010
<i>Nos</i> ^C	II	Patrick O'Farrell	Yakubovich et al., 2010
<i>Nos</i> ^{e2671}	II	Patrick O'Farrell	Yakubovich et al., 2010
<i>Phosphodiesterase 6</i> ^{Mi04678} (<i>Pde6</i> ^{Mi04678})	III	Bloomington Stock Center; BL 38573	-
<i>Pka-C3</i> ^{BRL10}	III	Doris Kretzschmar	
<i>Proteinkinase A-C1</i> ^{H2} (<i>Pka-C1</i> ^{H2})/ <i>CyO</i>	II	Bloomington Stock Center; BL 4101	Lane und Kalderon, 1993
<i>Synapsin</i> ⁹⁷ (<i>Syn</i> ⁹⁷)	III	Erich Buchner	Godenschwege et al., 2004
<i>twins</i> (<i>tws</i>)	III	Bloomington Stock Center; BL 11568	
007Y-GAL4	III	Douglas Armstrong	Poeck et al., 2008; Renn et al., 1999 http://www.fly-trap.org/
189Y-GAL4	II	Douglas Armstrong	Renn et al., 1999 http://www.fly-trap.org/
189Y-GAL4> <i>Tub</i> GAL80 ^{ts}	II	Burkhard Poeck	Rekombiniertes Chromosom
201Y-GAL4	II	Douglas Armstrong	Aso et al., 2009 http://www.fly-trap.org/
<i>Appl</i> -GAL4	III	Laura Torroja	Torroja et al., 1999
c042-GAL4	III	Douglas Armstrong	Renn et al., 1999 http://www.fly-trap.org/
c105-GAL4	I	Douglas Armstrong	Renn et al., 1999 http://www.fly-trap.org/
c155-GAL4+UAS- mCD8::GFP (<i>elav</i> -GAL4)	I	Stammsammlung Institut für Genetik, Uni Mainz, AG Gerd Technau Bloomington Stock Center; BL 5146	

MATERIAL UND METHODEN

c232-GAL4	III	Douglas Armstrong	Renn et al., 1999 http://www.fly-trap.org/
<i>elav+Appl-GAL4</i>	III	Burkhard Poeck	Rekombiniertes Chromosom
<i>elav-GAL4</i>	III	Bloomington Stock Center; BL 8760	
ftz-ng-GAL4/TM3, <i>Sb</i>	III	Julie Simpson Bloomington Stock Center; BL 8767	Pereanu et al., 2011
R28D01-GAL4	III	Bloomington Stock Center; BL 47342	Ofstad et al., 2011
<i>TubGAL80^{IS}</i>	II	Bloomington Stock Center; BL 7019	McGuire et al., 2003
UAS-GFP;EB1-GAL4	II; III	Volker Hartenstein	Young und Armstrong, 2010
VT202672-GAL4	III	Vienna Drosophila Research Centre; VDCR 005535	stockcenter.vdrc.at
VT62856-GAL4	III	Vienna Drosophila Research Centre; VDCR 204419	stockcenter.vdrc.at
UAS- <i>bs (dSrf)</i>	III	M. Affolder	Han et al., 2004
UAS- <i>Cbs</i>	III	Ody Sibon	Kabil et al., 2011
UAS- <i>dCrebB-17A</i>	III	Bloomington Stock Center; BL 9232	Perazzona et al., 2004
UAS- <i>dCreb2-b</i>	nicht bekannt	Ronald Davis	Akalal et al., 2010; Yu et al., 2006
UAS- <i>dSrf+dMrf</i>	III	Burkhard Poeck	Rekombiniertes Chromosom
UAS- <i>forT1</i>	III	Marla Sokolowski	Belay et al., 2007
UAS- <i>homer'myc'GFP</i>	III	John Thomas	Diagana et al., 2002
UAS- <i>ign</i>	II	Martin Heisenberg	Rintelen et al., 2001
UAS- <i>mald (dMrf)</i>	III	Penille Rørth	Somogyi und Rørth, 2004
UAS-mCD8::GFP	III	Bloomington Stock Center; BL 5137	Lee und Luo 1999
UAS- <i>Nos</i> ;UAS- <i>Nos</i>	II, III	Patrick O'Farrell	Yakubovich et al., 2010
UAS- <i>Syn</i> ^(cDNA8)	II	Erich Buchner	Godenschwege et al., 2004
UAS-tdGFP/ <i>CyO</i>	II	Bloomington Stock Center; BL 35839	
UAS- <i>dCreb-B17ARNAi</i>	II	Vienna Drosophila Research Centre; VDRC 101512	Akalal et al., 2010; Dietzl et al., 2007

UAS- <i>for</i> RNAi	III	Vienna Drosophila Research Centre; VDRC GD 38320	Kaun et al., 2007 Belay et al., 2007 Dietzl et al., 2007
UAS- <i>Gyca99B</i> RNAi	III	Bloomington Stock Center; BL 36817	Ni et al., 2008
UAS- <i>homer</i> RNAi	III	Bloomington Stock Center; BL 27271	Ni et al., 2008
UAS- <i>Nos</i> RNAi	II	Vienna Drosophila Research Centre; VDCR 108433	Dietzl et al., 2007
UAS- <i>Pde6</i> RNAi	III	Bloomington Stock Center; BL 25833	Ni et al., 2008
UAS- <i>Pka-C1</i> RNAi	II	Vienna Drosophila Research Centre; VDRC 101524	Dietzl et al., 2007
UAS- <i>Pka-C2</i> RNAi	III	Bloomington Stock Center; BL 31656	Ni et al., 2008
UAS- <i>Pka-C3</i> RNAi	III	Bloomington Stock Center; BL 31656	Ni et al., 2008
UAS- <i>rut</i> RNAi	III	Vienna Drosophila Research Centre; VDRC 5569	Dietzl et al., 2007
Df(1)BSC708/FM7a (Deletion für CBS)	X	Bloomington Stock Center; BL 26560	Cook et al., 2012
Df(2L)ED243/ <i>CyO</i> (Deletion für <i>for</i>)	II	Bloomington Stock Center; BL 24122	Ryder et al., 2004
Df(2R)Exel7157/ <i>CyO</i> (Deletion für CSE)	II	Bloomington Stock Center; BL 7894	Cook et al., 2012
Df(3R)BSC547/TM6c (Deletion für <i>Gyca</i>)	III	Bloomington Stock Center; BL 25075	Cook et al., 2012

2.2. Detour-Paradigma

Das *Detour*-Paradigma dient der Überprüfung eines visuellen Orientierungsgedächtnisses der Fliege (Dissertation Mronz, 2004; Neuser et al., 2008). Die Tiere wurden im Alter von 3 bis 5 Tagen getestet und mindestens einen Tag vor Beginn des Tests wurden den Fliegen die Flügel mit einer Mikroschere unter Kälteanästhesie bei 4° C auf etwa ein Drittel gekürzt. Die Tiere wurden bis vor dem Test auf Futter gehalten und kurz vor Beginn des Experiments in ein Glas mit einem wasserdurchtränkten Tuch gesetzt.

Die Verhaltenstests fanden in einer definierten, künstlichen Umwelt statt. Der Aufbau besteht aus einer LED-Arena (LED: *light-emitting diode*), die aus 180 Kolumnen mit je 32 Leuchtdioden aufgebaut ist, so dass 5760 Bildpunkte entstehen, die

zylinderförmig angeordnet sind (Abb. 7; Strauss et al., 1997). Jeder Bildpunkt hat für einen Beobachtungsstandpunkt aus dem Zentrum der Arena eine Ausdehnung von $2^\circ \times 2^\circ$. Der Öffnungswinkel für ein Ommatidium bei *D. melanogaster* beträgt $4,6^\circ$ (Borst, 2009), so dass mehr als 4 Bildpunkte auf ein Ommatidium fallen. Die Plattform in der Arena besteht aus Plexiglas, hat einen Durchmesser von 26 cm und wird von einem 2 cm breiten Wassergraben umgeben, so dass die Fliegen nicht entfliehen können. Landmarken werden durch Abstellen mehrerer vertikalen Reihen von LEDs erzeugt, so dass dunkle Balken von 4 cm Breite entstehen. Die Landmarken haben einen Abstand von 20 cm vom Zentrum der Arena. Die Arena wird von unten mit Rotlicht beleuchtet, welches für die Fliege nicht zu sehen ist, die Plattform jedoch auf eine wärmere Versuchstemperatur bringt ($\sim 25^\circ\text{C}$). Die Versuche wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, so dass keine externen Lichtquellen die Orientierung der Fliege beeinflussten. Zusätzlich war der Raum mit einer Klimaanlage versehen, um starken Temperaturschwankungen von außen oder durch Erhitzen des Geräts entgegenzuwirken.

Zu Beginn eines Experiments wurde eine Fliege in das Zentrum der Arena gesetzt und es wurden ihr zwei gegenüberliegende Landmarken präsentiert (Abb. 7A). Sobald die Fliege auf eine Landmarke zusteuerte und dabei die virtuelle Mittellinie überquerte, verschwanden die ursprünglichen Landmarken und stattdessen erschien ein Ablenkungsbalken im 90° Winkel zur Fliege (Abb. 7B). Idealerweise lief die Fliege nun auf die neue Landmarke zu ($\pm 15^\circ$), welche nach einer Sekunde ebenso verschwand, so dass die Arena nun wieder vollständig ausgeleuchtet war und keine visuellen Orientierungsstimuli enthielt. Anschließend wurde bestimmt, ob die Fliege sich durch eine $\geq 45^\circ$ Drehung zur alten Landmarke zurückorientierte (positive Entscheidung) oder ob sie sich von der ursprünglichen Landmarke abwendete (negative Entscheidung; Abb. 7C). Falls die Fliege sich nicht ablenken ließ, wurden ihr erneut zwei gegenüberliegende Balken präsentiert. Nach einer Entscheidung der Fliege erschienen ebenfalls erneut zwei gegenüberliegende Balken, nach Überquerung der Mittellinie wurde die Fliege erneut abgelenkt. Es wurden zehn Durchläufe pro Fliege gemessen und nach jeder Fliege wurde die Arena mit Wasser abgewischt, um eine Orientierung an Duftspuren zu vermeiden.

Das Zufallsniveau für positive Entscheidungen zugunsten der ursprünglichen Landmarke liegt bei 58 %, da nach einer Rechtsdrehung die Wahrscheinlichkeit für eine anschließende Linksdrehung höher ist als für eine erneute Rechtsdrehung (und vice

versa). Dieser Ausgleich der durchgeführten Drehbewegungen wird durch die sogenannte *Turn Kompensation* vermittelt (Strauss und Pichler, 1998). Entfällt auch die *Turn Kompensation*, so zeigen Mutanten nur noch 50 % positive Entscheidungen auf die Position der ersten Landmarke.

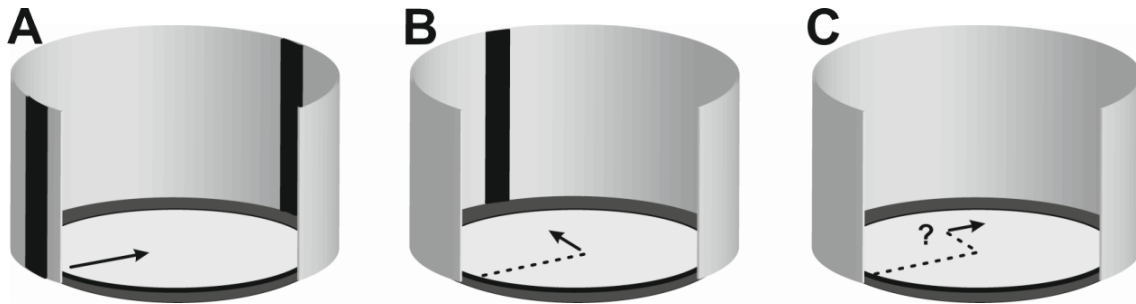


Abb. 7: Aufbau des *Detour-Paradigmas*. (A) In einer LED-Arena werden einer Fliege zwei gegenüberliegende Balken präsentiert, welche zwei attraktive Landmarken für die Fliege darstellen. Läuft das Versuchstier auf einen der Balken zu und erreicht dabei eine imaginäre Mittellinie, (B) so werden die Balken ausgeblendet und es erscheint ein Ablenkbalken im 90° Winkel, auf den die Fliege nun zusteuert. (C) Auch dieser Ablenkbalken verschwindet nach einer Sekunde, so dass keine visuellen Reize mehr in der Arena sind. Die Orientierung der Fliege auf die initiale Landmarke (positive Wahl) oder auf den Ablenkbalken wird ausgewertet.

2.2.1. Pharmakologische Behandlung

Es wurden jeweils zwei parallele Versuchsgruppen getestet. Eine Kontrollgruppe wurde ausschließlich auf ein Saccharose-haltiges Medium gesetzt (4 % Saccharose in 50 mM Tris pH 8.0), während die Kontrollgruppe zusätzlich zu diesem Medium die pharmakologische Substanz verabreicht bekommen hat. Alle Fliegen wurden naiv im *Detour-Paradigma* getestet und nach der Inkubationszeit auf dem jeweiligen Medium erneut im *Detour-Paradigma* auf ihr Orientierungsgedächtnis überprüft. Die Versuchstiere wurden selektiert: Es wurde nur mit CS Fliegen weitergearbeitet, die im ersten Messdurchgang eine Gedächtnisleistung von 80 % zeigten. Ebenso wurde mit den Mutanten verfahren, welche nur ausgewählt wurden, wenn sie ein defektes Gedächtnis < 70 % positive Wahlen für das ursprüngliche Objekt zeigten. Die Experimente wurden kodiert durchgeführt, so dass der Experimentator nicht wusste, welche Gruppe auf dem Kontroll- bzw. experimentellen Medium saß. Für Experimente, bei denen die Inkubationszeit auf dem Inhibitor weniger als 24 h betrug, wurden die Fliegen in einem leeren Röhrchen etwa 16 h vorgehungert und vorgedurstet, um die anschließende Flüssigkeitsaufnahme mit dem Inhibitor zu erhöhen. Zusätzlich wurde der Wassergraben in der *Detour-Arena* mit einer Chinin-Lösung versetzt, um

frühzeitiges Trinken der gedursteten Fliege zu unterbinden und die gezielte Flüssigkeitsaufnahme mit dem Inhibitor zu fördern.

Nachdem die Fliegen naiv im *Detour*-Paradigma getestet wurden, wurden sie einzeln in ein 2 ml Eppendorfgefäß gesetzt. Die Eppendorfgefäße wurden am Deckel mit einem kleinen Loch zur Sauerstoffversorgung versehen und enthielten am Boden 10 µl des Mediums. Die Gefäße mit den Fliegen wurden für die Inkubationszeit waagrecht auf 25 °C gehalten. Dasselbe Tier wurde nach der Inkubationszeit erneut im *Detour*-Paradigma getestet. Zusätzlich wurden die verabreichten Medien mit dem blauen Farbstoff Patentblau versetzt. Dieser diente als grober Indikator, ob eine Fliege das verfütterte Medium aufgenommen hatte, was an einer Blaufärbung des Abdomens beobachtet werden konnte.

Die Details aller verwendeten pharmakologischen Substanzen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Chemikalienliste für die pharmakologische Behandlung.

Name	Ziel	Firma CAS	Konzentration	Inkubation	Vergleichsstudie	Stammlösung
N-Acetyl-L-Cystein	Substrat für CBS/CSE	Sigma 616-91-1	20 mM	24 h	Paul et al., 2014	20 mM in Tris pH 8.0
N _ω -Nitro-L-Arginin (L-NNA)	NOS-Inhibitor	Sigma 2149-70-4	100 µM 10 µM	2 h 30 min 5 min 5 min	Müller, 1996	10 mM in 90 % EtOH/ 10 % H ₂ O
Rp-cAMPS	PKA-Inhibitor	Santa Cruz 151837-09-1	200 µM 100 µM 50 µM 10 µM	2 h 30 min 5 min 5 min 5 min	Moore et al., 1998	10 mM in 100 % H ₂ O
Zaprinast	PDE V/VI-Inhibitor	Sigma 37762-06-4	100µM	24 h	Fuse und Truman, 2002; Day, 2005	10 mM in 100 % EtOH
Patentblau V Soidum Salz		Sigma 20262-76-4				

2.3. Das *Buridan*-Paradigma

Das *Buridan*-Paradigma dient der Quantifizierung des Lauf- und Orientierungsverhaltens auf Landmarken (Bülthoff et al., 1992; Götz, 1980). Alle Tiere wurden im Alter von 3 bis 5 Tagen getestet. Mindestens einen Tag vor Beginn der Tests wurden den Versuchstieren unter Kälteanästhesie bei 4° C die Flügel mit einer Mikroschere auf etwa ein Drittel gekürzt und 20 Minuten vor dem Experiment wurden die Tiere in ein Glas mit feuchtem Filterpapier gesetzt. Verschiedene Genotypen wurden möglichst alternierend gemessen, um Einflüsse von Temperatur-, Tageszeit- oder Luftfeuchtigkeitsschwankungen zu minimieren.

Die Arena bestand aus einem gleichmäßig beleuchteten Zylinder mit einer Höhe von 16 cm, in der sich eine Plattform mit einem Durchmesser von 8,7 cm befand. Die Fliege konnte sich frei auf der Plattform, welche von einem Wassergraben umgeben war, bewegen (Abb. 8). Im 180° Winkel zueinander befanden sich zwei 2 cm breite, schwarze Balken, die als Landmarken bezeichnet werden und durch den abgrenzenden Wassergraben für die Fliege unerreichbar waren. Die Landmarken hatten einen Abstand von 9 cm zum Mittelpunkt der Arena. Das Paradigma nutzt die Eigenschaft, dass Fliegen dunkle Objekte in einer hellen Umgebung ansteuern. Sind diese Objekte nicht zu erreichen, zeigen wildtypische Fliegen einen ständigen Wechsel zwischen Fixation und Anti-Fixation, so dass sie stundenlang zwischen den beiden Landmarken hin- und herpendeln (Götz, 1980).

Die Laufspuren und -daten der Versuchstiere wurden mit Hilfe einer Kamera (CCD-Kamera 1-89, Kappa) aufgezeichnet. Die Messzeit betrug 900 s. Mit den Programmen „buri2.exe“ und „Buridan070209.exe“ (T. Triphan und R. Strauss) wurden die Daten ausgewertet. Es wurden die Orientierung der Fliege auf die Landmarke, die Laufgeschwindigkeit, die gesamte Laufstrecke und die Aktivität berechnet.

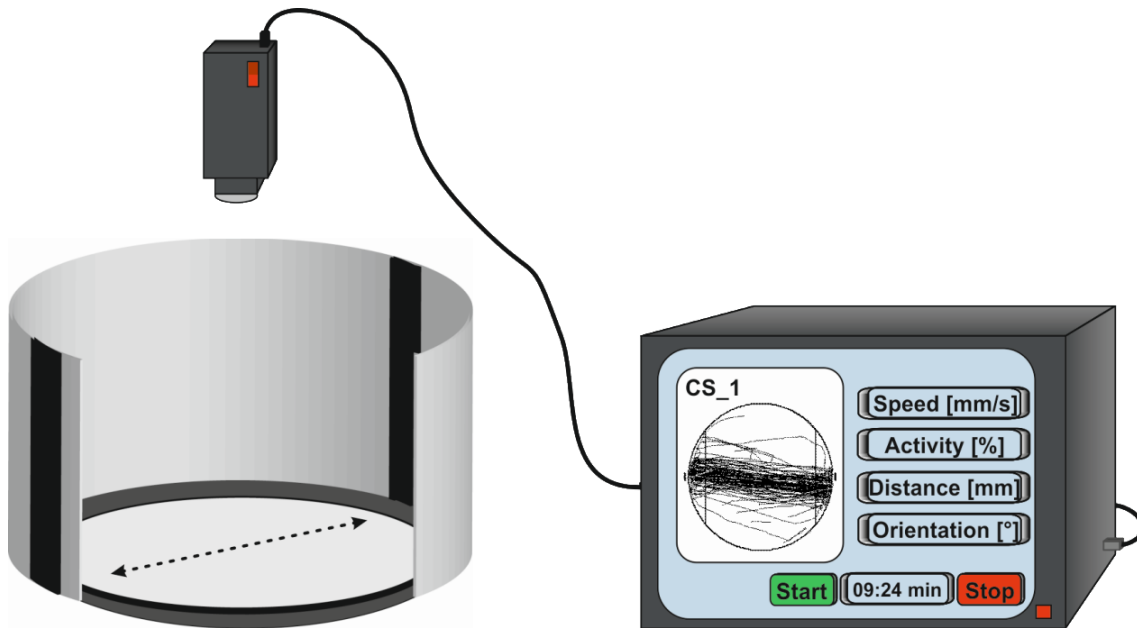


Abb. 8: Schematischer Versuchsaufbau des *Buridan-Paradigmas*. Die Fliege kann sich auf einer Plattform, die von einem Wassergraben umgeben ist, frei bewegen. Auf einem hell-erleuchteten Hintergrund werden der Fliege zwei gegenüberliegende schwarze Balken präsentiert. Das Lauf- und Orientierungsverhalten der Fliege wird für 15 min von einer Kamera aufgezeichnet und anschließend ausgewertet.

2.4. Histologie – Ganzpräparate (*Whole-Mounts*) von Gehirnen

Die Fliegen wurden mit CO₂ oder mit Hilfe von Kälte anästhesiert und kurz in 70 % Ethanol auf Eis gekühlt. Anschließend wurde in eisgekühltem PBS (Phosphatpufferlösung) mit Dumont-Feinpinzetten das Gehirn herauspräpariert. Die Gehirne wurden in einer frischen 4 % Paraformaldehyd (PFA)/(PBS)-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler fixiert. Anschließend wurden die Gehirne weitere 30 min in 4 % PFA + 0.15 % PBTx (PBS mit Triton X100-Anteil) fixiert. Nach der Fixierung wurde mehrfach mit PBTx gewaschen. Optional wurde bei allen anti-NOS Färbungen für eine bessere Permeabilisierung des Gewebes für 60 min bei 1% PBTx inkubiert und anschließend mit 0,5 % PBTx für 5 min gewaschen. Für das Blocken von unspezifischen Bindungsstellen wurde 4 % Pferdeserum (Vector Laboratories, S-2000) in 0,5 % PBTx für eine Stunde verwendet. Anschließend wurden die Gehirne über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper (Tab. 3) in 4 % Pferdeserum und mit 0,5 % PBTx versehen. Wurde die Antikörper-Verdünnung für eine weitere Färbung aufbewahrt, so wurde sie mit 0,1 % Natriumazid versehen. Nach der Inkubation des ersten Antikörpers wurde mit 0,5 % PBTx gewaschen und anschließend erneut für 30 min mit 4 % Pferdeserum in 0,5 % PBTx geblockt. Der zweite Antikörper (Tab. 3)

wurde ebenfalls mit 4 % Pferdeserum und 0,5 % PBTx versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Betrug die Inkubationszeit vom ersten bzw. zweiten Antikörper weniger als 24 h auf 4 °C, so wurden die Gehirne vor den Waschschritten weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation des zweiten Antikörpers wurden die Gehirne ebenfalls mit 0,5 % PBTx gewaschen. Zur Klärung der Präparate wurden sie über Nacht bei 4 °C in 50 % Glycerin/PBS inkubiert. Abschließend wurden die Gehirne auf Objektträger in Vectashield (Vector/Linaris) eingedeckelt und mit Nagellack fixiert. Als Abstandshalter wurden ~1 mm dicke Deckgläschen verwendet. Die Präparate wurden kühl gelagert. Der Tabelle 3 sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper zu entnehmen.

Tab. 3: Auflistung der primären und sekundären Antikörper, die für die histologischen Präparate verwendet wurden.

Antikörper	Wirtstier	Firma + Katalognummer	Verdünnung	PBTx
primäre Antikörper				
anti-GFP	Huhn	Aves Labs # GFP-1020	1:2000	0,3 % PBTx 0,5 % PBTx
anti-NOS	Kaninchen	O'Farrell	1:200	0,5 % PBTx
anti-FasciclinII	Maus	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) Iowa #1D4	1:200	0,5 % PBTx
sekundäre Antikörper				
anti-rabbit Cy3	Ziege	Jackson Immuno Research #111-165-003	1:1000	entsprechend des ersten Antikörpers
anti-rabbit A488	Ziege	Invitrogen #A11034	1:1000	
anti-mouse Cy3	Ziege	Jackson Immuno Research #115-165-003	1:1000	
anti-mouse A488	Ziege	Sigma #62197	1:1000	
anti-chicken A488	Ziege	Invitrogen #A11039	1:1000	

Die Präparate wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS SP8 der Firma Leica analysiert. Es wurde mit einer Frequenz von 400-600 Hz gescannt, ein Bildformat von 1024x1024 und eine Scan-Wiederholung der jeweiligen Schicht von 3 gewählt. Die Bildbearbeitung bzw. Quantifizierung erfolgte mit der dazugehörigen Software „LAS AF“, sowie den Programmen „Image J“ und „Photoshop CS5“. Bei Quantifizierungen wurden sowohl die Laserstärke als auch die weitere Verstärkung des Signals gleich gewählt und für alle zu vergleichenden Präparate beibehalten. Für die

Quantifizierung eines Bilderstapels einer z-Projektion (*stack*) wurden die Graustufen aller Pixel eines Voxels aufsummiert und anschließend wurden die Mittelwerte aller Voxel innerhalb der festgelegten Region (*Region of interest*) miteinander verglichen. Die Präparate wurden mit den Objektiven 10x, 40x oder 63x und einer optischen Schichtdicke von 300 oder 750 nm aufgenommen.

2.5. Western Blot

Für die Extraktion der Proteine wurden ausschließlich die Köpfe der Fliegen verwendet. Die Tiere wurden bei -20 °C oder -80 °C eingefroren. Die Köpfe wurden auf einem eisgekühlten Metallblock mit einer Rasierklinge entfernt, mit einer Nadel in ein Eppendorfgesäß überführt und anschließend auf Eis gekühlt. Die Anzahl der Köpfe pro Probe variierte in den verschiedenen Versuchen und kann der Beschreibung der einzelnen Blots entnommen werden. Die Köpfe wurden mit einem kleinen Plastikstößel in Cracking Buffer zerkleinert, bis keine größeren Chitinstrukturen mehr zu erkennen waren. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 95 °C erhitzt und dann bei 14000 U/min für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt und ggf. bei -20 °C weggefroren oder direkt auf das Gel geladen. Falls die Proben bei -20 °C gelagert wurden, wurden sie vor dem Beladen des Gels erneut für 5 min bei 50 °C inkubiert.

Es wurden Polyacrylamidgele im Format 10 x 10 cm verwendet (Tab. 4). Die Gele wurden mit der spezifischen Probenmenge beladen. Als Marker wurde eine Protein-Leiter von Thermo Scientific (#26619) benutzt und *Laemmli*-Puffer wurde während der Gelelektrophorese als Laufpuffer verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Ampèrezahl von 6-15 mA durchgeführt. Anschließend wurde das Gel kurz in ddH₂O gewaschen, für einige Minuten im Transferpuffer equilibriert und anschließend mit Filterpapier und der *PVDF-Blotting*-Membran (PeqLab, #39-4010) gestapelt. Der Transfer wurde bei konstanten 900 mA für 1 – 2 h (je nach Größe des fokussierten Proteins) auf 4 °C im *Towbin*-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde die Membran kurz in ddH₂O gewaschen und mit 0,5 % Ponceau/5 % Essigsäure die Proteinbanden angefärbt, um die Homogenität bzw. die Qualität des Transfers zu beurteilen. Die Membran wurde in ddH₂O entfärbt und zuerst kurz mit TBS (*Tris-buffered Saline*) und anschließend mit TBST gewaschen. Vor der Inkubation mit Antikörpern wurde die Membran mit 5 % Milchpulver/TBST für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die ersten Antikörper (Tab. 5) wurden ebenfalls

in einer 5 % Milchpulver/TBST-Lösung verdünnt und bei 4 °C über Nacht oder mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut mit TBST gewaschen und der zweite Antikörper (Tab. 5) wurde ebenfalls bei 4 °C über Nacht oder mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver/TBST inkubiert. Nach der Inkubation wurde ebenfalls mit TBST gewaschen. Zur Visualisierung und Detektion wurde das Chemilumineszenz-Peroxidase Substrat von Sigma (CPS160) verwendet. Die Membran wurde mit der Lösung 5 min bei Dunkelheit inkubiert und dann direkt mit dem Kamerasystem von Peqlab (Fusion SL 4.2MP) und der dazugehörigen Software „Fusion“ aufgenommen. Die Bearbeitung und Quantifizierung erfolgte mit der Software „BIO1D“, ebenfalls von Peqlab.

Tab. 4: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

Trenngel	6 %	10 %
30% Acryl/0.8% Bisacrylamid (37.5/1)	8,0 ml	13,3 ml
ddH ₂ O	16,6 ml	11,3 ml
1M Tris (pH 8.8); 0.4% SDS	15 ml	
Ammoniumpersulfat 10%	300 µl	
TEMED	30 µl	
Sammelgel		
30% Acryl/0.8% Bisacrylamid (37.5/1)	2,0 ml	
ddH ₂ O	5,5 ml	
0.5 M Tris (pH 6.8); 0.4% SDS	2,4 ml	
Ammoniumpersulfat 10%	200 µl	
TEMED	20 µl	

Tab. 5: Auflistung der primären und sekundären Antikörper, die für die immunochemischen Färbungen der *Western Blots* verwendet wurden.

Antikörper	Wirtstier	Firma + Katalognummer	Verdünnung
primäre Antikörper			
anti-NOS	Kaninchen	Patrick O'Farrell, UCSF	1:200
anti-CBS	Kaninchen	Santa Cruz #67154	1:100
anti-P~CREB (1893-5)	Kaninchen	Jerry Yin, UW Madison	1:500
anti-CREB (ATG2)	Kaninchen	Jerry Yin, UW Madison	1:1000
anti-Aktin	Maus	DSHB Iowa JLA*20	1:1000
anti-HSP90	Kaninchen	Cell Signaling #4874	1:1000
sekundäre Antikörper			
anti-rabbit-HRP	Ziege	Sigma #A9169	1:10.000
anti-mouse HRP	Kaninchen	Sigma #A9044	1:10.000

2.6. Messung der Enzymaktivität in nativen Gelen

Die Extraktion der Proteine erfolgte bei Temperaturen zwischen 0° – 4 °C, um auf der einen Seite Schädigungen der Funktionalität der Enzyme und auf der anderen Seite den Angriff durch Proteasen zu vermeiden. Die gewünschte Anzahl der Fliegen wurde mit CO₂ narkotisiert und in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Anschließend wurde mit einem Extraktionspuffer und einem Plastikstößel ein Homogenat erzeugt. Grobe Zell- und Chitinreste wurden bei 4 °C abzentrifugiert und anschließend sofort auf das native Gel aufgetragen, ohne die Probe zu erhitzen. Es wurden sowohl 8 als auch 10 % ige Gele verwendet (Tab. 6). Sowohl die Gele als auch der Laufpuffer enthielten kein SDS, um die Sekundärstruktur und damit die Funktionalität der Enzyme nicht zu zerstören. Die Gele wurden unter moderaten Bedingungen von konstanten 10 mA für etwa 4 h gefahren. Um einer möglichen Erhitzung entgegenzuwirken, wurden Kühlelemente um die Apparatur aufgebaut. Das fertige Gel wurde kurz in ddH₂O gewaschen und anschließend bei 37 °C in der Visualisierungslösung (Tab. 7; Kapitel 2.10) inkubiert. Die Visualisierungslösung wurde bereits über Nacht bei 37 °C angesetzt, um die Lösung von Bismuth(III)-chlorid zu erleichtern. L-Cystein und L-Homocystein wurden erst kurz vor der Inkubation des Gels frisch hinzugegeben und anschließend wieder auf -20 °C weggefroren, um die Stabilität der Aminosäuren zu gewährleisten. Cystathionin-β-Synthase (CBS) und Cystathionine-γ-Lyase (CSE) wandeln die Aminosäuren L-Cystein und L-Homocystein, welche sich in der Visualisierungslösung befanden, um. Das dabei entstehende Schwefelwasserstoff (H₂S) reagiert mit

Bismuthtrichlorid zu Bismuthtrisulfid, was als brauner Farbstoff zu sehen ist und somit als indirekter Indikator für die Enzymaktivität gilt.

Die Gele wurden mehrere Stunden bis zu 24 h inkubiert und es wurden regelmäßig Aufnahmen mit unterschiedlichen Kamerasystemen (Intas Kamerasystem; Peqlab Fusion SL 4.2MP; Panasonic Lumix DMC-TZ10) gemacht. Für die Fotoaufnahmen wurde das Gel auf eine Glasplatte platziert, welche wiederum auf eine LED-Leuchtplatte (Roth) gelegt wurde. Die Beleuchtung von unten erhöhte den Kontrast der Banden. Die Gele wurden mit Ponceau S oder Brilliant Blue S gefärbt, um das gleichmäßige Laden des Gels zu beurteilen. Mit ddH₂O bzw. mit 10 % Essigsäure/30 % EtOH wurden die Gele wieder entfärbt. Die Färbungen waren jedoch für eine Quantifizierung der geladenen Proteinmenge unzureichend.

Tab. 6: Zusammensetzung der nativen Gele.

Trenngel	8 %	10 %
30% Acryl/0.8% Bisacrylamid (37.5/1)	5,2 ml	6,8 ml
1M Tris-HCl (pH 8.8)	5,4 ml	4,8 ml
ddH ₂ O	9,8 ml	8,2 ml
Ammoniumpersulfat 10%	200 µl	
TEMED	20 µl	
Sammelgel		
30% Acryl/0.8% Bisacrylamid (37.5/1)	0,7 ml	
ddH ₂ O	2,7 ml	
1 M Tris-HCl (pH 8.8)	1,6 ml	
Ammoniumpersulfat 10%	50 µl	
TEMED	5 µl	

Tab. 7: Chemikalienliste für die Durchführung der Aktivitätsbestimmung der Enzyme CBS und CSE.

Name	CAS	Firma
Bismuth(III)-chlorid	7787-60-2	Sigma
Brilliant Blue S	6104-59-2	Sigma
Triethanolamine	102-71-6	Sigma
Pyridoxal 5'-phosphat (PLP)	853645-22-4	Sigma
L-Cystein	52-90-4	Sigma
L-Homocystein	6027-13-0	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail P8340		Sigma
Ponceau S	6226-79-5	Sigma

2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die DNA-Extraktion wurden 20 Fliegen bei -20°C weggefroren. Eine Fliege enthält etwa 300 ng genomische DNA (gDNA), so dass ein Extraktionsansatz ca. 6 μg DNA enthielt. Für den Gewebeaufschluss wurden die Fliegen mit 500 μg Homogenisierungspuffer versetzt und mit einem Plastikstößel zerdrückt. Anschließend wurden für 30 min bei 68°C die Proteine denaturiert. Unter Zugabe von 65 μl 8 M Kaliumacetat wurden die Proben für 30 min auf Eis gestellt, so dass die denaturierten Proteine ausfielen. Abschließend wurden die Proben zweimal für 10 min bei 14000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Mit 900 μl 100 % igem Ethanol wurde der Überstand gemixt und die DNA für etwa 10 min auf Eis gefällt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Ethanol abgezogen. Die DNA wurde nochmal mit 750 μl 70 % igem Ethanol gewaschen, um die Salze des Homogenisierungspuffers herauszuwaschen. Abermals wurde abzentrifugiert, das Ethanol entfernt und das DNA-Pellet getrocknet, bis das gesamte Ethanol abgedampft war. Das Pellet wurde schließlich in 60 μl TE-Puffer gelöst und ggf. auf -20°C weggefroren. Die Probe enthielt somit etwa 100 ng gDNA/ μl .

Der Reaktionsansatz für die PCR wurde, soweit möglich, als Master Mix pipettiert und anschließend auf die 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Reaktion setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 3 μl gDNA (~60 ng), 2 μl Nukleosidtriphosphate (dNTPs; 10 mM), je 3 μl 3'Primer und 5'Primer (je 5 μM), 5 μl PCR PufferY (Peqlab), 0,5 μl Taq-Polymerase (5U/ μl ; Peqlab) und anschließend ddH₂O, um auf ein Reaktionsvolumen von 50 μl aufzufüllen. Die spezifischen Reaktionsbedingungen wurden in dem ThermoCycler (Peqlab, 96 Universal Gradient) programmiert und ein individuelles

Programm, welches auf die Primer- und Produktbedingungen angepasst wurde, gestartet. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Reaktionsgefäße mit 10 µl 5x Stopp- und Ladepuffer von Roth (+5 % SDS) versetzt und die Proben bei 4 °C gelagert. Zur Visualisierung wurden die Proben auf ein 1 % iges Agarosegel aufgetragen und in TBE-Puffer in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Parallel wurde eine DNA-Leiter (1 kb DNA-Leiter, Invitrogen) zur Größenorientierung aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Färbung der DNA-Banden mit Ethidiumbromid. Mit Hilfe einer UV-Quelle und einer CCD-Kamera (Intas) konnten die Banden visualisiert und mit Hilfe der dazugehörigen Software „Intas GDS Capture-Software“ dokumentiert werden.

Für den Nachweis der Deletion der *ign*^{58/1} Mutante wurde das Primerpaar *ign64_for* und *5664_lac_rev* gewählt (Tab. 12). Die Aufbereitung der DNA erfolgte ohne RNA-Verdau und ohne Phenolisierung. Die PCR-Reaktion wurde mit dem ThermoCycler (Peqlab, 96 Universal Gradient) und mit dem Programm 9 (Tab. 8) durchgeführt.

Tab. 8: PCR-Programm für den Nachweis der *ign*^{58/1} Deletion.

Programm 9	Zyklen	
initiale Denaturierung	1 x	10 min 95°C
Denaturierung, Anlagerung, Elongation	35 x	[1 min 95°C; 1 min 52°C; 2 min 72°C]
Denaturierung, Anlagerung, Amplifizierung	1 x	[1 min 95°C; 1 min 52°C; 10 min 72°C]
Aufbewahrung		∞ 4 °C

2.8. Inverse PCR (iPCR)

Die Extraktion der DNA erfolgte wie in Kapitel 2.7 beschrieben. Im Anschluss erfolgte jedoch ein RNA-Verdau und eine Phenolisierung zur Aufreinigung der DNA. Der Reaktionsansatz für den RNA-Verdau bestand aus 20 µl DNA-Lösung, was etwa einer Menge von 2 µg DNA entsprach, 5 µl des entsprechenden 10x Reaktionspuffers (REACT2; Invitrogen) und 1 µl RNase A (10 mg/ml; Invitrogen). Zusätzlich wurden dem Ansatz spezifische Reaktionsenzyme zugefügt. Es wurde mit MboI (10 U/µl; Invitrogen) und Rsa (10 U/µl; Invitrogen) gearbeitet. Mit ddH₂O wurde auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl aufgefüllt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 30 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 220 µl ddH₂O gestoppt. Vor dem Ansetzen der PCR wurde die DNA zusätzlich durch eine Phenolisierung aufgereinigt. Zweimal wurde ein Gemisch aus Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol mit der Probe

vermischt, anschließend gut gemischt und abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthält die DNA und wurde somit abgenommen und in einem neuen Eppendorfgefäß mit Ethanol für mindestens 30 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Anschließend wurde das Ethanol entfernt, das Pellet getrocknet und in $100\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\times$ TE gelöst, so dass in etwa eine DNA-Konzentration von $20\text{ ng}/\mu\text{l}$ vorlag.

Anschließend wurde die Selbstligation angesetzt, um einen Ringschluss der erzeugten DNA-Bruchstücke zu erzielen. Der Reaktionsansatz enthielt $20\text{ }\mu\text{l}$ DNA-Lösung ($=2\text{ }\mu\text{g}$ DNA), $40\text{ }\mu\text{l}$ $5\times$ T4-Ligase-Puffer (Invitrogen), $1\text{ }\mu\text{l}$ T4 DNA-Ligase ($1\text{ U}/\mu\text{l}$; Invitrogen) und wurde mit ddH_2O auf ein Reaktionsvolumen von $200\text{ }\mu\text{l}$ aufgefüllt. Die Inkubationszeit erfolgte über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und wurde am nächsten Tag bei erneuter Zugabe von $1\text{ }\mu\text{l}$ Ligase bei Raumtemperatur für eine Stunde fortgesetzt. Die Reaktion wurde mit $30\text{ }\mu\text{l}$ 3 M Natriumacetat ($\text{pH } 5.3$) gestoppt. Durch Zugabe von 100% igem Ethanol wurde die DNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine Stunde gefällt, anschließend mit 70% igem Ethanol von Salzen freigeswaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in $100\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\times$ TE gelöst und enthielt damit etwa eine DNA-Konzentration von ca. $20\text{ ng}/\mu\text{l}$.

Zur Identifizierung der vorhandenen P-Elemente für die Rekombinanten UAS-*Pka-C3+Pka_{C3}^{BRL}* und *189Y+homer^{EP2141}* wurde die Primer EY.3for und EY.3rev (Tab. 12), sowie das Programm 4 (Tab. 9) verwendet. Die Rekombinante UAS-*dSrf+dMrtf* wurde ebenfalls mit Hilfe der inversen PCR verifiziert. Hier wurden ebenfalls die Primer EY.3for und EY.3rev (Tab. 12) verwendet, jedoch das Programm 14 (Tab. 9) benutzt.

Aus experimentellen Gründen sollte eine Rekombinante aus *ign^{58/1}* und UAS-*ign* erzeugt werden. Dafür wurde zuerst das UAS-*ign* Konstrukt mobilisiert und verschiedene Insertionen auf dem X-Chromosom ausgewählt. Anschließend wurde mit inverser PCR deren Integrationsort auf dem Chromosom bestimmt, um einen geeigneten Kandidaten, der möglichst viele Centimorgan vom Genlocus von *ign* entfernt lag, für die Rekombination zu finden. Diese iPCR wurde ebenfalls mit den Primern EY.3for und EY.3rev (Tab. 12) und dem Programm 11 durchgeführt (Tab. 9). Die PCR-Fragmente der Linien UAS-*ign²⁻¹* und UAS-*ign¹²⁻²* wurden mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen aufgereinigt und anschließend von der Firma Eurofins sequenziert.

Tab. 9: PCR-Programme für die iPCR.

Programm 4	Zyklen	
initiale Denaturierung	1 x	10 min 95°C
Denaturierung, Anlagerung, Elongation	35 x	[30 sec 95°C; 1 min 53°C; 2 min 72°C]
Amplifizierung	1 x	10 min 72°C
Aufbewahrung		∞ 4 °C
Programm 11		
initiale Denaturierung	1 x	10 min 95°C
Denaturierung, Anlagerung, Elongation	35 x	[1 min 95°C; 30 sec 50°C; 2 min 72°C]
Aufbewahrung		∞ 4 °C
Programm 14		
initiale Denaturierung	1 x	10 min 95°C
Denaturierung, Anlagerung, Elongation	24 x	[30 sec 95°C; 30 sec 60°C; 1 min 72°C]
Aufbewahrung		∞ 4 °C

2.9. Quantitative PCR auf Basis der reversen Transkription (RT-qPCR)

Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem „Quick-RNA-Mirco-Prep“ von Zymo Research. Es wurden fünf Köpfe mit 300 µl Lysispuffer versetzt und anschließend entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und extrahiert. Die Extraktion beinhaltete einen DNA-Verdau auf der Säule. Eluiert wurde mit 6 µl DNA/RNA-freiem-H₂O und anschließend wurde die Konzentration und der Reinheitsgrad per *Nano-DROP*-Spektralphotometer (ThermoScientific) bestimmt. Die reverse Transkription erfolgte mit dem „iSkript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR“ von Biorad und es wurden 400 ng RNA per Genotyp und Reaktion eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl.

Die RT-qPCR wurde mit dem „iTaQ Universal SYBR Green Supermix“ Kit von Biorad durchgeführt. Es wurden pro Reaktion (Tab. 10) jeweils drei technische Replikate erstellt. Die Triplikate wurden für jede Kombination der Genotypen (c155 vs. c155>UAS-*dSrf*+*dMrtf*) mit den gewünschten Primerpaaren (*rp49* als Kontrollgen und *Cbs*, *Cse*, *Nos* als Zielgene) angesetzt. Die Sequenzen der Primer sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl. Die cDNAs bzw. die Primer und der SYBR Green Super Mix wurden als Master Mix angesetzt. Außerdem wurde als Negativkontrolle bzw. –wert ein Reaktionsansatz ohne cDNA angesetzt (*non-template control*). Anschließend wurden die Reaktionen auf eine 96-Well Platte (Biorad) pipettiert und mit dem ABI StepOnePlus System (Applied Bio Systems) analysiert. Mit

der dazugehörigen Software „StepOne v2.3“ wurde das Standardprogramm (Tab. 11) gewählt und die Daten ausgewertet.

Tab. 10: Zusammensetzung der PCR-Reaktionen für die RT-qPCR.

Komponente	Endkonzentration
iTaq Universal SYBR Green supermix (2x)	1 x
Primer forward (10 µM)	450 nM
Primer reverse (10 µM)	450 nM
cDNA	14 ng/10 µl

Tab. 11: PCR-Programm für die RT-qPCR.

Programm RT-qPCR	Zyklen	
initiale Denaturierung	1 x	20 sec 95°C
Denaturierung, Anlagerung/Elongation/ <i>Plate Read</i>	40 x	[3 sec 95°C; 30 sec 60°C]
Aufbewahrung		∞ 4 °C

Tab. 12: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Primer	Sequenz (5'-3')	Konz. [µM]	Produktlänge	T [°C]
ign64_for (ign_for)	GGG GAA TTT AGT CGA GAG TTG G	5	~ 500 bp	65
5664_lac_rev ign(rev)	AGG CAA GGG CAT TCA GCA GGG TC	5		75
EY.3for	CCT TTC ACT CGC ACT TAT TG	5	variabel, iPCR	60
EY.3rev	GTG AGA CAG CGA TAT GAT TGT	5		59
rp49jnc2_for	TAA GCT GTC GCA CAA ATG GC	10	101 bp	59
rp49jnc2_rev	TCG ATC CGT AAC CGA TGT TGG	10		60
CBS_for11	GAG GCT ATT GCC CTG ATG AAG	10	114 bp	59
CBS_rev11	CAC GAT CTG CGT GAT CAG CGT	10		63
CSE_for11	CAT GGA GTA CGC GAG GAT ATC	10	114 bp	58
CSE_rev11	GTA CTT GGT CAG GGA GTA GCA	10		59
Nos_for7	GAC CGA GTT TTT CTC GCT CTG	10	108 bp	59
Nos_rev7	CTC CTG GAC AAT CAA CTG GTA	10		57

2.10. Lösungen und Chemikalien

Standardchemikalien wurden von den Firmen AppliChem und Roth bezogen.

PBS

130 mM NaCl

7 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

3 mM NaH₂PO₄ x H₂O

PBT

PBS + (0,1 % Triton X100) entspricht 0,1 % PBTx

PBS + (0,5 % Triton X100) entspricht 0,5 % PBTx

TBS(T):

0,1 M Tris (pH 8.0)

150 mM NaCl

(0,1 % Tween-20)

Cracking Buffer (*Western Blot*):

0,01 M NaPO₄ Puffer (pH 7.2)

1% β-Mercaptoethanol

1% SDS

6M Urea

0,01% Bromphenolblau

Gelelektrophorese-Puffer (*Laemmli*-Puffer):

0,25 M Tris

1,92 M Glycin

0,1 % SDS

Transfer Puffer (*Towbin*-Puffer):

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % Methanol

Homogenisierungspuffer (DNA-Extraktion)

100 mM NaCl
100 mM Tris (pH 8)
50 mM EDTA (pH 8)
0,5% SDS

TE-Puffer

1 M Tris (pH 8.0)
0,5 M EDTA

TBE-Puffer

50 mM Tris (pH 8.0)
50 mM Borat
2,5 mM EDTA

Extraktionspuffer (Enzymaktivität im nativen Gel)

62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8)
25% Glycerin
0,02% Bromphenolblau
1:50 Protease Inhibitor Cocktail P8340

Laufpuffer (Natives Gel)

25 mM Tris
192 mM Glycin

Visualisierungslösung (Enzymaktivität im nativen Gel)

100 mM Triethanolamine HCl (pH 7.6)
10 µM Pyridoxal 5'-phosphate (PLP)
0,5 mM Bismuttrichlorid (Löslichkeitsproblem: daher eine Messerspitze pro 100 ml)
10 mM EDTA
5 mM L-Cystein
100 µM L-Homocystein

2.11. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen „Office Excel 2010“ der Microsoft Corporation, „Sigma Plot 11.0“ der Firma Systat Software Incorporation und „Statistika 8“ der Firma StatSoft. Die graphische Aufbereitung der Darstellungen erfolgte mit den Programmen „Corel Draw X6“ der Microsoft Corporation und „Photoshop CS5“ von Adobe.

Für den Test auf Normalverteilung wurde der *Shapiro-Wilk*-Test mit einem auf $\alpha = 0,05$ festgelegtem Signifikanzniveau verwendet. Waren die Datensätze normalverteilt, wurden parametrische Tests angewandt. Für den Vergleich von zwei Datensätzen wurde der *t*-Test gewählt. Wurden dieselben Tiere vor und nach einer Behandlung gemessen, wurde der *gepaarte-t*-Test benutzt. Für einen multiplen Vergleich wurde mit einer *One-way-ANOVA* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur analysiert. Waren die Daten nicht-normalverteilt, so wurde der nicht-parametrische *Mann-Whitney-U*-Test für den Vergleich zweier Stichproben benutzt. Für den paarweisen Vergleich nicht-parametrischer Daten wurde der *Wilcoxon-Matched-Pairs*-Test gewählt. Die Analyse von multiplen Datensätzen wurde mit der *Kruskal-Wallis-ANOVA* und einer *Bonferroni*-Korrektur durchgeführt. Die statistische Analyse im *Detour*-Paradigma gegen das Zufallsniveau von 58 % wurde bei normalverteilten Daten mit dem *Einseitigen-t*-Test (*single-t*-Test) analysiert. Waren die Daten nicht-normalverteilt, so wurden diese mit Hilfe des *Einseitigen-Vorzeichen*-Tests (*Sign*-Test) analysiert. Dieser Vorzeichentest wurde in Statistika wie im Benutzerhandbuch beschrieben durchgeführt (Weiß, 2005).

Es sind folgende Signifikanzwerte (p-Werte) zur Ablehnung der jeweiligen Nullhypothese in den Grafiken abgebildet: $p < 0,05$ (signifikant verschieden, *), $p < 0,01$ (hoch signifikant verschieden, **) und $p < 0,001$ (höchst signifikant verschieden, ***). Konnte kein signifikanter Unterschied zwischen zwei Datensätzen gefunden werden, so wurde dies als nicht signifikant (n.s.; $p > 0,05$) bezeichnet und die jeweilige Nullhypothese der Gleichheit angenommen.

Die Mittelwerte sind in der graphischen Darstellung mit Standardfehler (\pm) angegeben. Die Medianwerte werden innerhalb eines *Box-Plots* als Querstrich dargestellt und der Wert wird als Zahl zusätzlich vermerkt. Die Box zeigt den Inter-Quartils-Abstand vom zweiten bis zum dritten Quartil (25 %- und 75 %-Quartil), die *Whiskers* der Boxen stellen die 10- bzw. 90 %-Perzentile der Datensätze dar. Rechts neben jeder Box ist der statistische Vergleich zum Zufallsniveau von 58 % angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Der Einfluss der Proteinkinase G auf das Orientierungsgedächtnis

Zur Identifikation der Signalwege, welche das Orientierungsgedächtnis von *Drosophila* ermöglichen, wurde eine Analyse möglicher biochemischer Komponenten durchgeführt. Das *foraging* (*for*) Gen wurde ausgewählt, da sowohl mutante Larven, als auch adulte Fliegen in assoziativen, olfaktorischen Lern- und Gedächtnisparadigmen einen Defekt aufweisen (Kaun et al., 2007; Mery et al., 2007). Außerdem wurde FOR in den Ringneuronen des Ellipsoidkörpers nachgewiesen (Belay et al., 2007). *for* kodiert für eine von zwei bei *Drosophila* existierenden cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG; Kalderon und Rubin, 1988). Für dieses Gen existieren zwei natürliche Allele - ein dominantes Allel, welches *Rover* (*for^R*) genannt wird und das rezessive Allel *sitter* (*for^s*). In Kopfextrakten der Fliegen wurde zwischen den beiden Allelen ein Unterschied von 10 % in der gesamten PKG-Aktivität gemessen (Osborne et al., 1997).

Da die originalen *for^R* und *for^s* Stämme auf einem isogenen genetischen Hintergrund erzeugt wurden (de Belle und Sokolowski, 1987) und keine ausreichende Fokussierung auf Landmarken zeigen (Diplomarbeit Kuntz, 2010), wurde der genetische Hintergrund durch eine *Cantonisierung* ausgetauscht. Bei einer *Cantonisierung* bleibt das mutante Allel erhalten, während die restlichen Chromosomen gegen einen genetisch wildtypischen CS-Hintergrund ausgetauscht werden (de Belle und Heisenberg, 1996). Auf diese Weise wurde die genetische Variabilität und somit die Fitness der *for* Mutanten verbessert, ohne den *for* Genlocus zu beeinflussen. Anschließend wurden die beiden Allele auf ihr Orientierungsgedächtnis untersucht. Homozygote *for^R* Tiere weisen ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis auf und laufen, ebenso wie der Wildtyp CS, im Median zu 80 % auf ihr ursprüngliches Ziel zurück (Abb. 9). Tiere, die hingegen homozygot für das rezessive *for^s* Allel sind, haben kein Orientierungsgedächtnis, da sie nach einer Ablenkung im Median nur zu 60 % auf die alte Landmarke zurückkehren.

Es wurde ein weiteres rezessives Allel, *for^{189Y}*, getestet. Diese GAL4-Linie wurde in einem P{GAL4}-*Enhancer-Trap*-Screen isoliert und weist ein reduziertes Level an PKG-Aktivität auf (Osborne et al., 1997). Der Insertionsort des P-Elements wurde zwar in dem *lilliputian* Gen lokalisiert, welches 675 kb downstream des *for* Gens liegt, es ist jedoch sowohl das mRNA Level von *lilliputian* als auch das von *for* reduziert (Wang et al., 2008). Diese Analyse deutet darauf hin, dass das P-Element im *for* Gen eine

Sekundärmutation erzeugt hat, ein Prozess der durch das mehrmalige Ein- und Ausspringen eines P-Elements auftreten kann (*hit-and-run*; Häcker et al., 2003). Auch im *Detour*-Paradigma verhält sich for^{189Y} wie ein rezessives, hypomorphes *for* Allel. Kreuzt man for^{189Y} über eine Defizienz, welche das *for* Gen betrifft (*Df(2L)ED243*; Abb. 10; dos Santos et al., 2015; Ryder et al., 2004), so zeigen diese transheterozygoten Tiere ein reduziertes Orientierungsgedächtnis von 70 % (Abb. 9). Transheterozygote Fliegen mit dem dominanten *Rover* Allel (for^R/for^{189Y}) zeigen hingegen ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis, während Fliegen, die beide hypomorphen Allele tragen (for^S/for^{189Y}), einen intermediären Phänotyp von 70 % Orientierungsleistung zeigen.

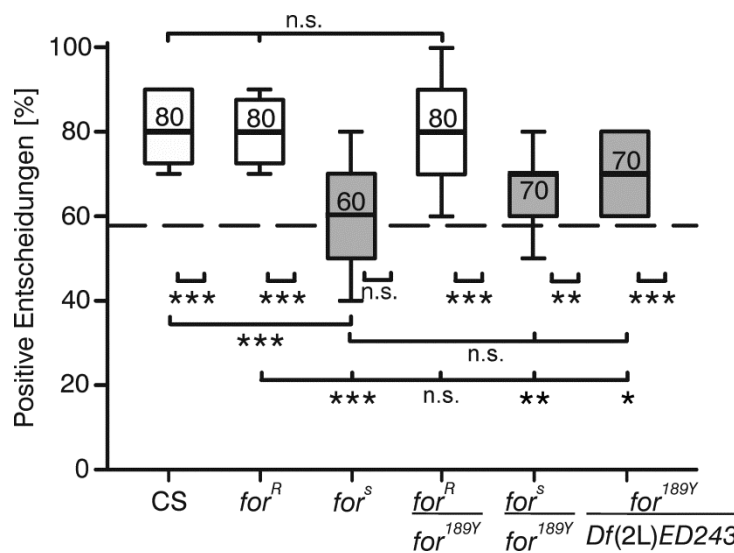


Abb. 9: Orientierungsgedächtnis verschiedener *for* Allele. „Positive Entscheidungen“ bedeutet Hinwendung zum vorherigen, jetzt nicht mehr sichtbaren Zielobjekt nach einem Umweg zu einem Ablenkobjekt. Homozygote Fliegen, die das dominante for^R Allel tragen verhalten sich wie der Wildtyp CS (80 %), während homozygote Fliegen für das for^S Allel einen vollständigen Verlust des Gedächtnisses aufweisen (60 %). Transheterozygote for^R/for^{189Y} Tiere zeigen ein wildtypisches Gedächtnis, wohingegen Transheterozygote der hypomorphen Allele for^S/for^{189Y} ein stark reduziertes Gedächtnis haben. Kreuzt man das rezessive for^{189Y} Allel über die Defizienz *Df(2L)ED243* (dos Santos et al., 2015), welche das *for* Gen betrifft, so zeigen diese Tiere ebenfalls einen intermediären Phänotyp (70 %; alle Genotypen n = 24; eigene Arbeit, veröffentlicht in Kuntz et al., 2012). Die statistische Auswertung ist der Tab. 24 im Anhang zu entnehmen.

Nicht-parametrische Mediantarstellung: Die Box umfasst die 25 %- bis 75 %-Quartile und die Fehlerbalken geben die 10 %- und 90 %-Perzentile an. Der Medianwert ist durch eine horizontale Linie und zusätzlich durch die Zahl dargestellt. Das Zufallsniveau von 58 % ist durch eine gestrichelte Linie verdeutlicht. Die Datensätze sind sowohl untereinander verglichen als auch jeweils zum Zufallsniveau (rechts neben jeder Box eingezeichnet). Die relevanten statistischen Ergebnisse sind wie folgt dargestellt: n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

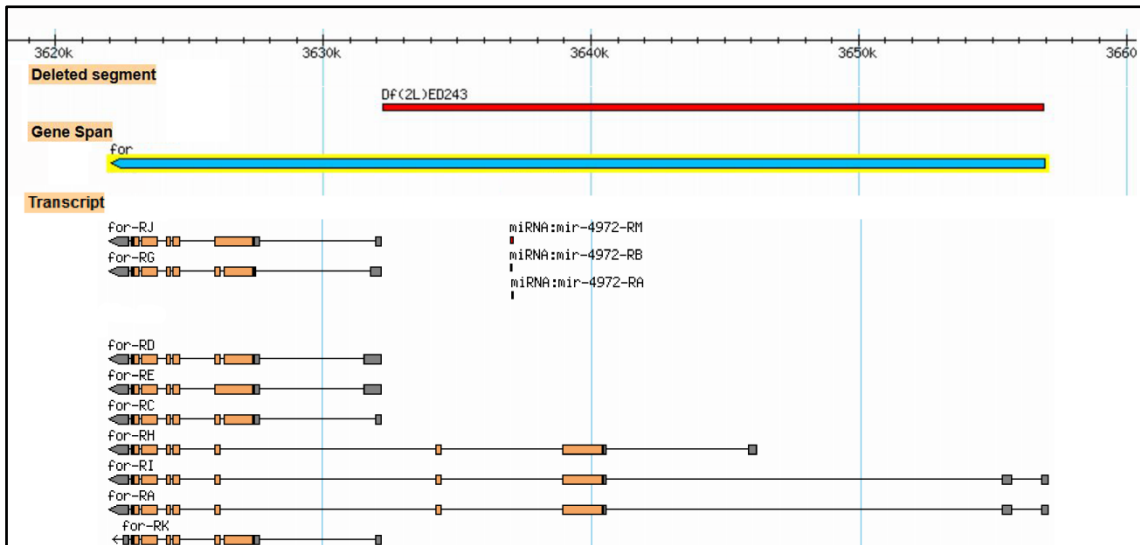


Abb. 10: Die Defizienzlinie Df(2L)ED243 betrifft große Teile des *for* Locus (verändert nach dos Santos et al., 2015).

Anschließend sollte untersucht werden, in welchen Subtypen der Ringneurone des Ellipsoidkörpers die Funktion des FOR-Proteins benötigt wird. Hierfür wurden mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) gewebespezifische cDNA Rettungsexperimente durchgeführt.

Als GAL4-Negativkontrolle dienten transheterozygote *for^s/for^{189Y}* Fliegen, die wie oben bereits beschrieben ein intermediäres Orientierungsgedächtnis von 70 % aufweisen (Abb. 11A). Die Kontrolle für das UAS-*for*T1 Konstrukt (Belay et al., 2007; *for^s/for^s*; UAS-*for*T1/III) weist einen mutanten Phänotyp von 60 % Orientierungsleistung auf. Die Expression von FOR mit der GAL4-Linie c232 (Renn et al., 1999) in einem *for^s/for^s* mutanten genetischen Hintergrund rettet das Orientierungsgedächtnis vollständig. c232 exprimiert in den R3 und R4d Neuronen (Renn et al., 1999). Für eine weitere Differenzierung der Ringneurone wurde die cDNA von *for* ebenfalls mit der GAL4-Linie 189Y getrieben, welche im Ellipsoidkörper nur in R3 Neuronen exprimiert (Renn et al., 1999). Das Orientierungsgedächtnis dieser Tiere kann vollständig auf ein wildtypisches Niveau gerettet werden. Da 189Y neben der Ellipsoidkörperexpression auch eine Expression in den α -, β - und γ -Loben der Pilzkörper zeigt (Renn et al., 1999; Kuntz et al., 2012), wurde eine weitere Negativkontrolle durchgeführt. FOR wurde mit 201Y-GAL4 (Aso et al., 2009) exprimiert und wurde somit in denselben Kompartimenten des Pilzkörpers getrieben wie mit der Linie 189Y. Da diese Fliegen kein verbessertes Orientierungsgedächtnis aufweisen, kann die Rettung mit der Treiberlinie 189Y allein auf die Ellipsoidkörperexpression in den R3 Neuronen

zurückgeführt werden. Des Weiteren wurde *for* cDNA in den restlichen Ringsystemen, in den R1 Neuronen (*c105-GAL4*; Renn et al., 1999), den R2 Neuronen (*c42-GAL4*; Renn et al., 1999) und den R4 Neuronen (*ftz-ng-GAL4*; Poreanu et al., 2011) exprimiert. Jedoch konnte keine dieser GAL4-Linien den defekten Orientierungsphänotyp von *for^s* retten. Dieses Rettungsexperiment zeigt, dass die *for* PKG ausschließlich in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers für ein funktionsfähiges Orientierungsgedächtnis benötigt wird.

Da *for* bereits während der Entwicklung exprimiert wird (Belay et al., 2007) und um Entwicklungsdefizite als Ursache für das defekte Orientierungsgedächtnis von *for^s* auszuschließen, wurde ein konditionales Rettungsexperiment mit dem temperatursensitiven GAL80^{ts}-Repressor (McGuire et al., 2003) durchgeführt. Fliegen des Genotyps *for^s/189Y Tub > GAL80^{ts}* wurden bei 18 °C aufgezogen und auf ihr Orientierungsgedächtnis überprüft (Abb. 11B). Bei 18 °C reprimiert GAL80 die Aktivität von GAL4, so dass keine cDNA transkribiert wird und die Fliegen im mutanten Zustand von *for^s* aufwachsen und einen defekten Gedächtnisphänotyp zeigen. Anschließend wurden die Fliegen 24 h auf 30 °C gehalten und erneut im *Detour*-Paradigma getestet. Bei hohen Temperaturen löst sich GAL80 von GAL4 und FOR wird in den R3 Neuronen exprimiert. Dieselben Individuen wurden erneut getestet und zeigen nun ein wildtypisches Gedächtnis, was auf eine akute Funktion der PKG in den adulten Ringneuronen schließen lässt.

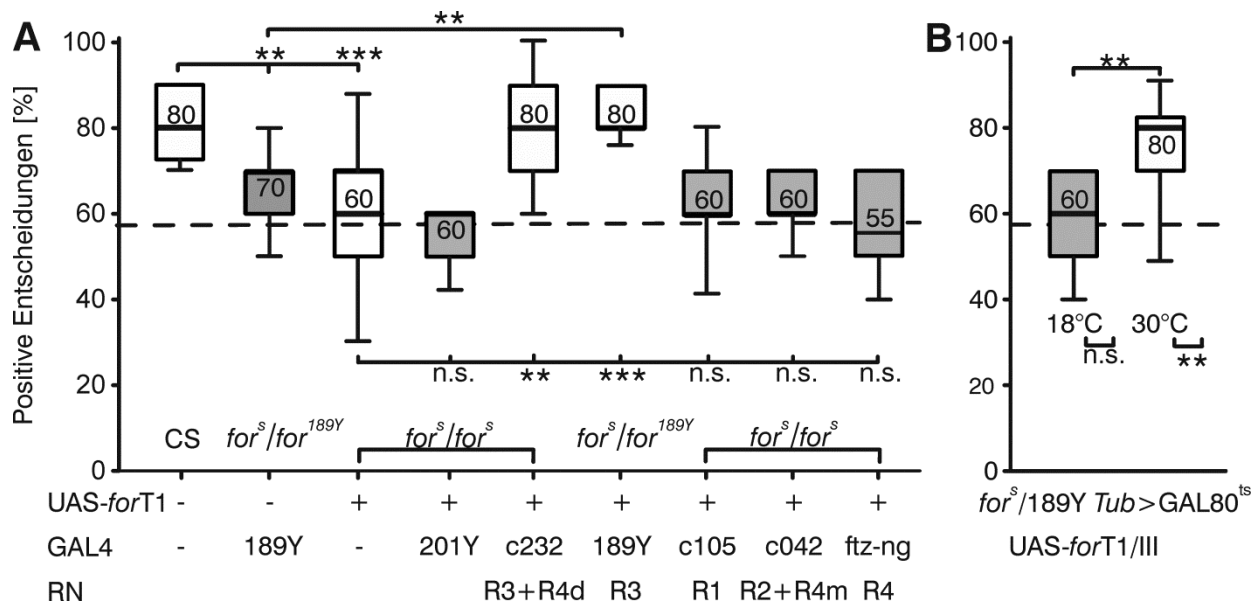


Abb. 11: *for* wird in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers für das Orientierungsgedächtnis benötigt. (A) Wird die *for* cDNA (UAS-*forT1*) in einem *for^s* mutanten Hintergrund in den Neuronen R3/R4d (c232-GAL4) oder ausschließlich in den R3 Neuronen (189Y-GAL4) exprimiert, so rettet diese den defekten Gedächtnisphänotyp im *Detour*-Paradigma. Im Gegensatz dazu weisen sowohl die Kontrolle für die GAL4-Linie 189Y (*for^s/for^{189Y}*) als auch die UAS-Kontrolle (*for^s/for^s*; UAS-*forT1*/III) ein defektes Gedächtnis auf. Als weitere Kontrolle wurde die cDNA mit 201Y-GAL4 getrieben, um gegen die Pilzkörperstrukturen zu testen, die ebenfalls von 189Y adressiert werden. Diese Fliegen weisen jedoch auch ein defektes Gedächtnis auf. Auch die Expression in den R1 Neuronen (c105-GAL4), R2/R4m Neuronen (c42-GAL4) oder R4 Neuronen (ftz-ng-GAL4) kann den defekten Phänotyp nicht retten (alle Genotypen n = 20-24). (B) *for^s/189Y Tub > GAL80^{ts}* Tiere wurden bei 18 °C aufgezogen, um die GAL4-Aktivität zu verhindern und anschließend auf ihren mutanten Phänotyp getestet. Nach 24 h Induktion auf 30 °C und FOR-Expression in den R3 Neuronen weisen die Fliegen ein wildtypisches Gedächtnis auf (alle Genotypen n = 18; eigene Arbeit, veröffentlicht in Kuntz et al., 2012). Die statistische Auswertung ist der **Tab. 25** im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9. Abkürzung: RN (Ringneuron).

Es wurde außerdem ein *knock-down* Experiment durchgeführt. Mit Hilfe einer RNAi-Linie gegen die *for* mRNA (Dietzl et al., 2007) wurde FOR in den R3 Neuronen herunterreguliert (189Y > UAS-*for*RNAi), was zu einem kompletten Verlust des Orientierungsgedächtnisses führt und eine Phänokopie von *for^s* darstellt (Abb. 12). Das RNAi-Konstrukt allein zeigt keine unspezifische Leckexpression, da Fliegen des RNAi-Stammes ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis zeigen. Zur Überprüfung der GAL4-Kontrolle wurde zusätzlich ein UAS-GFP im Expressionsmuster von 189Y exprimiert, um durch eine weitere Kopie *mini-white*, eine adäquate Augenfarbe der Fliegen zu erzielen. Auch diese Negativkontrolle zeigt ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis.

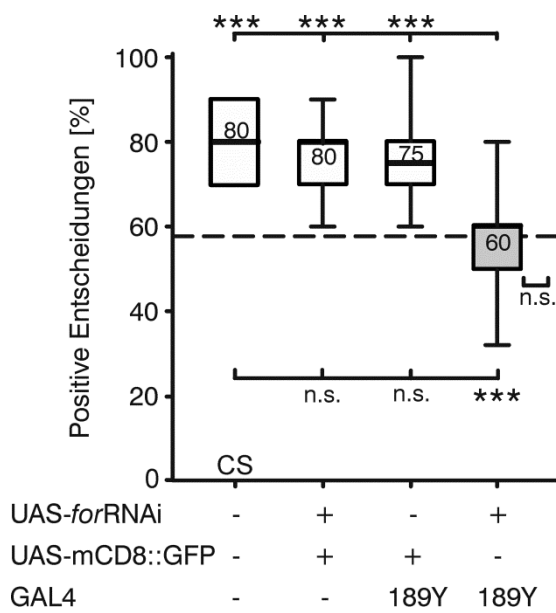


Abb. 12: Knock-down des *for* Genprodukts in den R3 Neuronen. Die Kontrollen für das UAS-Konstrukt und 189Y verhalten sich wie CS, während die gezielte Herunterregulierung der *for* mRNA in den R3 Neuronen zum vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses führt (alle Genotypen n = 15-18; eigene Arbeit, veröffentlicht in Kuntz et al., 2012). Die statistische Auswertung ist der Tab. 26 im Anhang zu entnehmen. Darstellungs-konventionen wie in Abb. 9.

3.2. Die Nitritoxid-Synthase wird für das Arbeitsgedächtnis benötigt

In diversen Experimenten mit Zellen oder Gehirnschnitten, sowie auch mit Mäusen wurde der enge Zusammenhang von der PKG und Stickstoffmonoxid (NO; *Nitric Oxide*) etabliert. PKG wird durch cGMP (Zyklisches Guanosinmonophosphat; *cyclic* GMP) aktiviert, welches wiederum vermehrt durch die Guanylylzyklase (GC) produziert wird. Die Aktivierung der GC ist eine Hauptaufgabe des Gasotransmitters NO (Wang und Robinson, 1997; Davies, 2006; Cossenza et al., 2014). Aufgrund der Ergebnisse, dass die *for* PKG für die Ausbildung des Orientierungsgedächtnisses bei *Drosophila* in den R3 Neuronen benötigt wird (Kapitel 3.1) und aufgrund der Hypothese, dass ein diffusibler Faktor an diesem Prozess beteiligt ist (Zielsetzung Kapitel 1.7), wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob NO als gasförmiger Transmitter eine Rolle für das visuelle Arbeitsgedächtnis der Fliege spielt.

NO wird im Gehirn und im Gewebe durch die Nitritoxid-Synthase (NOS) synthetisiert und diverse Funktionen von NO im Nervensystem sind mittlerweile bekannt, unter anderem eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen. Bei Vertebraten werden drei verschiedene Isoformen unterschieden: die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS; Garthwaite, 2008). Bereits Anfang der 90iger Jahre wurde auf hippocampalen Gehirnschnitten beobachtet, dass die pharmakologische Blockade von NOS zu einer Reduktion der Langzeit-Potenzierung führt (Schuman und Madison, 1991). In Verhaltensexperimenten

mit Mäusen wurde außerdem gezeigt, dass nNOS an der Bildung eines räumlichen Gedächtnisses (Majlessi et al., 2008) beteiligt ist. Bei *Drosophila* existiert nur ein *Nos*-Gen (dos Santos et al., 2015), welches die größte Homologie zur nNOS der Säuger hat (~43 %, Regulski und Tully, 1995).

Zunächst wurde mit einem *Drosophila*-spezifischen Antikörper die Expression von NOS in adulten Gehirnen untersucht (Abb. 13). Nachdem die Spezifität des Antikörpers überprüft wurde (Anhang Kapitel 8.2.1; Abb. 69) und keine Kreuzreaktion gegen andere Proteine festgestellt werden konnte, wurde die Expression von NOS im Gehirn genauer untersucht. NOS befindet sich fast im gesamten Gehirn, ist jedoch mit einer stärkeren Expression im optischen System, im suboesophagalen Ganglion und im Zentralkomplex zu finden (Abb. 13A); vor allem im Ellipsoidkörper (Abb. 13B) und im fächerförmigen Körper (Abb. 13B). In den Pilzkörpern, welche gegen Fasciclin II angefärbt wurden und in grün visualisiert sind, ist keine NOS-Expression zu detektieren (Abb. 13B). NOS ist kaum in Zellkörpern zu finden und die Färbung erscheint in den meisten Neuropilen sehr strukturiert (in Pünktchen). Zur genaueren Analyse der Expression im Ellipsoidkörper wurde eine Gegenfärbung der einzelnen Ringneuron-Subtypen (R1, R2, R3 und R4) mit GFP angefertigt (Abb. 13C-F). Auffällig bei der NOS Färbung im Ellipsoidkörper ist auch hier die strukturierte Färbung im Ring, die jedoch zusätzlich von einer Art „Punktewolke“ umgeben ist. Die GFP-Färbungen der Ringneurone R1, R2 und R4 scheinen keine Überlappung mit dem NOS-Signal zu zeigen. Es kann aber eine Kolokalisation der GFP-Färbung und des NOS-Signals in den axonalen Verzweigungen der R3 Neurone festgestellt werden (Abb. 13E). In dieser Aufnahme ist erneut zu sehen, dass die R3 Neurone eine dichte NOS-Färbung zeigen und dass um die R3 Neurone eine weitere „Punktewolke“ von NOS-Strukturen zu beobachten ist, welche im Bereich der R2 Neurone liegen könnte. Aufgrund der Auflösungsgrenze des Objektivs kann jedoch nicht zwischen einzelnen Neuronen unterschieden werden, so dass die Kolokalisation dieser einzelnen Pünktchen schwierig ist. Die Pünktchen zeigen eine präzise und sehr zielgerichtete Anordnung der Synthese in Clustern.

Um die Kolokalisation zu präzisieren, wurde ebenfalls die NOS-Expression in den Zellkörpern der Ringneurone untersucht (Abb. 13G-J). Die Zellkörper der vier Ringneuron-Subtypen wurden mit GFP visualisiert, es kann jedoch keinerlei NOS-Protein in diesen Zellkörpern detektiert werden. Auch nicht in den Zellkörpern der R3 Neurone, wodurch die oben beschriebene Lokalisation der NOS-Expression nicht eindeutig den axonalen Ausläufern der R3 Neurone zugeordnet werden kann. Es ist

ebenfalls keine NOS-Expression in dem Bereich der lateralen Triangel (*Bulb*) zu finden, die Region der dendritischen Verästelungen der Ringneurone. Die Expressionsanalyse von NOS im adulten Gehirn zeigt, dass NOS bei *Drosophila* vermutlich eher präsynaptisch lokalisiert ist.

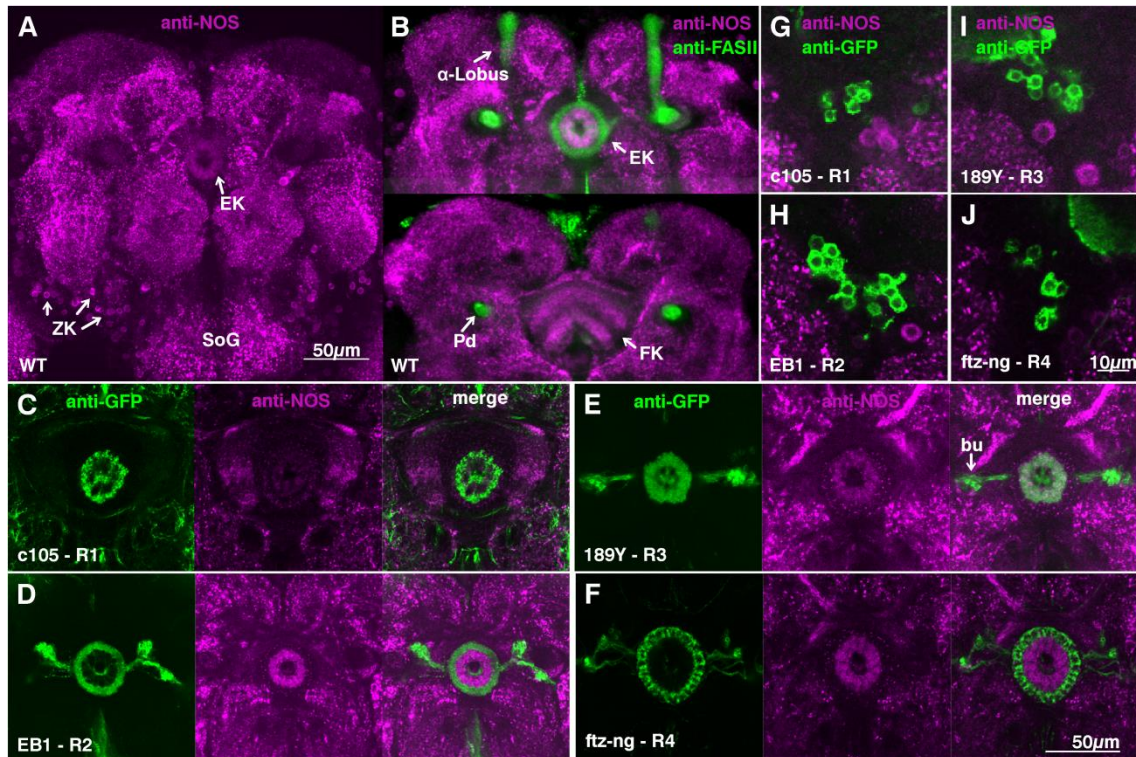


Abb. 13: NOS-Expression im adulten Gehirn von *Drosophila* und Kolokalisation mit den Ringneuronen. (A) Totale z-Projektion des adulten Gehirns mit dem Ellipsoidkörper (EK), dem Subesophagealen Ganglion (SoG) und einigen Zellkörpern (ZK). (B) Kolokalisation von NOS (magenta) und Fasciclin II (FASII; grün). Kolokalisation befindet sich im EK nicht aber in den α -Loben der Pilzkörper; optische Schichtdicke 24 μ m. Drei Schichten des fächerförmigen Körpers (FK) zeigen NOS-Expression; optische Schichtdicke 36,75 μ m. (C-F) Kolokalisationsanalyse der NOS-Expression mit den Ringneuronen, welche mit tdGFP (grün) visualisiert wurden. Es ist keine Kolokalisation von NOS mit R1 Neuronen (c105-GAL4; C), mit R2 Neuronen (EB1-GAL4 (Young und Armstrong, 2010; D) oder R4 Neuronen (ftz-ng; F) zu erkennen, jedoch in den axonalen Projektionen der R3 Neurone (189Y-GAL4; E); optische Schichtdicken 2 μ m. (G-J) Kolokalisation der NOS-Expression mit den jeweiligen Zellkörpern der Ringneurone R1 (G), R2 (H), R3 (I) und R4 (J); optische Schichtdicke 0,75 μ m.

Da NOS nur in der ringförmigen Struktur des Ellipsoidkörpers und nicht in den Ringneuron-typischen dendritischen Verästelungen in den lateralen Triangeln (*Bulb*) und nicht in den Zellkörpern der Ringneurone lokalisiert werden konnte, wurde außerdem die Möglichkeit überprüft, dass NOS in den Kleinfeldneuronen (*small-field neurons*) des Ellipsoidkörpers und eventuell nicht in den Ringneuronen exprimiert ist. NOS wurde erneut mit dem *Drosophila*-spezifischen anti-NOS Serum angefärbt,

während beispielhaft die Kleinfeldneurone mit den GAL4-Linien 007Y (Renn et al., 1999) und VT 62856 (stockcenter.vdrc.at) visualisiert wurden.

Betrachtet man die Färbungen gegen endogenes NOS und GFP, welches mit der Treiberlinie 007Y getrieben wurde, so ist auffällig, dass Strukturen in unterschiedlicher Tiefe im Ellipsoidkörper angefärbt werden (Abb. 14). Auf der Höhe der breitesten NOS-Expression (obere Bildreihe) ist kaum oder gar keine GFP-Expression von 007Y-GAL4 zu beobachten. Weiter posterior im Ellipsoidkörper (untere Bildreihe) ist dagegen eine deutliche Färbung der Kleinfeldneurone von 007Y zu sehen. Auf dieser Bildebene ist aber kaum noch endogene NOS-Expression zu detektieren. Diese Expressionsanalyse schließt aus, dass es sich bei den NOS-exprimierenden Neuronen um Kleinfeldneurone des Musters von 007Y handelt. Synaptische Kontakte zwischen diesen beiden Neuronentypen können jedoch aufgrund der Auflösungsgrenze des Objektivs nicht ausgeschlossen werden.

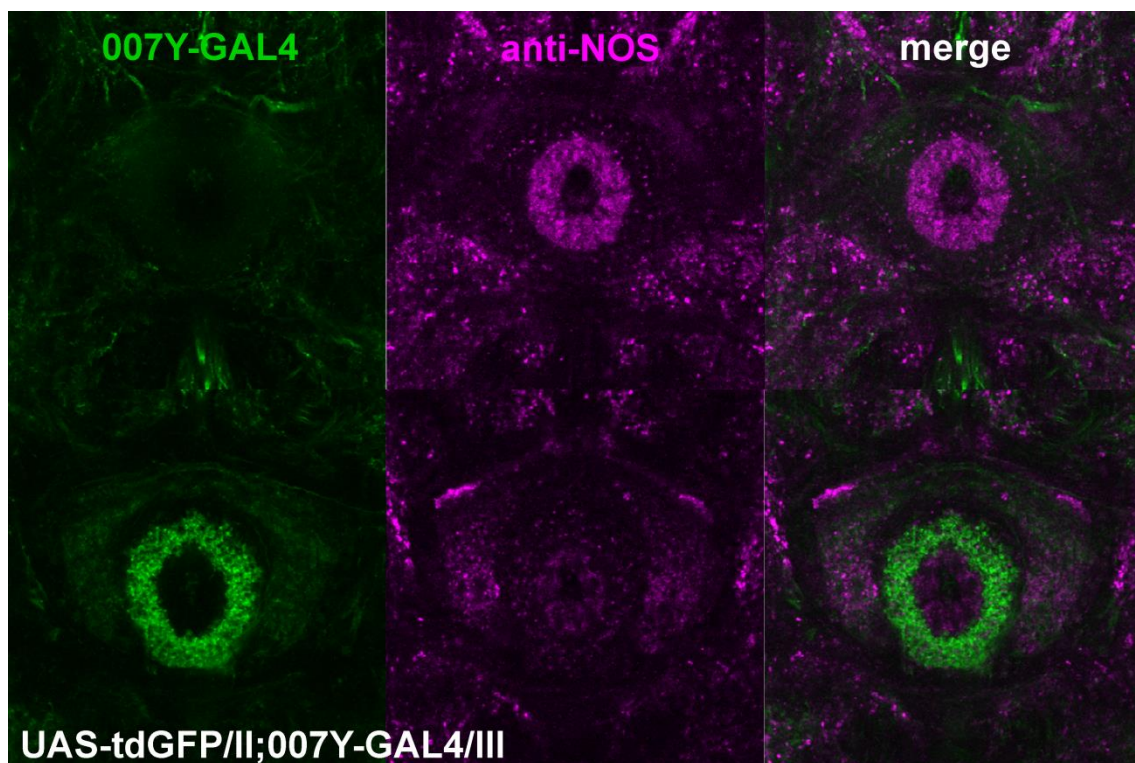


Abb. 14: Vergleich des NOS-Expressionsmusters und einer Population von Kleinfeldneuronen (007Y-GAL4). Die NOS-Expression wurde mit dem *Drosophila*-anti-NOS Serum erzielt (magenta). Zusätzlich sind Kleinfeldneurone, welche von 007Y-GAL4 adressiert werden, mit anti-GFP visualisiert (grün). Dargestellt ist jeweils ein optischer Schnitt von 0,75 μ m auf der Höhe der stärksten NOS-Expression (obere Bildreihe) und auf der Höhe der stärksten Expression des GAL4-Musters (untere Bildreihe).

Es wurde eine weitere GAL4-Linie zur Visualisierung einer anderen Population von Kleinfeldneuronen herangezogen. In den adulten Gehirnen der Tiere VT62856 > tdGFP ist eine breitflächige Expression der Kleinfeldneurone im Ellipsoidkörper zu sehen (Abb. 15). Jedoch liegt auch hier die stärkste NOS-Expression weiter anterior im Gehirn (obere Bildreihe), als die breiteste GFP-Expression, welche weiter posterior im Gehirn liegt (untere Bildreihe). Es gibt keine starke Kolo­kalisierung der beiden Expressionsmuster, jedoch können auch hier synaptische Kontakte aufgrund der Auflösungsgrenze der Objektive nicht beurteilt werden.

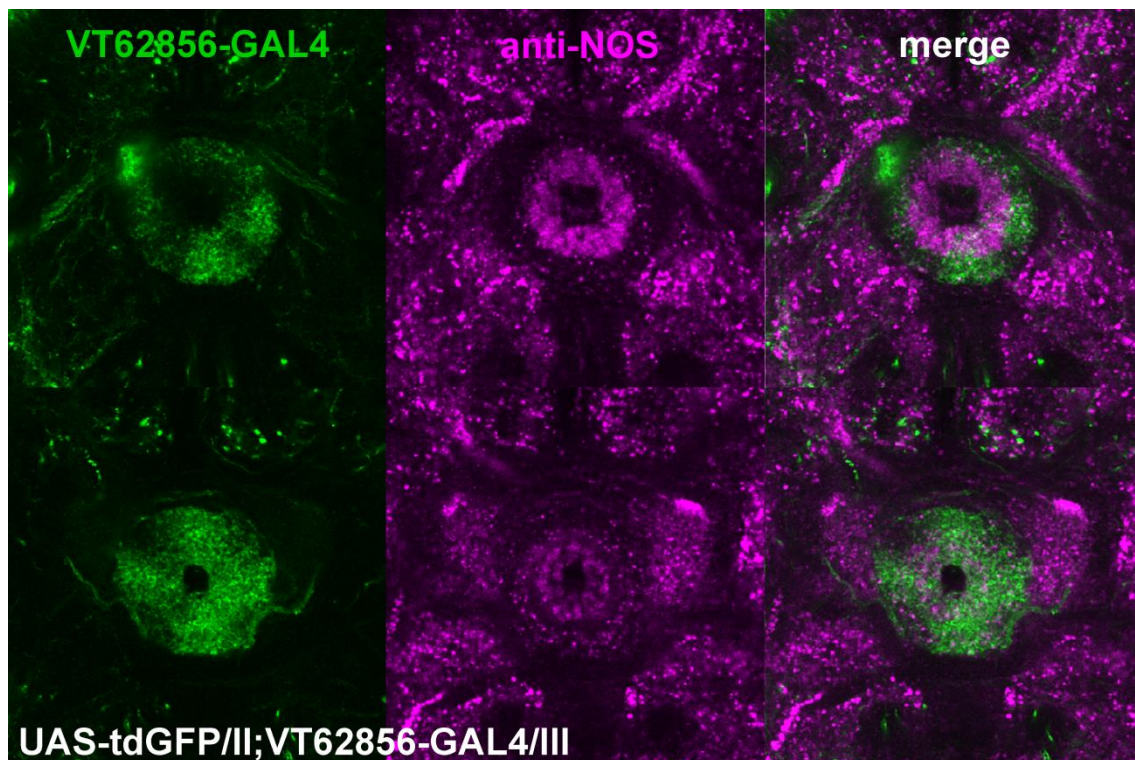


Abb. 15: Vergleich des NOS-Expressionsmusters und einer Population von Kleinfeldneuronen (VT62856-GAL4). Die NOS-Expression wurde mit dem *Drosophila*-anti-NOS Serum erzielt (magenta). Zusätzlich sind Kleinfeldneurone, welche von VT62856-GAL4 adressiert werden, mit anti-GFP visualisiert (grün). Dargestellt ist jeweils ein optischer Schnitt von 0,75 µm auf der Höhe der stärksten NOS-Expression (obere Bildreihe) und auf der Höhe der stärksten Expression des GAL4-Musters (untere Bildreihe).

Da NOS nicht in den untersuchten Kleinfeldneuronen lokalisiert werden konnte, wurde erneut die Hypothese überprüft, dass NOS in den R3 Neuronen exprimiert wird (Abb. 13). Zur Verifizierung dieser Hypothese wurden histologische Präparate der *knock-down* Tiere 189Y > UAS-*Nos*RNAi und ihrer Kontrolle (UAS-*Nos*RNAi) angefertigt und erneut mit dem anti-NOS Serum angefärbt (UAS-*Nos*RNAi: Dietzl et al., 2007). Die Pixelintensität wurde in den gekennzeichneten Bereichen im

Ellipsoidkörper und im fächerförmigen Körper gemessen (Abb. 16A) und in Relation zueinander gesetzt (Abb. 16B). Die Region im fächerförmigen Körper wurde als Kontrolle gewählt, da sie eine konstante NOS-Expression aufweist, jedoch nicht im Expressionsmuster der Linie 189Y liegt und somit nicht vom *knock-down* betroffen ist. Die NOS-Expression in den R3 Neuronen ist in den 189Y > UAS-*Nos*RNAi Tieren stark reduziert, während die Färbung im fächerförmigen Körper in diesen Tieren nicht schwächer ausfällt. In den Kontrolltieren liegt sowohl eine deutliche NOS-Expression im Ellipsoidkörper, als auch im fächerförmigen Körper vor. Insgesamt führt die Herunterregulierung von *Nos* mRNA mit 189Y-GAL4 zu einer Halbierung der Expression im Ellipsoidkörper (Abb. 16B), was eine endogene Expression von NOS in den R3 Neuronen bestätigt.

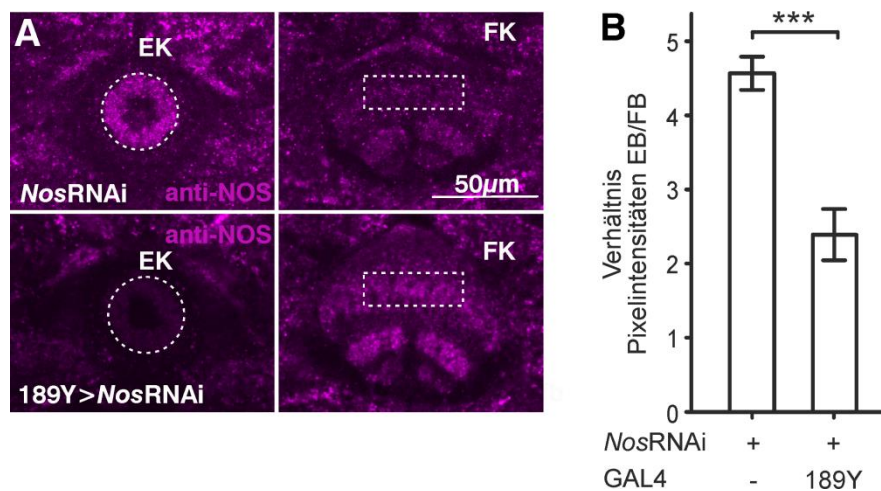


Abb. 16: Histologische Quantifizierung des *Nos* knock-down Experiments. (A) RNAi vermittelter *knock-down* der *Nos* mRNA in den R3 Neuronen (189Y-GAL4) im Vergleich zu Kontrolltieren (UAS-*Nos*RNAi). Die optische Schichtdicke ist 3,75 µm und wurde an den breitesten Expressionen im Ellipsoid- (EK) bzw. im fächerförmigen Körper (FK) gemessen. Eine Kontrollfärbung wurde im fächerförmigen Körper gemessen, da dieser Bereich nicht von 189Y adressiert wird. Es wurde die Pixelintensität in den gestrichelten Bereichen quantifiziert und gegeneinander verglichen (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4). (B) Der *knock-down* führt zu einer Halbierung der NOS-Expression (alle Genotypen n = 5). Die statistische Auswertung ist der Tab. 27 im Anhang zu entnehmen. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler.

Nachdem gezeigt wurde, dass NOS in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers exprimiert ist und die Funktionalität dieses Neuronentyps essentiell für das visuelle Orientierungsgedächtnis ist, wurde die *Nos* Mutante im *Detour*-Paradigma auf ihr Gedächtnis überprüft. Es wurden drei verschiedene *Nos* Allele getestet. Das Allel *Nos*⁴¹⁵ wurde durch eine Deletion erzeugt und ist somit eine Nullmutante (Yakubovich et al., 2010). Homozygote *Nos*⁴¹⁵ Tiere laufen nur zu 55 % auf die alte Landmarke

zurück und unterscheiden sich damit nicht vom Zufallsniveau (Abb. 17A). Da die Deletion *Nos*^{A15} außerdem die Gene *CG6508* und *CG17134* betrifft (Yakubovich et al., 2010), wurden weitere *Nos* Allele getestet. Das Allel *Nos*^{e2671} ist durch eine P-Element Insertion im ersten nicht-kodierenden Exon charakterisiert und als hypomorphes Allel beschrieben (Yakubovich et al., 2010). Auch im *Detour*-Paradigma wird die hypomorphe Natur des Allels sichtbar, da es heterozygot über dem Nullallel (*Nos*^{A15}/*Nos*^{e2671}) zu einem intermediären Phänotyp von 70 % Gedächtnisleistung führt. Des Weiteren wurde das Allel *Nos*^C getestet, welches aufgrund einer Punktmutation ebenfalls keine Enzymaktivität mehr aufweist (Yakubovich et al., 2010). Heterozygote *Nos*^{A15}/*Nos*^C Tiere zeigen einen kompletten Verlust des Orientierungsgedächtnisses, was bedeutet, dass die Mutation im *Nos* Gen für das defekte Arbeitsgedächtnis verantwortlich ist und nicht die Gene *CG6508* und *CG17134*, welche ebenfalls bei der Deletion *Nos*^{A15} fehlen.

In der histologischen Expressionsanalyse konnte mit einem *knock-down* Experiment der *Nos* mRNA in den R3 Neuronen gezeigt werden, dass NOS in den R3 Neuronen endogen exprimiert ist (Abb. 16). Tiere des gleichen Genotyps wurden auch auf der Verhaltensebene im *Detour*-Paradigma getestet. Das UAS-*Nos*RNAi Konstrukt zeigt ohne GAL4-Treiber keine Effekte und die Tiere laufen mit einem wildtypischen Niveau von 80 % positiven Entscheidungen auf das ursprüngliche Ziel zu (Abb. 17B). Treibt man die RNAi jedoch gezielt in den R3 Neuronen (189Y > UAS-*Nos*RNAi), so verschlechtern sich die Tiere in ihrem Gedächtnis und erinnern sich nur noch zu 65 % an die ursprüngliche Landmarke. NOS wird also in den R3 Neuronen für das korrekte Ausführen des Orientierungsgedächtnisses benötigt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der histologischen Expressionsanalyse.

Die Reduktion der *Nos* mRNA wurde nicht nur mit 189Y-GAL4 (R3 Neurone) durchgeführt, sondern auch mit der GAL4 Linie VT202672 (stockcenter.vdrc.at). Das P-Element dieser GAL4-Linie wurde mit dem *phi*-Integrase-System an einer definierten Stelle (attP2) auf dem dritten Chromosom integriert und steht unter der Kontrolle eines klonierten Promotors, in diesem Fall dem des *Nos* Gens. Diese GAL4-Linie wurde mit der Intention ausgewählt, dass sie das endogene Expressionsmuster von NOS zum Teil repräsentiert. Reduziert man die *Nos* mRNA in diesen Neuronen (VT202672), so kommt es zu einem starken Verlust des Orientierungsgedächtnisses gegenüber der Kontrolle (Abb. 17B). Die ausreichende Expression von NOS in den Strukturen der

Linie VT202672 ist also ebenso essentiell für ein funktionsfähiges visuelles Arbeitsgedächtnis wie die Expression von NOS in den R3 Neuronen.

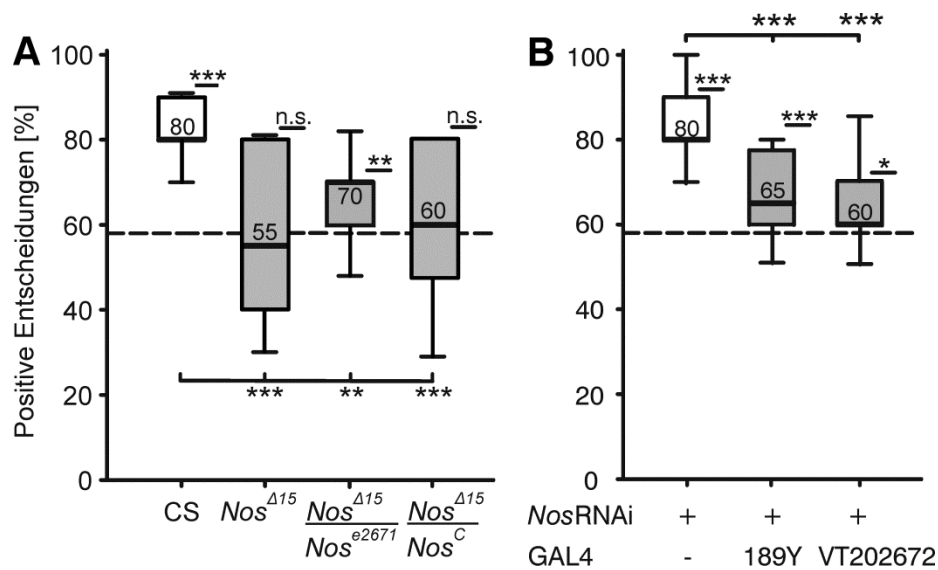


Abb. 17: Orientierungsgedächtnis der *Nos* Mutante und *knock-down* der *Nos* mRNA. (A) Im Vergleich zu CS Tieren weisen $Nos^{\Delta 15}$ und transheterozygote $Nos^{\Delta 15}/Nos^C$ Tiere einen vollständigen Verlust des Gedächtnisses auf. Transheterozygote $Nos^{\Delta 15}/Nos^{e2671}$ Fliegen haben einen intermediären Phänotyp von 70 % (alle Genotypen n = 17-18). (B) Im Vergleich zur Kontrolle (UAS-*Nos*RNAi) ruft die Herunterregulierung der *Nos* mRNA mit 189Y-GAL4 (in den R3 Neuronen) und mit der Treiberlinie VT202672-GAL4 eine starke Reduzierung des Gedächtnisses hervor (alle Genotypen n = 15-20). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 28 und der Tab. 29 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Zur Überprüfung des Expressionsmusters von VT202672-GAL4 wurde dieses mit tdGFP im adulten Gehirn visualisiert und analysiert. Im Ellipsoidkörper, auf Höhe der stärksten Färbung erzielt durch das anti-NOS-Serum, ist fast gar keine Färbung der GAL4-Linie zu beobachten (obere Bildreihe; Abb. 18). Im Gegensatz dazu zeigt die dorsale Schicht (oder die oberen dorsalen Schichten) des fächerförmigen Körpers eine starke GFP-Expression, welche mit der endogenen NOS-Expression teilweise kolokalisiert (untere Bildreihe). Die Färbung im fächerförmigen Körper, welche mit dem anti-NOS-Serum erzielt wird, ist jedoch wesentlich breiter. Das Expressionsmuster von VT202672 entspricht nicht der NOS-Expression, die mit dem *Drosophila*-spezifischen anti-NOS-Serum dargestellt wird. Die Verwendung von Teilstücken der endogenen Promotoren für die Klonierung der GAL4 P-Elementvektoren erklärt die teilweise Repräsentation des GAL4-Expressionsmusters im Vergleich zur beobachteten NOS-Expression mit dem Antiserum.

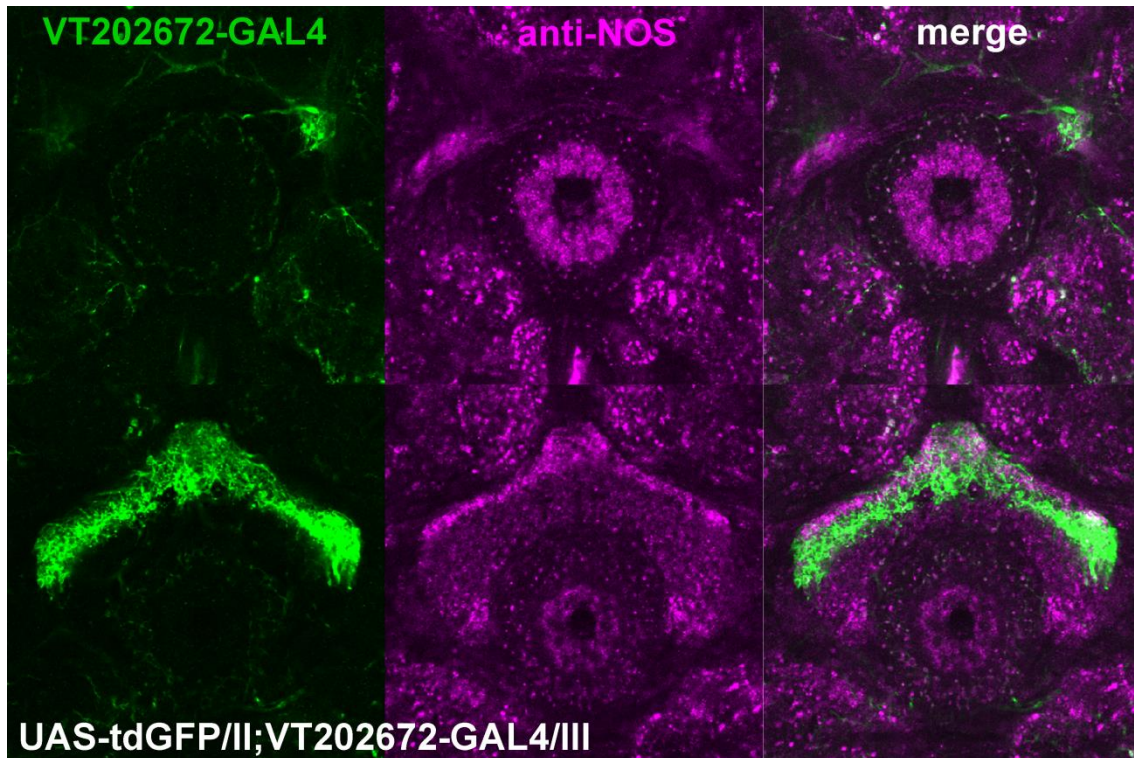


Abb. 18: Vergleich des Expressionsmusters der GAL4-Linie VT202672 (grün) und der beobachteten NOS-Expression (magenta) mit dem Antiserum. Adulte Gehirne des Genotyps UAS-tdGFP/II; VT202672-GAL4/III wurden mit einem Antikörper gegen GFP und gegen NOS angefärbt. Es ist jeweils ein optischer Schnitt von 0,75 μ m im Bereich des Ellipsoidkörpers (obere Bildreihe) und im Bereich des fächerförmigen Körpers (untere Bildreihe) dargestellt.

Als nächster Schritt wurde versucht, den defekten Phänotyp der *Nos* Mutante gewebespezifisch zu retten. Sowohl das *Nos* Gen, als auch die Treiberlinie 189Y liegen auf dem zweiten Chromosom, so dass auf die Treiberlinie c232-GAL4 zurückgegriffen wurde, welche in den R3/R4d Neuronen exprimiert (Renn et al., 1999).

Tiere, transheterozygot für zwei *Nos* Nullallele (Nos^{A15}/Nos^C) zeigen einen defekten Phänotyp im *Detour*-Paradigma (Abb. 19) und laufen nur zu 60 % auf das ursprüngliche Ziel zurück, womit sie sich nicht vom Zufallsniveau unterscheiden. Wurde nun in diesen genetischen Hintergrund das Rettungskonstrukt gekreuzt (Nos^{A15}/Nos^C ; UAS-*Nos*/III; Yakubovich et al., 2010), so zeigen die Tiere 70 % positive Entscheidungen für den ursprünglichen Weg und sind damit hoch signifikant verschieden zum Zufallsniveau, was auf eine Leckexpression rückschließen lässt. Dieser Genotyp unterscheidet sich jedoch nicht zu den transheterozygoten *Nos* Mutanten. Wird nun die Expression der cDNA von *Nos* gezielt in den R3/R4d Neuronen getrieben (Nos^{A15}/Nos^C ; UAS-*Nos*/c232-GAL4), so kann keine weitere Verbesserung der Orientierungsleistung beobachtet werden. Die Tiere zeigen ebenfalls einen Median von

70 %, jedoch mit einer leichten Tendenz nach oben. Es kann keine erfolgreiche Rettung der *Nos* Mutante erzielt werden, da kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypen besteht. Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Expressionsanalysen und der *knock-down* Experimente, ist bekannt, dass NOS sowohl in den R3 Neuronen als auch in der ersten Schicht des fächerförmigen Körpers exprimiert ist und dort auch essentiell für die Ausbildung des Orientierungsgedächtnisses ist (Abb. 16; Abb. 17; Abb. 18). Das Rettungsexperiment, welches mit der GAL4-Linie c232 durchgeführt wurde, treibt jedoch lediglich die Expression von NOS in den R3/R4d Neuronen des Ellipsoidkörpers und keine Expression im fächerförmigen Körper.

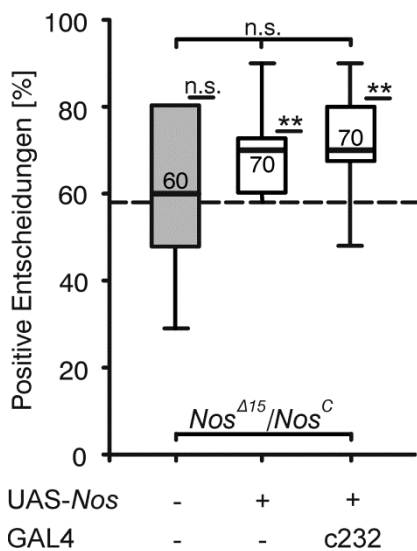


Abb. 19: Rettungsexperiment der *Nos* Mutante. Expression der *Nos* cDNA in den Kontrolltieren (*Nos*^{Δ15}/*Nos*^C; UAS-*Nos*/III) erhöht das Gedächtnisniveau der transheterozygoten Mutante bereits leicht von 60 % auf 70 %, dieser kann jedoch durch die gezielte Expression in den R3/R4d Neuronen (c232-GAL4) nicht weiter verbessert werden; diese Tendenzen sind nicht signifikant (alle Genotypen n = 18). Die statistische Auswertung ist der Tab. 30 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Zur weiteren Analyse der Rolle von NO für das visuelle Arbeitsgedächtnis der Fliege wurde ein pharmakologischer Ansatz verfolgt. Als Inhibitor für NOS wurde L-NNA (N_ω-Nitro-L-Arginin) ausgewählt, da dieser in vielen Studien bereits erfolgreich verwendet wurde (Müller, 1996; Gibbs und Truman, 1998; Champlin und Truman, 2000). Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Die Kontrollgruppe (erhält nur die Zuckerlösung) und die experimentelle Gruppe (erhält die Zuckerlösung und zusätzlich das Pharmakon). Die Tiere wurden sowohl vor als auch nach der Inkubationszeit im *Detour*-Paradigma getestet und während des Versuchs individuell in Eppendorfgefäßen gehalten, so dass ein eins-zu-eins Vergleich möglich war.

Der NOS-Inhibitor L-NNA wurde als erstes mit einer Konzentration von 100 µM und einer Inkubationszeit von 2 h an CS Tiere verfüttert (Abb. 20A). Während die Kontrollgruppe, welche 2 h nur auf der Zuckerlösung saß, keine Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung zeigt, ist bei der experimentellen Gruppe nach Aufnahme des

Inhibitors der komplette Verlust des Arbeitsgedächtnisses zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse werden erzielt, wenn die Inkubationszeit des Inhibitors auf 30 min reduziert wurde (ebenso 100 μ M; Abb. 20B). Auch nach der verkürzten Inkubationszeit zeigt sich der vollständige Verlust des Gedächtnisses durch die Aufnahme des Inhibitors. Verkürzt man die Inkubationszeit auf 5 min bei gleichbleibender Konzentration von 100 μ M, so zeigt sich immer noch eine starke Verschlechterung des visuellen Orientierungsgedächtnisses auf 65 %, womit sich die Entscheidungen der Tiere jedoch vom Zufallsniveau unterscheiden (Abb. 20C). Die Kontrollgruppe ist auch hier unverändert nach der Inkubation. Da eine weitere zeitliche Graduierung experimentell schwer durchführbar ist, wurde als nächster Schritt die Konzentration des Inhibitors auf 10 μ M gesenkt (Abb. 20D). Nach 5 min Inkubationszeit zeigen die Fliegen immer noch ein reduziertes Gedächtnis auf 70 % positive Entscheidungen, jedoch ist eine deutlich schwächere Wirkung des Inhibitors aufgrund der verminderten Konzentration zu beobachten. Die Kontrollgruppe läuft auch nach der Zuckeraufnahme im Median zu 80 % auf das ursprüngliche Ziel zurück, jedoch ist eine signifikante Verschlechterung des Verhaltens der Einzeltiere zu beobachten. Dies könnte auf die Prozedur der Mediumsapplikation zurückzuführen sein, ist jedoch nicht entscheidend, da der Median von 80 % keine Verschlechterung des Gedächtnisses anzeigt. Die Verfütterung des NOS-Inhibitors zeigt, dass die Blockade von NOS innerhalb von 5 Minuten zur deutlichen Verschlechterung des Orientierungsgedächtnisses führt und dass NO somit eine Rolle für schnelle Prozesse während der Signaltransduktion zukommt.

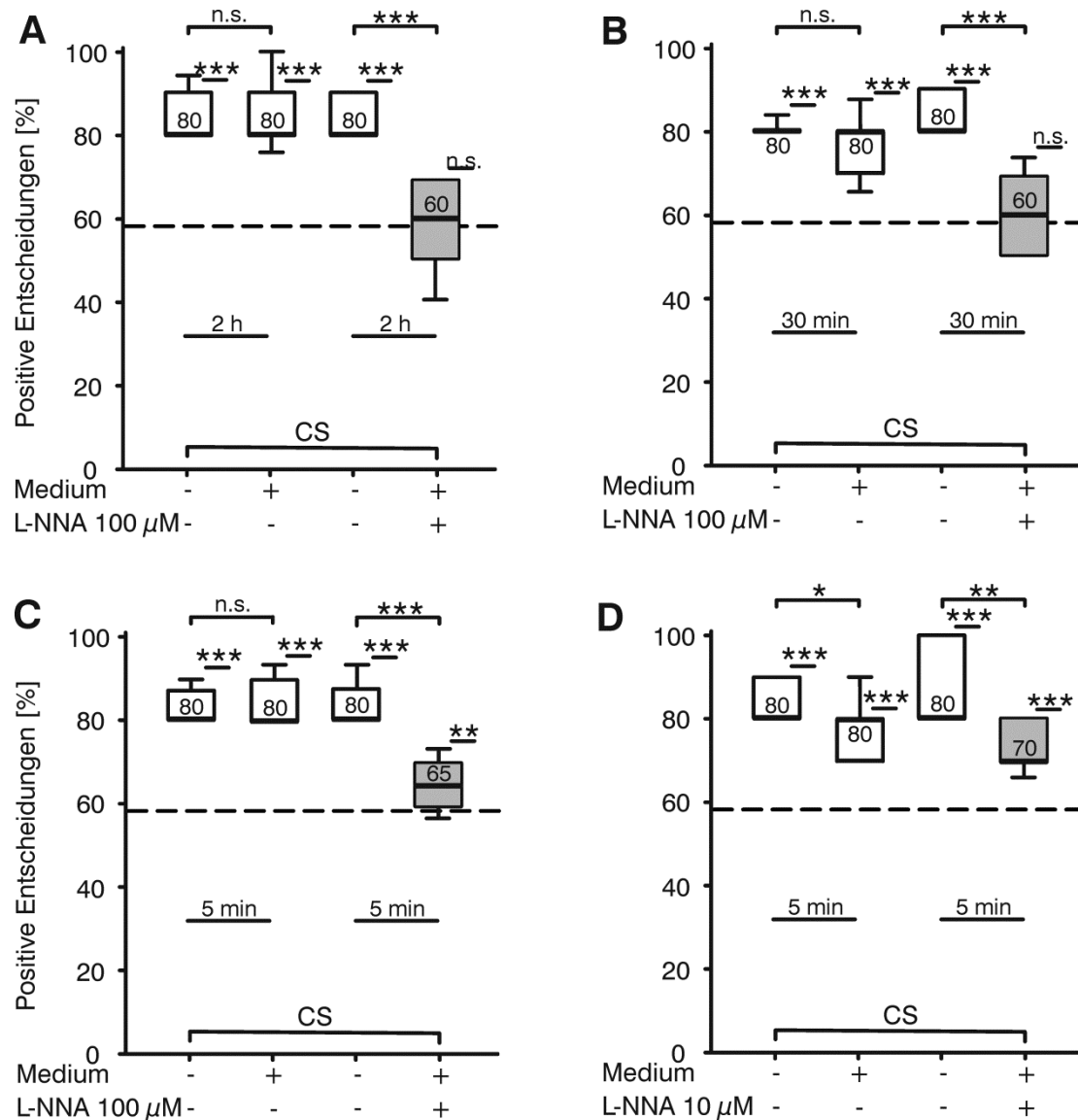


Abb. 20: Pharmakologische Applikation des NOS-Inhibitors L-NNA. Dieselben Individuen wurden vor und nach der Behandlung ohne Inhibitor (Kontrollgruppe) oder mit Inhibitor (experimentelle Gruppe) getestet (alle Gruppen n = 15). (A) Konzentration des Inhibitors: 100 μ M; Inkubation: 2 h zerstört das Orientierungsgedächtnis vollständig. (B) Konzentration des Inhibitors: 100 μ M; Inkubation: 30 min h zerstört das Orientierungsgedächtnis ebenfalls vollständig. (C) Konzentration des Inhibitors: 100 μ M; Inkubation: 5 min führt zu einer starken Reduzierung des Gedächtnisses. (D) Konzentration des Inhibitors: 10 μ M; Inkubation: 5 min reduziert das Orientierungsgedächtnis auf 70 %. Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 31 bis Tab. 34 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

3.3. Der diffusible Faktor H₂S wird für das Orientierungsgedächtnis benötigt

Als weiterer diffusibler Neuromodulator wurde Schwefelwasserstoff (H₂S) als Kandidat überprüft. Bei Vertebraten wird H₂S durch die Enzyme Cystathionin- β -Synthase (CBS), Cystathionin- γ -Lyase (CSE), 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase und der Cystein-Aminotransferase (Kimura 2013) produziert. Im *Drosophila* Genom findet

man jedoch nur Orthologe für die Enzyme CBS und CSE (dos Santos et al., 2015). Die Rolle von H₂S als neuromodulatorische Substanz wurde lange kontrovers diskutiert und lange galt das Gas ausschließlich als Zellgift. Mittlerweile wurde die endogene Expression der beiden Enzyme CBS und CSE bei Mäusen beschrieben (Paul und Snyder, 2012; Paul et al., 2014) und auch der Zusammenhang von exogener Zugabe kleiner Mengen H₂S auf Gehirnschnitte und der Steigerung der Langzeit-Potenzierung wurde etabliert (Abe und Kimura, 1996). Ein Beweis für eine endogene Funktion von H₂S an Lern- und Gedächtnisprozessen fehlt jedoch.

Das Allel *Cbs*^{EY04457} trägt ein P-Element im ersten nicht-kodierenden Exon von *Cbs* (dos Santos et al., 2015). Hemizygoten Tiere (*Cbs*^{EY04457}/Y;; EB1-GAL4/III) weisen einen kompletten Verlust des visuellen Arbeitsgedächtnisses auf. Aufgrund der sehr hellen Augenfarbe der Mutante wurde EB1 als weiteres *mini-white* Konstrukt in den genetischen Hintergrund gekreuzt, um Sehbehinderungen aufgrund zu geringer Pigmentierung der Augen auszuschließen. Die adäquate Kontrolle (*w*/Y;; EB1-GAL4/UAS-GFP) läuft hingegen auf wildtypischem Niveau. Um in diesem Genotyp eine vergleichbare Augenfarbe zu erzielen, wurde ebenfalls ein zweites *mini-white* Konstrukt (UAS-GFP) eingekreuzt (Abb. 21A). Um den Einfluss von CSE auf das Orientierungsgedächtnis zu testen, wurden *Eip55E*^{KGO2526} Mutanten im *Detour*-Paradigma getestet. Die Mutante *Eip55E*^{KGO2526} ist durch eine P-Element Insertion im ersten, nicht-kodierenden Exon charakterisiert (dos Santos et al., 2015) und weist lediglich ~40 % des *Eip55E* Transkripts auf (Trinh et al., 2008). Im *Detour*-Paradigma zeigt die Mutante einen vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses, da sie nur zu 60 % den Weg auf die ursprüngliche Landmarke einschlägt und damit höchst signifikant schlechter als der Wildtyp ist (Abb. 21B).

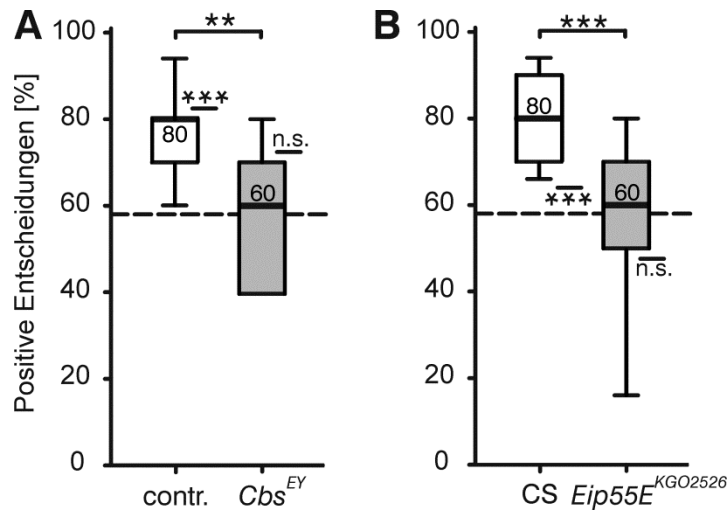


Abb. 21: H₂S wird für das Orientierungsgedächtnis benötigt. (A) Mutanten des H₂S-produzierenden Enzyms CBS (*Cbs^{EY04457}*; EB1-GAL4) zeigen gegenüber ihrer Kontrolle (w/Y;; EB1-GAL4/UAS-GFP) einen vollständigen Verlust des Gedächtnisses. EB1- und GFP-Transgene wurden für weitere Kopien des *mini-white* Konstrukts benötigt (alle Genotypen n = 15). (B) Analyse der Mutanten für das H₂S-produzierende Enzym CSE, welches bei *Drosophila* von *Eip55E* kodiert wird. *Eip55E^{KGO2526}* Mutanten weisen einen vollständigen Verlust des Gedächtnisses auf (alle Genotypen n = 15). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 35 und Tab. 36 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

3.4. Verknüpfung des EBO/dSRF/dMRTF Signalweges mit NO und H₂S

Im Folgenden soll überprüft werden, ob eins der beiden Gasotransmitterproduzierenden Enzyme NOS oder CBS unter der regulatorischen Kontrolle des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF steht, welche in der *ebo* Mutante durch erhöhte Aktinakkumulation im Zellkern unterbunden wird (Abb. 22).

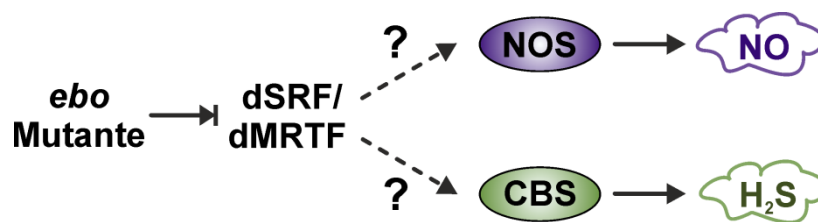


Abb. 22: Schematische Darstellung des zu untersuchenden Signalwegs. In der *ebo* Mutante akkumuliert Aktin im Zellkern und inhibiert so den Transkriptionskomplex dSRF/dMRTF. Auf diese Weise wird die Produktion eines diffusiblen Faktors unterbunden, welcher von den Enzymen NOS oder CBS hergestellt werden könnte.

Zuerst wurde der Zusammenhang von *ebo* und CBS mit Hilfe einer genetischen Interaktion untersucht. Für die genetische Interaktion wurde die Defizienz *Df(1)BSC708* (*Df(CBS)*; dos Santos et al., 2015; Cook et al., 2012) verwendet, welche unter anderem das Gen *Cbs* ausschneidet (Abb. 23A).

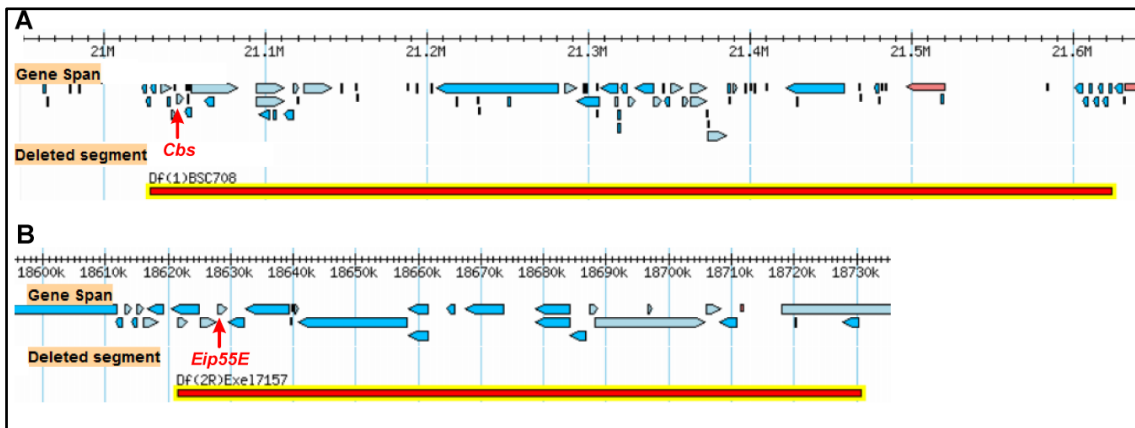


Abb. 23: Defizienzlinien für CBS und CSE. Df(1)BSC708 betrifft den *Cbs* Locus; Df(2R)Exel17157 deletiert *Eip55E* und betrifft CSE (verändert nach dos Santos et al., 2015).

Einfach heterozygote Tiere (ebo^{678}/X und Df(CBS)/X) zeigen ein wildtypisches, visuelles Orientierungsgedächtnis (Abb. 24A), wohingegen die doppelt heterozygoten Tiere ($ebo^{678}/Df(CBS)$) einen deutlichen Gedächtnisverlust aufweisen und nur noch zu 65 % auf die ursprüngliche Landmarke zurückkehren. Das parallele Experiment wurde ebenso mit CSE durchgeführt. Auch hier wurde eine Defizienzlinie *Df(2R)Exel17151* (Df(CSE); dos Santos et al., 2015; Cook et al., 2012) verwendet, welches das *Eip55E* Gen umfasst (Abb. 23B). Die einfach heterozygoten Tiere (ebo^{678}/X und Df(CSE)/II) zeigen ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis von 80 %. Kreuzt man jedoch doppelt heterozygote Tiere (ebo^{678}/X ; Df(CSE)/II), so zeigen diese einen vollständigen Verlust des Arbeitsgedächtnisses und laufen nur zu 65 % auf das ursprüngliche Ziel zurück. Diese beiden genetischen Interaktionsexperimente zeigen, dass sowohl CBS als auch CSE mit *ebo* in einem Signalweg interagieren.

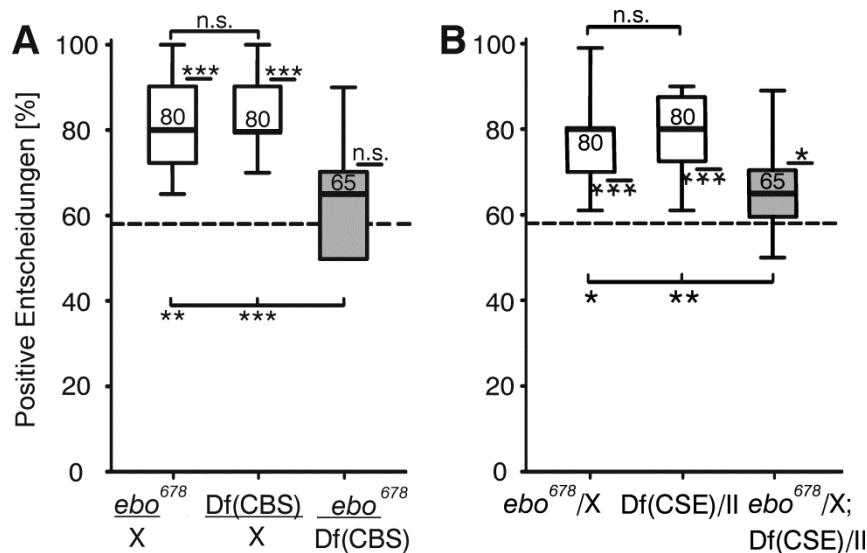


Abb. 24: Genetische Interaktion zwischen *ebo*⁶⁷⁸ und den Defizienzlinien für CBS und CSE. (A) Während die einfach heterozygoten Tiere ein wildtypisches Gedächtnis von 80 % aufweisen, unterscheiden sich die doppelt heterozygoten Tiere (*ebo*⁶⁷⁸/Df(CBS)) nicht vom Zufallsniveau (alle Genotypen n = 24). (B) Die heterozygoten Kontrollen zeigen ein wildtypisches Gedächtnis. Die doppelt heterozygoten Tiere zeigen jedoch ein stark reduziertes Orientierungsgedächtnis (alle Genotypen n = 20). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 37 und der Tab. 38 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Nach der Etablierung, dass EBO und die H₂S-produzierenden Enzyme CBS und CSE in einem Signalweg interagieren, sollte in einem nächsten Experiment überprüft werden, ob ein erhöhter H₂S-Level den *ebo* mutanten Gedächtnisphänotyp verbessern kann. Dazu wurde im *ebo*⁶⁷⁸ mutanten Hintergrund mit Hilfe eines UAS-*Cbs* Transgens (Kabil et al., 2011) CBS überexprimiert. Die wildtypischen CS Kontrolltiere laufen zu 80 % und die Kontrolltiere für das UAS-*Cbs* Transgen im *ebo* mutanten Hintergrund (*ebo*⁶⁷⁸/Y;; UAS-*Cbs*/III) laufen zu 60 % auf die Position der ursprünglichen Landmarken zurück (Abb. 25). Wurde *Cbs* spezifisch in den R3 Neuronen im *ebo* mutanten Hintergrund überexprimiert, so wird das defekte Orientierungsgedächtnis vollständig auf wildtypisches Niveau gerettet. Der defekte *ebo* Phänotyp wurde ebenfalls durch eine Überexpression von *Cbs* in den R2 Neuronen gerettet. Wie bereits lange vermutet (Kimura 2010), konnte hier erstmals in einem Verhaltensexperiment gezeigt werden, dass H₂S über Zellgrenzen hinweg die Gedächtnisleistung begünstigt.

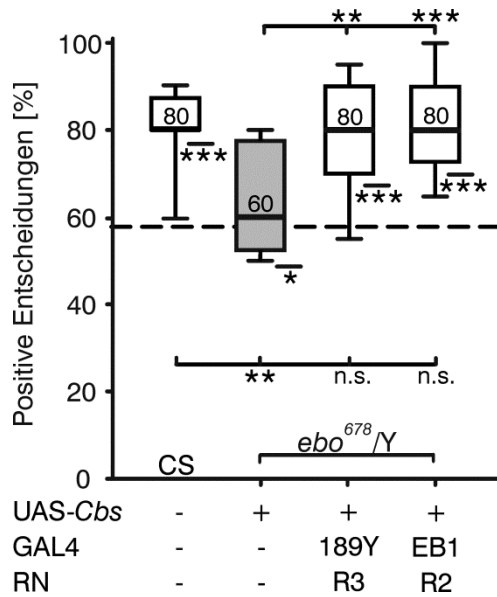


Abb. 25: Expression der *Cbs* cDNA in einem *ebo* mutanten Hintergrund. Während die Kontrolle für das UAS-Konstrukt (*ebo*⁶⁷⁸/Y;; UAS-*Cbs*/III) den *ebo* defizitären Gedächtnisphänotyp zeigt, führt die Expression in R3 Neuronen (189Y-GAL4) oder R2 Neuronen (EB1-GAL4) zur Rettung des *ebo* Phänotyps auf ein wildtypisches Gedächtnisniveau (alle Genotypen n = 24). Der Vergleich der Rettungstiere (*ebo*⁶⁷⁸/Y; 189Y/II; UAS-*Cbs*/III und *ebo*⁶⁷⁸/Y;; UAS-*Cbs*/EB1) gegen die jeweilige GAL4-Kontrolle im *ebo*⁶⁷⁸ mutanten Hintergrund (*ebo*⁶⁷⁸/Y; 189Y und *ebo*⁶⁷⁸/Y;; EB1) befindet sich im Anhang (Kapitel 8.3.2, Abb. 72 und Abb. 73). Die statistische Auswertung ist der Tab. 39 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9. Abkürzung: RN (Ringneuron).

Nach dem erfolgreichen genetischen Ansatz, die *ebo* Mutante durch die Überexpression von CBS zu retten, wurde als Nächstes ein pharmakologischer Ansatz gewählt. Die beiden Enzyme CBS und CSE sind an dem Transsulfuration-Signalweg beteiligt, in dem die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein metabolisiert werden und als Nebenprodukt H₂S entsteht (Paul und Snyder, 2012). Im folgenden Experiment soll untersucht werden, ob das Gedächtnisdefizit der *ebo* Mutante durch vermehrte Verfütterung einer Vorstufe der Aminosäure Cystein (N-Acetyl-L-Cystein) verbessert werden kann.

Erneut wurden eine Kontroll- und eine experimentelle Gruppe von *ebo*⁶⁷⁸/Y Tieren naiv im *Detour*-Paradigma getestet. Diese Tiere laufen zu 60 % im Median auf die ursprüngliche Landmarke zurück (Abb. 26). Anschließend wurden dieselben Tiere entweder 24 h über Nacht auf ein Saccharose-Medium oder auf ein Cystein-haltiges Medium (20 mM N-Acetyl-L-Cystein) gesetzt. Nach 24 h hatten alle Fliegen von der jeweiligen Lösung getrunken und wurden erneut im *Detour*-Paradigma auf ihr Orientierungsgedächtnis überprüft. Die Kontrollgruppe, welche über Nacht lediglich auf Saccharose saß, zeigt keine wesentlichen Veränderungen in Bezug auf ihr Arbeitsgedächtnis, während die experimentelle Gruppe, welche über Nacht auf dem Cystein-haltigen Medium saß, ein hoch signifikant besseres Gedächtnis zeigt und zu 80 % die Position der ursprünglichen Landmarke erinnert. Der *ebo* mutante Gedächtnisphänotyp konnte also durch die einfache Zufütterung einer Vorstufe von Cystein gerettet werden, was darauf hindeutet, dass durch die Erhöhung des Substrats Cystein der Umsatz von den verbleibenden CBS- und CSE-Enzymen erhöht wird und dies in einem höheren

H₂S-Level resultiert. Da eine erhöhte Menge H₂S den Gedächtnisverlust der *ebo* Mutante kompensieren kann, unterstützt dies die Hypothese, dass die Wirkung von H₂S der Funktion von EBO nachgeschaltet (*downstream*) ist.

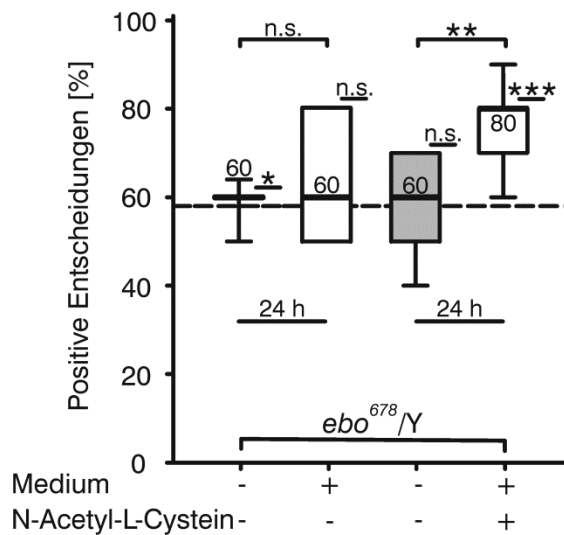


Abb. 26: Verfütterung der Aminosäure Cystein an die *ebo* Mutante. Dieselben Individuen wurden vor und nach der Behandlung ohne Cystein (Kontrollgruppe) oder mit 20 mM N-Acetyl-L-Cystein (experimentelle Gruppe) getestet (alle Gruppen n = 15). Die Kontrollgruppe, welche über Nacht auf einem Zuckermedium saß, zeigt den *ebo* mutanten Gedächtnisphänotyp. Durch die zusätzliche Fütterung von Cystein an die experimentelle Gruppe kann hingegen das defekte Gedächtnis der *ebo* Mutante auf wildtypisches Niveau gerettet werden. Die statistische Auswertung ist der Tab. 40 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Im letzten Abschnitt wurde die Verknüpfung von *ebo* und CBS/CSE in einem gemeinsamen Signalweg untersucht. Da jedoch nicht nur der diffusible Neuromodulator H₂S, sondern auch NO als wichtige Komponente des visuellen Orientierungsgedächtnisses identifiziert wurde, soll im Folgenden überprüft werden, ob *ebo* und NOS ebenfalls Bestandteile eines gemeinsamen Signalweges sind. Entsprechend der Hypothese (Zielsetzung, Kapitel 1.7) wird in der *ebo* Mutante Aktin im Zellkern akkumuliert und inhibiert so den Transkriptionskomplex dSRF/dMRTF, der ein Gasotransmitter-produzierendes Enzym reguliert (Abb. 22).

Mit Hilfe einer genetischen Interaktionsstudie wurde die Beteiligung von EBO und NOS an einem gemeinsamen Signalweg überprüft. Sowohl heterozygote Tiere für *ebo* (*ebo*^{678/X}) als auch heterozygote Tiere für *Nos* (*Nos*^{A15/II}) zeigen ein normales Orientierungsgedächtnis, da sie eine wildtypische Kopie des jeweiligen Gens tragen (Abb. 27). Doppelt heterozygote Tiere (*ebo*^{678/X}; *Nos*^{A15/II}) weisen mit einer Anlaufhäufigkeit der ursprünglichen Landmarke von 60 % jedoch einen kompletten Verlust des Arbeitsgedächtnisses auf und unterscheiden sich nicht vom Zufallsniveau. Die genetische Interaktion zeigt, dass EBO und NOS zusammen in einem Signalweg agieren.

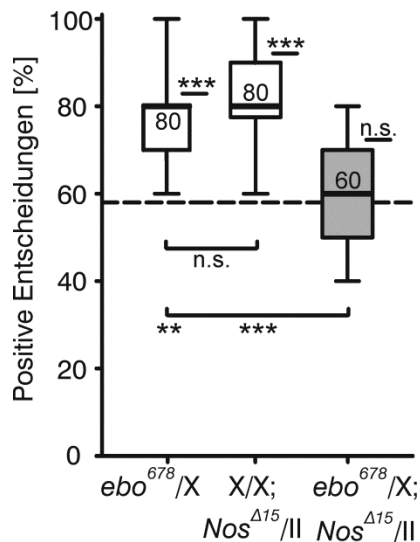


Abb. 27: Genetische Interaktion zwischen *ebo* und *Nos*. Die heterozygoten Kontrollen zeigen ein wildtypisches Gedächtnis. Die doppelt heterozygoten Tiere unterscheiden sich jedoch nicht vom Zufallsniveau (alle Genotypen n = 18). Die statistische Auswertung ist der Tab. 41 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Es wurde ebenfalls eine genetische Interaktion zwischen *Nos* und *dMrdf* getestet, um einen Zusammenhang zwischen den möglichen Transkriptionsaktivatoren (dSRF/dMRTF) und *Nos* herzustellen. Doppelt heterozygote Tiere dieser beiden Gene zeigen jedoch kein zielgerichtetes Anlaufverhalten auf eine Landmarke und konnten deswegen nicht im *Detour-Paradigma* auf ihr Orientierungsgedächtnis getestet werden. Um dieses Phänomen zu dokumentieren, wurden das Lauf- und Orientierungsverhalten der Tiere im *Buridan-Paradigma* überprüft. Während die einfach heterozygoten Tiere ein normales Anlaufverhalten auf die Landmarken zeigen, ist dies bei den doppelt heterozygoten Tieren deutlich verschlechtert (Anhang Kapitel 8.4.1; Abb. 77). Dieses Ergebnis zeigt also durchaus eine genetische Interaktion dieser beiden Gene an, jedoch konnte die Relevanz dieser nicht für das Orientierungsgedächtnis gezeigt werden.

Parallel zu den Rettungsexperimenten, die mit CBS durchgeführt wurden, sollte nun experimentell untersucht werden, ob das defekte Arbeitsgedächtnis von *ebo* auch durch einen erhöhten Level von NOS und somit NO gerettet werden kann. Die Kontrolle des UAS-*Nos* Konstrukts im *ebo* mutanten Hintergrund ($ebo^{678}/Y; UAS-Nos/II; UAS-Nos/III$) ist hoch signifikant schlechter als der Wildtyp CS. Wird *Nos* in den R3 Neuronen überexprimiert ($ebo^{678}/Y; UAS-Nos/189Y; UAS-Nos/III$), so kann jedoch ein wildtypisches Gedächtnis von 80 % wiederhergestellt werden. Eine vollständige Rettung des *ebo* defizitären Gedächtnisses kann ebenfalls durch die Überexpression von *Nos* in R2 Neuronen erreicht werden. Dieses Experiment zeigt, dass NO, welches von NOS in den R2 Neuronen produziert wird, nun über Zellgrenzen hinweg diffundieren kann und dort die Gedächtnisleistung unterstützt. Der *ebo* defekte Phänotyp kann also

durch die Überexpression von NOS sowohl in R3 als auch in R2 Neuronen gerettet werden, was die oben genannte Hypothese, dass dSRF und dMRTF die Transkription von *Nos* regulieren, unterstützt.

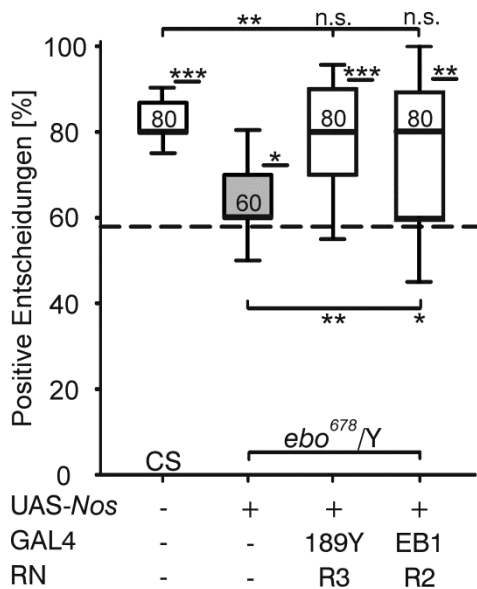


Abb. 28: Expression der *Nos* cDNA in einem *ebo* mutanten Hintergrund. Während die Kontrolle für das UAS-Konstrukt (*ebo*⁶⁷⁸/*Y*; UAS-*Nos*/II; UAS-*Nos*/III) den *ebo* defizitären Gedächtnisphänotyp zeigt, führt die Expression von NOS in R3 Neuronen (189Y-GAL4) und R2 Neuronen (EB1-GAL4) zur Rettung des *ebo* Phänotyps auf wildtypisches Gedächtnisniveau (alle Genotypen n = 24). Der Vergleich der Rettungstiere (*ebo*⁶⁷⁸/*Y*; 189Y/UAS-*Nos*; UAS-*Nos*/III und *ebo*⁶⁷⁸/*Y*; UAS-*Nos*/II; UAS-*Nos*/EB1) gegen die jeweilige GAL4-Kontrolle im *ebo*⁶⁷⁸ mutanten Hintergrund (*ebo*⁶⁷⁸/*Y*; 189Y und *ebo*⁶⁷⁸/*Y*; EB1) befindet sich im Anhang (Abb. 72 und Abb. 73). Die statistische Auswertung ist der Tab. 42 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9. Abkürzung: RN (Ringneuron).

Die Rettung des *ebo* defekten Gedächtnisphänotyps durch die Überexpression von NOS unterstützt die oben genannte Hypothese, dass dSRF/dMRTF die Transkription von *Nos* reguliert. Dieser Zusammenhang sollte nun auch auf dem Proteinlevel untersucht werden, indem der NOS-Expressionslevel in *ebo* Tieren im Vergleich zum Wildtyp analysiert wurde.

Als Vergleich zur *ebo* Mutante (*ebo*⁶⁷⁸/*Y*; 189Y/II; mCD8::GFP/III) wurden als Kontrolle die heterozygoten *ebo* Tiere (*ebo*⁶⁷⁸/*X*; 189Y/II; mCD8::GFP/III) gewählt. Neben der NOS-Expression (magenta) wurden die R3 Neurone zusätzlich mit GFP visualisiert (grün; Abb. 29A). Es wurden die Pixelintensitäten für NOS und GFP in den R3 Neuronen bestimmt und anschließend diese in Relation zueinander gesetzt (Abb. 29B). Die heterozygoten Kontrolltiere zeigen die wildtypische Form des Ellipsoidkörpers und eine deutliche NOS-Färbung der R3 Neurone, während im *ebo* mutanten Hintergrund der Ellipsoidkörper die typische Verformung mit einer ventralen Öffnung (Strauss und Heisenberg, 1993) zeigt, jedoch auch eine deutliche NOS-Färbung des Ellipsoidkörpers zu erkennen ist. Diese erscheint weniger punktuell und geordnet, jedoch liegt keine signifikante Reduzierung der NOS-Expression in der Mutante vor (Abb. 29B; p = 0.051).

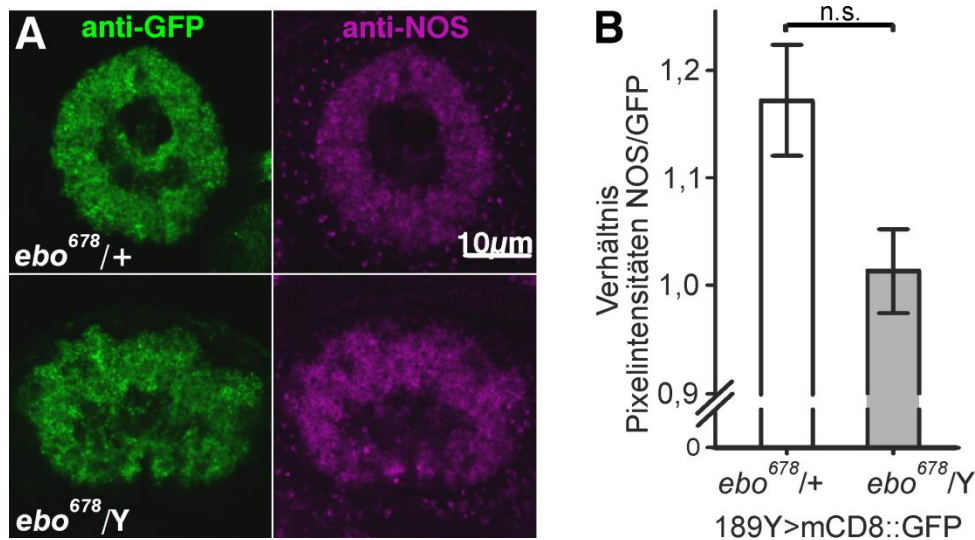


Abb. 29: Analyse der NOS-Expression in *ebo*⁶⁷⁸ Mutanten und heterozygoten *ebo*⁶⁷⁸/Y Kontrolltieren. (A) Die GFP-Expression (grün) in den R3 Neuronen wurde als Referenzfärbung für die Quantifizierung des NOS-Signals (magenta) genommen; optische Schichtdicke 1,5 µm. (B) Die Relation von NOS/GFP ist in den *ebo* Mutanten leicht reduziert, jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0.051$; alle Genotypen $n = 4$). Die statistische Auswertung ist der Tab. 43 im Anhang zu entnehmen. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler.

Mit der Intention auf einen stärkeren Phänotyp wurden ebenfalls Färbungen der Mutanten mit den jeweiligen hypomorphen Allelen *bs*² oder *Mrtf*^{A7} angefertigt. Auch hier ist eine NOS-Färbung im Ellipsoidkörper zu erkennen. Diese ist jedoch nicht quantitativ auszuwerten, da die Gehirne dieser Mutanten, deren Gene an der Aktinregulation maßgeblich beteiligt sind (Salvany et al., 2014), keine homogene Färbung aufweisen. Weder die spezifische NOS-Färbung, noch Kontrollfärbungen gegen Bruchpilot (anti-nC82) oder gegen Fasciclin II (anti-1D4) zeigen eine einheitliche Färbung des Gewebes. Außerdem ist die strukturelle Beschaffenheit der Gehirne äußerst instabil und daher nicht zuverlässig quantifizierbar.

Um die Hypothese, dass der Komplex aus dSRF/dMRTF an der Regulation von *Nos* beteiligt ist, weiter zu überprüfen, wurde versucht, eine ektopische NOS-Expression durch die Überexpression von dSRF oder dMRTF zu induzieren. Die Voraussetzung für eine ektopische Expression ist in den R2 Neuronen (EB1-GAL4) gegeben, da diese keine endogene NOS-Expression zeigen (Abb. 30A; *merge*). Überexprimiert man den Transkriptionsfaktor dSRF (UAS-*dSrf*; Han et al., 2004) in den R2 Neuronen, so ist keine deutliche Zunahme der NOS-Färbung zu sehen (Abb. 30B). Quantifiziert wurden sowohl ein definierter Bereich der R2 als auch der R3 Neurone. Die Anzahl der Bilder in der z-Projektion wurde an der gesamten GFP-Färbung in den R2 Neuronen ausgerichtet. Es wurden zwei verschiedene Auswertungen durchgeführt. Der Vergleich

der Summe aller Pixelintensitäten (siehe Methodenteil Kapitel 2.4) der „Punktewolke“ in der Region der R2 Neurone ergab zwischen den Kontrolltieren (EB1 > GFP) und den Überexpressionstieren (EB1 > GFP + *dSrf*) keinen signifikanten Unterschied (je n = 4; p = 0,922; die statistische Auswertung ist der Tab. 44 im Anhang zu entnehmen). Als Zweites wurde die Intensität der Gesamtheit der R2 und R3 Neurone in Relation zu den R3 Neuronen gesetzt [(R2+R3)/R3]. Auch bei dieser Auswertung konnte kein statistischer Unterschied gefunden werden (je n = 4; p = 0,640; die statistische Auswertung ist der Tab. 45 im Anhang zu entnehmen). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die „Punktewolke“ (in der Region der R2 Neurone) um die endogene Expression von NOS in den R3 Neuronen etwas dichter geworden ist. Dies konnte nicht eindeutig quantifiziert werden, da bei der Messung der Graustufen der Anteil der schwarzen Pixel (keine Färbung) um ein vielfaches höher ist als der Anteil der Pixel mit Grauwerten (NOS-Färbung). Ein zuverlässiges Zählen der punktuellen Färbung war ebenfalls nicht möglich, da aufgrund der Auflösungsgrenze teilweise einzelne Strukturen nicht zuverlässig voneinander getrennt werden konnten.

Auch die Überexpression von dMRTF (UAS-*dMrnf*; Somogyi und Rørth, 2004) in den R2 Neuronen ruft keine offensichtlich induzierte NOS-Expression hervor (Abb. 30C). Da die Überexpression von dMRTF auch keinen offensichtlichen Effekt auf die NOS-Expression hatte, wurde eine ausführliche Quantifizierung nur am Beispiel der Überexpression von dSRF durchgeführt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sich keine ektopische oder zusätzliche NOS-Expression durch die Überexpression der Transkriptionsfaktoren dSRF oder dMRTF induzieren lässt.

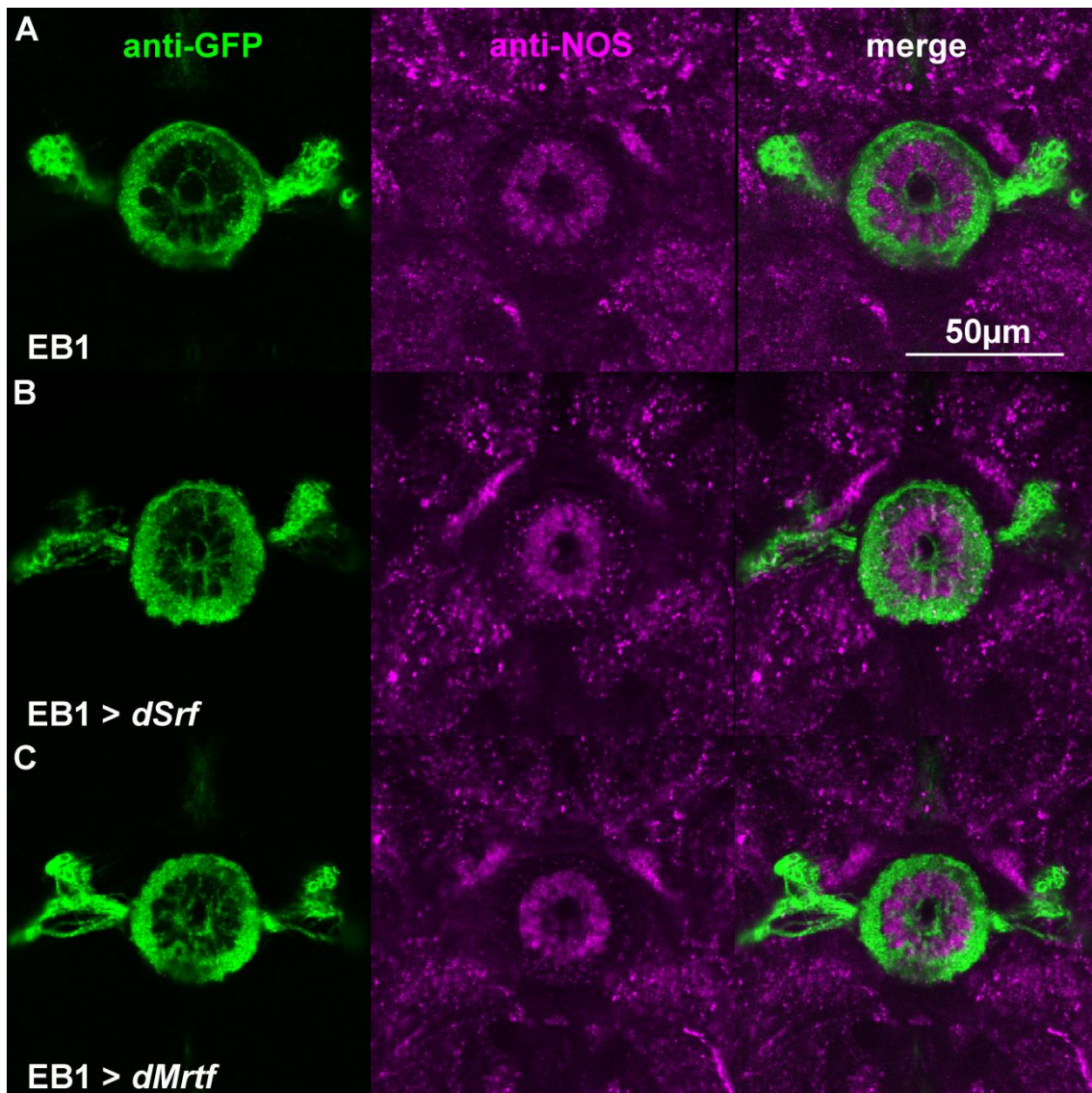


Abb. 30: Ektopische Überexpression von NOS in R2 Neuronen. (A) Visualisierung von R2 Neuronen (EB1>GFP; grün) und der endogenen NOS-Expression (magenta). Es ist keine Kolokalisation zu beobachten. (B) Die Überexpression des Transkriptionsfaktors *dSrf* induziert keine ektopische NOS-Expression in den R3 Neuronen. (C) Auch die Überexpression des Kofaktors dMRTF hat keine zusätzliche NOS-Expression in R2 Neuronen zur Folge. Es ist jeweils ein einzelner optischer Schnitt (0,75 µm) auf Höhe der breitesten GFP (R2 Neurone)-Expression zu sehen.

Die panneurale Überexpression des Transkriptionsfaktors dSRF wurde auch in einer *Western-Blot* Analyse untersucht (Abb. 31). Es wurde das NOS-Expressionslevel visualisiert und als Ladungskontrolle wurde das Protein HSP90 ausgewählt. Anschließend wurde das Verhältnis der Pixelintensitäten von NOS-zu-HSP90 für jeden Genotyp berechnet. Das Verhältnis steigt aufgrund der Überexpression von dSRF um etwa 38 % hoch signifikant ($n = 5$; $p = 0,002$) gegenüber der Kontrolle an.

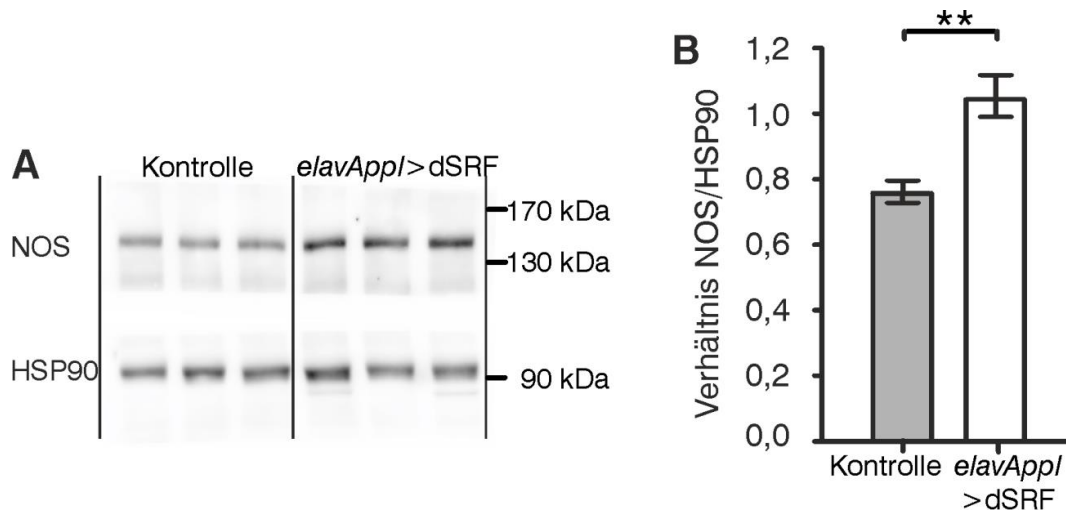


Abb. 31: Western-Blot Analyse der panneuralen Überexpression von dSRF. (A) In einem 6 %igem Gel wurden Kopfextrakte von 10 Fliegen pro Spur geladen. Sowohl von der Kontrolle (*elavApp1*-GAL4) als auch von der Überexpression (*elavApp1*-GAL4 > UAS-*dSrf*) wurden jeweils fünf unabhängige Stichproben hergestellt. Immunochemische Färbungen wurden mit Antikörpern gegen NOS und HSP90 durchgeführt. (B) Quantifizierung des Verhältnisses NOS/HSP90 in der Pixelintensität pro Genotyp. Das Verhältnis NOS/HSP90 ist durch die Überexpression von dSRF um etwa 38 % hoch signifikant angestiegen ($p = 0,002$). Die statistische Auswertung ist der Tab. 46 im Anhang zu entnehmen. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler.

Da in der *Western-Blot* Analyse die panneurale Überexpression von dSRF zu erhöhter NOS-Expression geführt hat (Abb. 31), in der Histologie die gezielte Überexpression der einzelnen Transkriptionsfaktoren dSRF oder dMRTF jedoch keine erhöhte NOS-Expression mit sich führte (Abb. 30), wurde zusätzlich eine Rekombinante dieser beiden Transkriptionsfaktoren hergestellt (Validierung der Rekombinante: Anhang Kapitel 8.1; Abb. 66). Die beiden Transkriptionsfaktoren wurden anschließend mit Hilfe des panneuralen GAL4 Treiber *elav* (*elav*-GAL4 > UAS-*dSrf* + *dMrtf*) überexprimiert (Abb. 32). Es wurde die Relation der NOS-Expression mit der Stärke des GFP-Signals im Ellipsoidkörper verrechnet, um methodische Variationen in der Qualität der Antikörperfärbungen zu minimieren. Die definierte Region für die Bestimmung der Pixelintensitäten umfasste 20 aufeinanderfolgende, optische Schnitte (15 μ m) mit der breitesten GFP-Expression des Ellipsoidkörpers. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrolltieren (*elav* GFP) und den Überexpressionstieren (*elav* GFP > UAS-*dSrf* + *dMrtf*) festgestellt werden (je $n = 6$; $p = 0,115$; die statistische Auswertung ist der Tab. 47 im Anhang zu entnehmen).

Die histologische Quantifizierung der Präparate ist schwierig, da *elav* zwar im gesamten Gehirn exprimiert wird, speziell im Ellipsoidkörper aber kein hohes

Expressionslevel aufweist. Nach Maßgabe der Methode kann auch in diesem Experiment kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und der Überexpression gefunden werden. Sowohl die GFP-Kontrollfärbung als auch die spezifische NOS-Färbung fallen in der Kontrolle wesentlich schwächer aus. Des Weiteren ist keine auffällige ektopische Expression von NOS im restlichen Gehirn durch den panneuralen Treiber zu beobachten. Es konnte somit in allen histologischen Präparaten keine Manipulation des NOS-Levels durch Überexpression der Transkriptionsfaktoren erzielt werden, was darauf hindeutet, dass *Nos* nicht unter der transkriptionalen Kontrolle von dSRF/dMRTF steht.

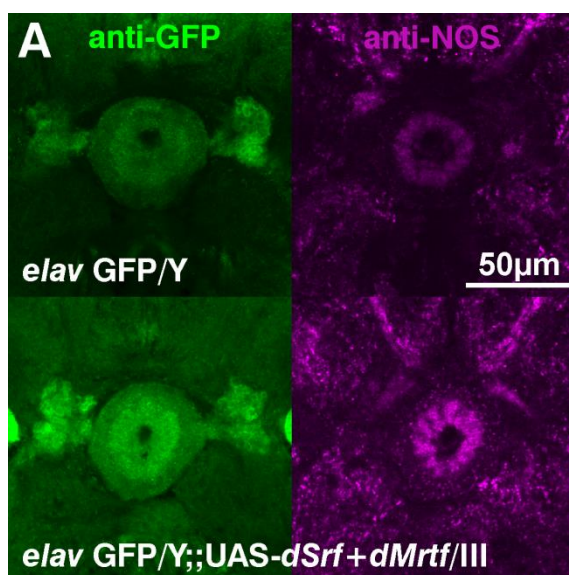


Abb. 32: Panneurale Überexpression des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF führt zu keiner erhöhten NOS-Expression. Die Quantifizierung im Ellipsoidkörper ergab keinen statistischen Unterschied ($p = 0,115$; $n = 6$; Anhang Tab. 47) zwischen der Kontrolle (*elav GFP*) und der Überexpression (*elav GFP > dSrf + dMrtf*); optische Schichtdicke der dargestellten Bilder ist $3,75 \mu\text{m}$.

Da auch die Überexpression des H_2S -produzierenden Enzyms CBS das *ebo* defekte Arbeitsgedächtnis retten kann, sollte in einem weiteren Experiment ebenfalls die Regulation von CBS und/oder CSE durch die Transkriptionsfaktoren dSRF/dMRTF untersucht werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde eine Analyse der Enzymaktivitäten in einem nativen Gel durchgeführt. Proteinextrakte der Genotypen CS, *ebo*⁶⁷⁸, *elav > UAS-Cbs* und *elav > UAS-dSrf + dMrtf* wurden in einem nativen Gel aufgetrennt und anschließend wurde die Aktivität der Enzyme CBS und CSE anhand von einer Farbreaktion verdeutlicht (Abb. 33A). Die Farbreaktion gilt als Maß für die Enzymaktivität.

Beide H_2S -produzierende Enzyme bilden Enzymkomplexe. Eine Analyse der Kristallstruktur von *Drosophila* CBS ergab, dass dieses als Dimer vorliegt (Koutmos et al., 2010). Für CSE liegt dagegen nur eine Analyse des humanen CSE vor, welches einen Komplex als Tetramer bildet (Sun et al., 2009). Da im nativen Gel keine

denaturierenden Substanzen eingesetzt werden, ist die Auftrennung dieser Holoenzyme schwierig und es ergeben sich keine scharfen Proteinbanden. Eine Größenordnung anhand einer Proteinleiter war ebenfalls schwierig, so dass die Überexpression von CBS zur Identifizierung der CBS-Bande genutzt wurde. CSE wurde anhand der Mutante *Eip55E* identifiziert (Daten nicht gezeigt). Im dargestellten Beispiel ist zu sehen, dass im Allgemeinen die Aktivität von CBS wesentlich höher ist als die von CSE. Außerdem ist bei *ebo*⁶⁷⁸ im Vergleich zum Wildtyp CS sowohl eine leichte Reduzierung der CSE- als auch der CBS-Aktivität um etwa 10 % bzw. 20 % zu beobachten (Abb. 33B und C). Auch die panneurale Überexpression der Transkriptionsfaktoren dSRF/dMRTF zeigt Wirkung: Die CSE-Aktivität steigt um etwa 14 % an, die Aktivität von CBS steigt um das 1,6 fache der CS Enzymaktivität.

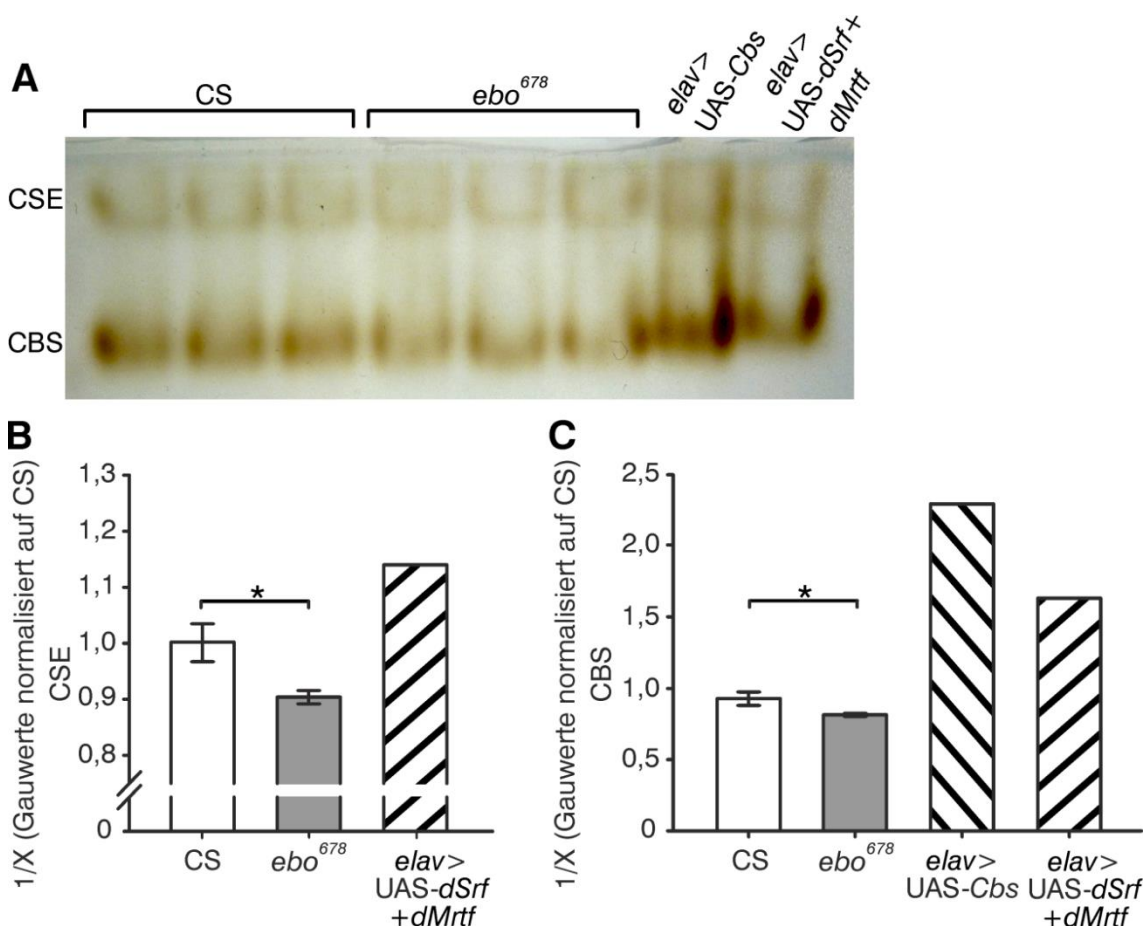


Abb. 33: Enzymaktivität von CBS und CSE im nativen Gel (8 %). (A) Es wurden 30 Fliegen (2 Tage alt) pro Spur geladen. Bei den biologischen Replikaten von CS und *ebo*⁶⁷⁸ handelt es sich um unabhängige Stichproben. Die Spur mit der Überexpression von CBS (*elav* > UAS-Cbs) enthält nur 20 Fliegen. (B) Es wurden die Grauwerte der einzelnen Banden für CSE bestimmt und auf die Werte von CS normalisiert (CS und *ebo*⁶⁷⁸ n = 3). (C) Bestimmung der Färbung für CBS wie in B. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dargestellt. Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 48 zu entnehmen.

Leider zeigten die Versuche zur Enzymaktivität keine Konstanz und konnten nicht gleichmäßig reproduziert werden. Das exakte Alter der Fliegen, der Hungerzustand und bei Weibchen eventuell auch der hormonale Zustand scheinen den Aminosäurehaushalt und damit einhergehend auch die Aktivität beteiligter Enzyme maßgeblich zu beeinflussen. Außerdem stellte die kontrollierte und einheitliche Extraktion der Proteine eine große Schwierigkeit dar, da ohne starke Detergenzien der Zellaufschluss in den Homogenaten nicht einheitlich gelingt und deshalb die Menge der extrahierten Proteine vermutlich stark variiert. Weder eine Kontrollfärbung von undefinierten Proteinbanden mit Ponceau S oder Brilliant Blue S führten zu einem befriedigenden Ergebnis, noch der Einsatz von Extraktionssäulen für native Gele („*Total Protein Extraction Kit*“, Invent Biotechnologies Inc., #SN-002). Dieser experimentelle Ansatz zur Quantifizierung der Enzymaktivität wurde deswegen nicht weiterverfolgt.

Die Regulation von NOS, CSE und/oder CBS durch dSRF/dMRTF wurde deswegen auch in einem weiteren, unabhängigen Experiment auf dem Level der mRNA mit Hilfe einer quantitativen PCR (RT-qPCR) überprüft werden. Es wurde der Expressionsunterschied zwischen der Kontrolle (*elav-GAL4*) und der panneuralen Überexpression des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF (*elav-GAL4 > UAS-dSrf + dMrtf*) analysiert. Als Kontrollgen wurde das ribosomale Gen *rp49* gewählt und auf dessen Expressionsstärke wurden die Daten normalisiert (Abb. 34). Die Ergebnisse zeigen große Schwankungen, besonders bei der Analyse der *Nos* mRNA. Für CBS und NOS sind minimale Anstiege zu beobachten, während der mRNA-Level von CSE durch die Überexpression von dSRF/dMRTF tendenziell leicht abnimmt. Es sind jedoch keine statistischen Unterschiede erkennbar, was gegen die regulatorische Kontrolle eines der drei Gene durch den Transkriptionskomplex dSRF/dMRTF spricht.

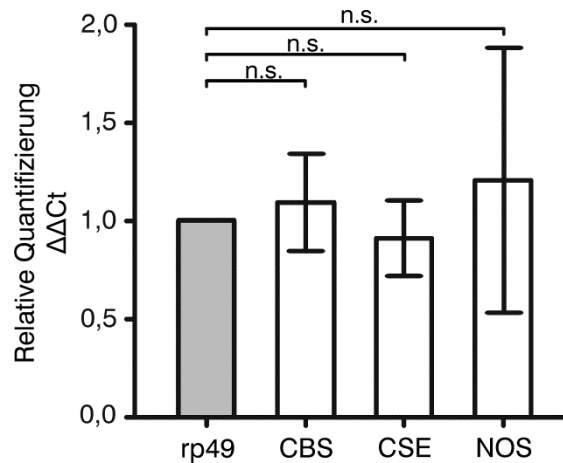


Abb. 34: Analyse der RT-qPCR-Daten nach Überexpression von dSRF/dMRTF (*elav GFP > dSrf + dMrtf*) im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle (*elav GFP*). Pro Probe wurde mit 400 ng RNA gearbeitet und es wurden drei unabhängige biologische Replikate ausgewertet. Als Kontrollgen wurde *rp49* gewählt und auf 1 nivelliert. Die normalisierten Daten von CBS, CSE und NOS zeigen kein erhöhtes Expressionslevel nach Überexpression des Transkriptionskomplexes. Die statistische Auswertung ist der Tab. 50 im Anhang zu entnehmen. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler.

In einem weiteren Versuch wurde die Hypothese, ob die panneurale Überexpression von dSRF/dMRTF zu einem erhöhten NOS- oder CBS-Level führt, auf Proteinebene erneut in einem *Western Blot*-Experiment untersucht. Leider gibt es gegen CBS und CSE keine *Drosophila* spezifischen Antikörper. Allerdings zeigt ein Serum gegen das humane CBS eine Kreuzreaktion mit *Drosophila* CBS, welches sich für eine *Western Blot*-Analyse eignet (Anhang Kapitel 8.2.2, Abb. 70). Bekannt ist bereits, dass der SRF/MRTF-Komplex sowohl bei Vertebraten als auch bei *Drosophila* ein zentraler Regulator des globulären Aktins ist (Salvany et al., 2014).

Als Positivkontrolle für die Überexpression (*elav-GAL4 > UAS-dSrf + dMrtf*) wurde daher der Aktinlevel bestimmt, welcher im Gegensatz zur Kontrolle (*elav-GAL4*) signifikant um 29 % erhöht ist (Abb. 35; $p = 0,010$). Als weitere Positivkontrolle wurde der Proteinlevel von HSP90 bestimmt. In einer *ChiP-seq* Analyse in den Ovarien von *Drosophila* waren viele *heat shock*-Proteine identifiziert worden, die von dMRTF reguliert werden, darunter auch das Level des *Hsp83* Gens (Salvany et al., 2014), das *Drosophila* Ortholog zum humanen *Hsp90* Gen (dos Santos et al., 2015). In der *Western Blot*-Analyse kann eine leichte, aber signifikante Steigerung der HSP83-Expression um 22 % beobachtet werden (Abb. 35; $p = 0,047$). Entsprechend der histologischen Ergebnisse (Abb. 30, Abb. 32) zeigt das Expressionsniveau von NOS einen Anstieg (15 %; $p = 0,096$), der jedoch nicht signifikant durch die panneurale Überexpression

von dSRF/dMRTF beeinflusst wurde. Betrachtet man jedoch den CBS-Level, wird eine höchst signifikante Steigerung von 13 % ($p < 0,001$) induziert. Zur Quantifizierung (Abb. 35B) wurde nur die Summe der Pixelintensitäten miteinander verglichen, da die herkömmlichen Ladungskontrollen (Aktin, HSP90) durch die Überexpression ebenfalls hochreguliert wurden.

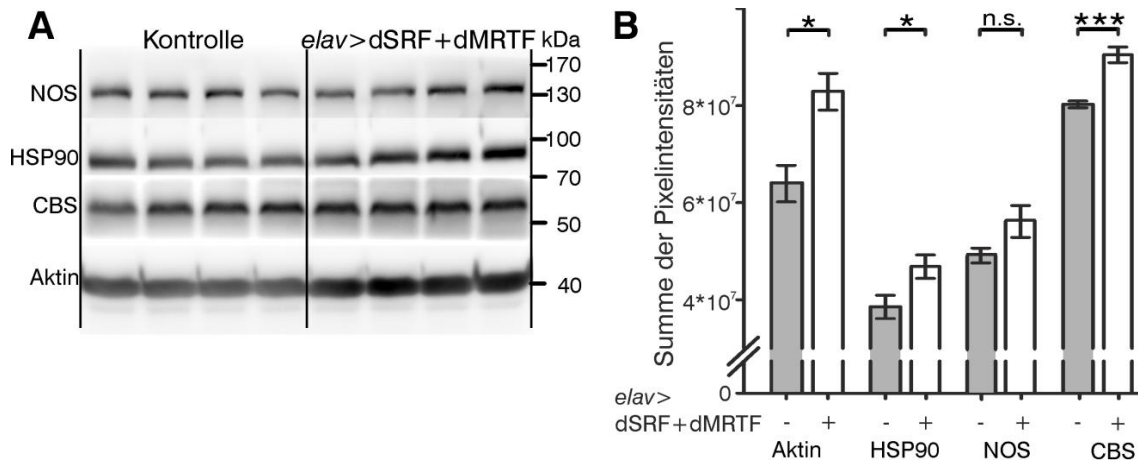


Abb. 35: Western Blot-Analyse nach panneuraler Überexpression von dSRF/dMRTF (*elav GFP > dSrf + dMrtf*) und der entsprechenden Kontrolle (*elav GFP*). (A) In einem 10 %igem Gel wurden Kopffextrakte von 15 Fliegen pro Spur geladen. Jeder Genotyp ist durch vier unabhängige Stichproben repräsentiert. Immunochemische Färbungen wurden mit Antikörpern gegen NOS, HSP90, CBS und Aktin durchgeführt. (B) Quantifizierung der Summe aller Pixelintensitäten pro Genotyp und pro Protein. Die Expression der Kontrollproteine HSP90 und Aktin sind um 29 % ($p = 0,010$) bzw. 22 % ($p = 0,047$) signifikant erhöht. Das NOS-Level steigt um 15 % an, zeigt jedoch keine Signifikanz ($p = 0,096$), wohingegen CBS nach Überexpression von dSRF/dMRTF um 13 % höchst signifikant ansteigt ($p < 0,001$). Die statistische Auswertung ist der Tab. 49 im Anhang zu entnehmen. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler.

Der Zusammenhang des EBO/dSRF/dMRTF Signalweges und NOS bzw. CBS/CSE kann nicht eindeutig geklärt werden. Die genetischen Interaktionen und Rettungsexperimente im Verhaltensparadigma zeigen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen *ebo* und NOS (Abb. 27) bzw. *ebo* und CBS/CSE (Abb. 24). Auch die Überexpression von NOS oder CBS kann das Gedächtnisdefizit der *ebo* Mutante retten und zeigt außerdem, dass sowohl NO als auch H₂S über Zellgrenzen hinweg die Gedächtnisleitung begünstigen (Abb. 25; Abb. 28). Ein regulatorischer Zusammenhang von dSRF/dMRTF auf das *Nos* Gen kann auf Proteinebene weder in der Histologie (Abb. 29; Abb. 30; Abb. 32) noch im *Western-Blot* (Abb. 35) bestätigt werden. Auch auf der Ebene der mRNA wurde dieser Zusammenhang für das *Nos* Gen nicht sichtbar (Abb. 34). Die Regulation von *Cbs* durch dSRF/dMRTF konnte auf Ebene der mRNA in einem qPCR-Experiment nicht nachgewiesen werden (Abb. 34). Auf Proteinebene

wurden Experimente zur Enzymaktivität und eine *Western Blot*-Analyse durchgeführt. Eine Transkriptionskontrolle von *Cbs* oder *Eip55E* (CSE) durch dSRF/dMRTF konnte tendenziell in der Analyse der Enzymaktivität beobachtet werden, jedoch war keine stabile Reproduktion der Ergebnisse möglich (Abb. 33). Die Regulation von *Cbs* durch dSRF/dMRTF konnte jedoch im *Western Blot*-Experiment bestätigt werden (Abb. 35).

3.5. Der cGMP-Level in den R3 Neuronen ist essentiell für das Orientierungs-gedächtnis

Sowohl die Überexpression von *Nos* (Abb. 28), als auch die Überexpression von *Cbs* (Abb. 25) kann den Verhaltensdefekt von *ebo*⁶⁷⁸ retten, was darauf hindeutet, dass der NO- und der H₂S-Signalweg zusammenführen. Verfolgt man die postulierten Signalwege dieser beiden Gase, so gibt es eine gemeinsame Schnittstelle: Beide Signalwege können den cGMP-Level der Zelle modulieren. NO aktiviert maßgeblich die lösliche Guanylylzyklase (sGC; *soluble guanylyl cyclase*) und fördert somit die Zyklisierung von GMP zu cGMP (Hardingham et al., 2013). Die Rolle von H₂S in neuronalen Netzwerken ist hingegen weniger gut untersucht (Kimura, 2010), jedoch zeigt eine Studie, dass H₂S im kardio-vaskularen System die cGMP-abhängige Phosphodiesterase (cGMP-PDE) hemmt (Bucci et al., 2010), welche für den Abbau von cGMP verantwortlich ist. Daraus folgt die Arbeitshypothese, dass die Regulation des cGMP-Levels entscheidend ist und dass ein adäquater cGMP-Level in den R3 Neuronen ausschlaggebend für ein funktionsfähiges Arbeitsgedächtnis ist. Bei *Drosophila* gibt es nur eine cGMP spezifische PDE, die PDE6 (Day, 2005). Das Allel *Pde6*^{Mi04678} trägt ein Minos-Element im zweiten Intron, jedoch vor dem ersten Exon des *Pde6* Gens (dos Santos et al., 2015). *Pde6* wurde in einem RNAi-Screen aufgrund eines reduzierten olfaktorischen Kurzzeitgedächtnisses von 3 Stunden identifiziert (Walkinshaw et al., 2015). In einer weiteren Studie wurde *Pde6* als Kandidatengen für ein reduziertes aggressives Verhalten von *Drosophila* beschrieben (Shorter et al., 2015).

Homozygote *Pde6*^{Mi} Fliegen laufen im *Detour*-Paradigma zu 85 % auf die ursprüngliche Landmarke zurück (Abb. 36A). Damit unterscheiden sie sich nicht vom Wildtyp CS, zeigen jedoch tendenziell ein leicht verbessertes Orientierungsgedächtnis als dieser. Um auch für *Pde6* den Zusammenhang zur *ebo* Mutante und um die Rolle im Orientierungsgedächtnis zu klären, wurden erneut genetische Interaktionen zwischen den beiden Genen durchgeführt. Die einfach heterozygoten Tiere (*Pde6*^{Mi}/III) verhalten sich wildtypisch, da sie zu 80 % auf den ursprünglichen Balken zurückkehren (Abb.

36B). Als weitere Kontrolle wurden hemizygot *ebo*⁶⁷⁸ Männchen getestet, die mit 65 % positiven Entscheidungen ein defektes Orientierungsgedächtnis aufweisen. Befindet sich in diesen hemizygot mutanten Männchen zusätzlich eine Kopie des mutanten *Pde6*^{Mi} Allels (*ebo*⁶⁷⁸/Y;; *Pde6*^{Mi}/III), so zeigen die Fliegen ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis von 80 %. Die Verminderung der PDE6 Aktivität kann also den *ebo* Verhaltensdefekt retten. Es wurde ein weiteres ähnliches, aber präziseres Experiment durchgeführt. Im *ebo* mutanten Hintergrund wurde ein RNAi-Konstrukt gegen die PDE6 (Ni et al., 2008) ausschließlich in den R3 Neuronen exprimiert (*ebo*⁶⁷⁸/Y; 189Y/II; *Pde6*RNAi/III; Abb. 36C). Im Gegensatz zur Kontrolle (*ebo*⁶⁷⁸/Y; 189Y/II), welche kein Orientierungsgedächtnis aufweist, zeigen die *knock-down* Tiere eine hoch signifikante Verbesserung der Orientierungsleistung auf 70 %, welche sich höchst signifikant vom Zufallsniveau unterscheidet. Durch den *knock-down* von PDE6 in den R3 Neuronen kann zumindest eine partielle Rettung des *ebo* Gedächtnisphänotyps erreicht werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass der cGMP-Level in den R3 Neuronen essentiell für ein funktionsfähiges Arbeitsgedächtnis ist.

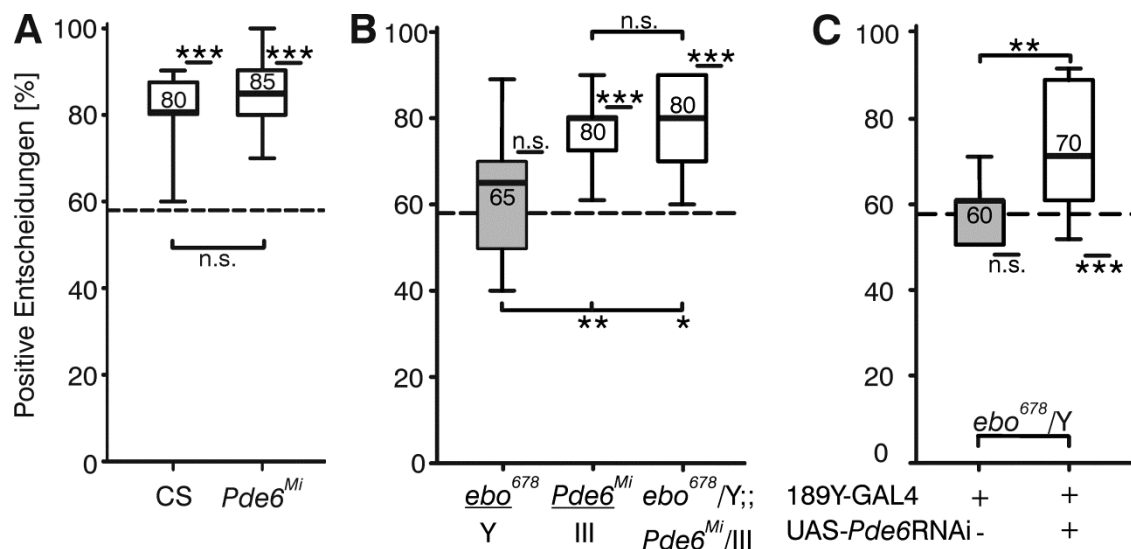


Abb. 36: Die PDE6 wird in den R3 Neuronen für das Orientierungsgedächtnis benötigt. (A) Mutanten der PDE6 (*Pde6*^{Mi04678}) zeigen ein wildtypisches Gedächtnis (alle Genotypen n = 24). (B) Genetische Interaktion zwischen *ebo* und *Pde6*^{Mi}. *ebo*⁶⁷⁸ Mutanten unterscheiden sich nicht vom Zufallsniveau und heterozygote *Pde6* Fliegen zeigen ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis. Eine Kopie des mutanten *Pde6*^{Mi} Allels im hemizygoten *ebo*⁶⁷⁸ Hintergrund rettet den Gedächtnisdefekt von *ebo* vollständig (alle Genotypen n = 20). (C) Reduzierung der PDE6 mRNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) im *ebo*⁶⁷⁸ mutanten Hintergrund rettet den Gedächtnisphänotyp im Vergleich zur Kontrolle (UAS-*Pde6*RNAi) partiell (alle Genotypen n = 20). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 51 bis Tab. 53 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Im Folgenden wurden diese Erkenntnisse durch einen pharmakologischen Ansatz überprüft. Als Inhibitor gegen die PDE6 wurde das Pharmakon Zaprinast gewählt, welches hochspezifisch für die cGMP-PDE gegenüber der cAMP-PDE ist (Day, 2005). Erneut wurden *ebo*⁶⁷⁸ Tiere in eine Kontrollgruppe und eine experimentelle Gruppe eingeteilt. Die Kontrollgruppe hatte als Futterquelle über Nacht ausschließlich ein Saccharose-haltiges Medium zur Verfügung (analog wie in Abb. 26). Dieselben Tiere wurden naiv und nach 24 h im *Detour*-Paradigma getestet und zeigen keinerlei Veränderung in ihrem Arbeitsgedächtnis (Abb. 37A). Der experimentellen Gruppe wurde Zaprinast (100 µM) verfüttert. Nach 24 h hat sich das Orientierungsgedächtnis signifikant auf 70 % verbessert. Die Kontrollgruppe zeigt keinerlei Veränderungen in ihrer Orientierungsleistung. Die Hemmung der PDE6 durch die Einnahme von Zaprinast führt zu einer partiellen Rettung des *ebo* Verhaltensdefekts mit einer Gedächtnisleistung von 70 %. Damit konnte der vollständige Gedächtnisverlust der *ebo* Mutante auf ein Gedächtnisniveau angehoben werden, welches sich höchst signifikant vom Zufallsniveau unterscheidet.

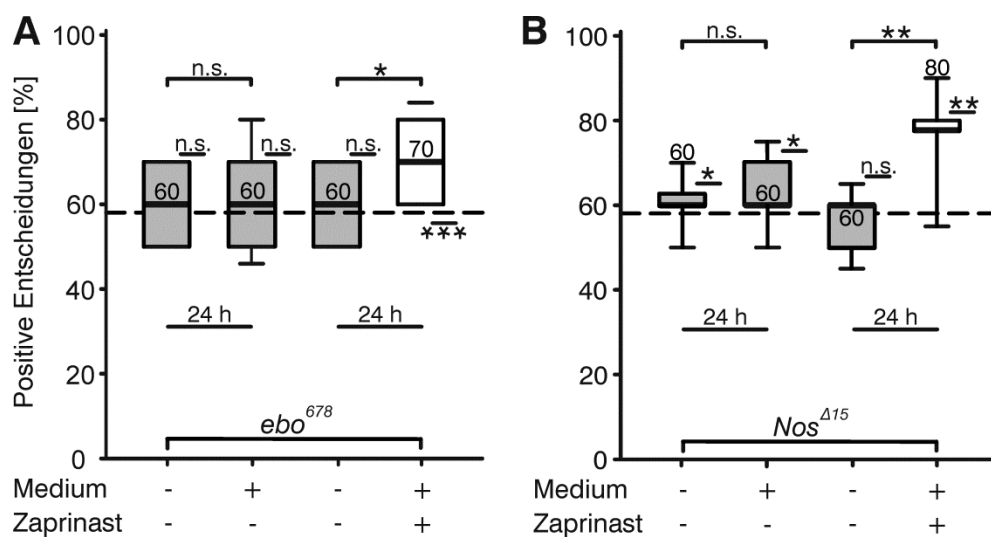


Abb. 37: Pharmakologische Applikation des PDE6-Inhibitors Zaprinast an *ebo*⁶⁷⁸ und *Nos*^{Δ15} Mutanten. Dieselben Individuen wurden vor und nach der Behandlung ohne Inhibitor (Kontrollgruppe) oder mit 100 µM Inhibitor (experimentelle Gruppe) getestet (beide Gruppen n = 15). (A) Die Kontrollgruppe der *ebo* Tiere, welche über Nacht auf einer Zuckerlösung saßen, zeigt keine Veränderung des Gedächtnisses. Die Aufnahme des PDE6-Inhibitors hat jedoch eine Verbesserung des Orientierungsgedächtnisses auf 70 % zur Folge. (B) Die *Nos* Mutanten in der Kontrollgruppe zeigen keine Veränderungen, während die Aufnahme des PDE6-Inhibitors den Gedächtnisdefekt vollständig rettet (beide Gruppen n = 14). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 54 und Tab. 55 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Ein paralleles pharmakologisches Experiment wurde mit der *Nos*^{A15} Nullmutante durchgeführt. Es wurden ebenfalls zwei Gruppen getestet – eine Kontrollgruppe und eine experimentelle Gruppe; diese wurden sowohl naiv als auch nach 24 h im *Detour*-Paradigma getestet. *Nos* Fliegen zeigen sowohl im naiven Zustand als auch nach der Aufnahme von Zuckerwasser einen vollständigen Verlust des visuellen Orientierungsgedächtnisses, da sie nur zu 60 % auf die ursprüngliche Landmarke zulaufen und sich ihre Entscheidungen somit nicht vom Zufallsniveau unterscheiden (Abb. 37B). Die experimentelle Gruppe, die über Nacht auf dem PDE6 Inhibitor saß, zeigt eine hoch signifikante Verbesserung der Orientierungsleistung. Im naiven Zustand läuft die Mutante nur zu 60 % auf die Position der ersten Landmarke zurück, wohingegen sie nach der Aufnahme des Inhibitors zu 80 % eine positive Wahl dieser Landmarke aufweist. Auch in den *Nos*^{A15} Mutanten konnte beobachtet werden, dass die Einnahme des PDE6 Inhibitors und somit ein verminderter cGMP-Metabolismus zu einer deutlichen Verbesserung des Arbeitsgedächtnisses führt.

Die angeführten Experimente verdeutlichen, dass ein hoher cGMP-Level in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers für das visuelle Orientierungsgedächtnis essentiell ist und dass dieser sowohl über NO als auch über H₂S moduliert werden kann (Abb. 38).

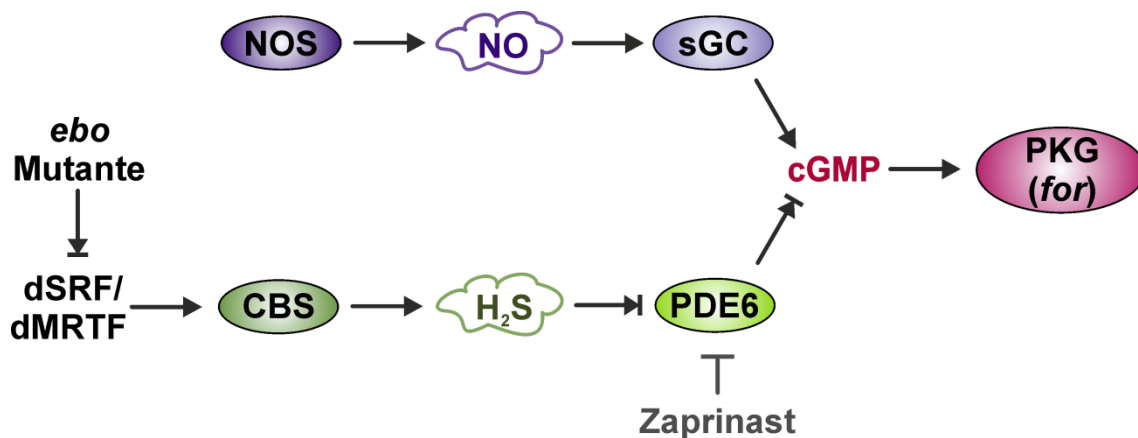


Abb. 38: Schematische Darstellung des postulierten Signalweges. In der *ebo* Mutante wird durch Aktinakkumulation im Zellkern der Transkriptionskomplex dSRF/dMRTF inhibiert und somit die Transkription von *Cbs* reduziert. CBS produziert H₂S, welches wiederum die PDE6 inhibiert und somit den cGMP-Level erhöht. NOS aktiviert die sGC über NO und wirkt auf diese Weise positiv auf den cGMP-Level. cGMP aktiviert schließlich die PKG. Der Inhibitor Zaprinast hemmt die PDE6 und erhöht somit ebenfalls den cGMP-Level in der Zelle. Abkürzungen: dSRF (*Drosophila* Serum Response Factor), dMRTF (*Drosophila* Myocardin-related transcription factor), CBS (Cystathionin-β-Synthase), H₂S (Hydrogensulfid), PDE6 (Phosphodiesterase 6), NOS (Nitroxid-Synthase), NO (Stickstoffmonoxid), sGC (lösliche Guanylylzyklase), cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat), PKG (Proteinkinase G), *for* (*foraging*).

3.6. Die Beteiligung der löslichen Guanylylzyklase am Orientierungsgedächtnis

Eine der Hauptaufgaben von cGMP ist die Aktivierung von PKG. Im Folgenden soll nun dieser Zusammenhang für das visuelle Orientierungsgedächtnis überprüft werden. Prinzipiell gibt es drei Klassen von Guanylylzyklasen: die Rezeptor-gebundene Guanylylzyklase, die als Transmembranprotein ein Rezeptor für extrazelluläre Liganden darstellt; eine lösliche Guanylylzyklase (sGC) und eine Guanylylzyklase, die an den äußeren Segmenten der Stäbchen in den Photorezeptoren sitzt. Im Folgenden wird ausschließlich auf die sGC eingegangen, da sie den hauptsächlich intrazellulären Rezeptor für NO darstellt. Die sGC ist ein Heterodimer und besteht aus einer großen α - und einer kleinen β -Untereinheit, beide Untereinheiten zeigen jedoch katalytische Aktivität (Davies, 2006).

Da die Mutanten für die *GCa1* (Gibbs et al., 2001) leider nicht zur Verfügung standen, wurde ein RNAi-Konstrukt benutzt (Ni et al., 2008). Reduziert man die mRNA von *GCa99B* in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers mit der Treiberlinie 189Y, so verringert sich das Orientierungsgedächtnis der Fliegen auf 70 % (Abb. 39).

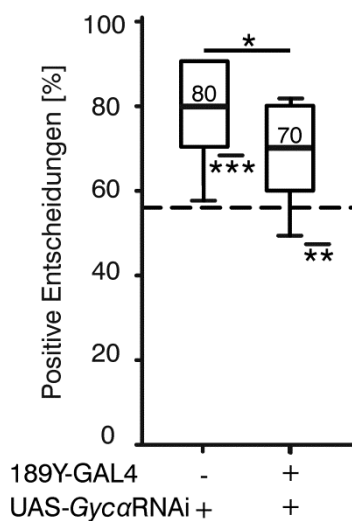


Abb. 39: Die sGC wird in den R3 Neuronen für das Orientierungsgedächtnis benötigt. Die Reduzierung der mRNA von *GCa99B* mit Hilfe von RNAi in den R3 Neuronen (189Y-GAL4) führt zu einem leicht reduzierten Gedächtnislevel im Vergleich zur adäquaten Kontrolle (alle Gruppen n = 18). Die statistische Auswertung ist der Tab. 56 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Anschließend wurde eine genetische Interaktion zwischen der *sGC* und der *Nos* Mutante durchgeführt, um die Verknüpfung mit den bekannten Komponenten des NO/cGMP-Signalweges auch für diese Gedächtnisart herzustellen. Es wurde die Defizienzlinie *Df(3R)BSC547* (*Df(sGC)*; Cook et al., 2012) verwendet, welche unter anderem das Gen *GCa99B* deletiert (Abb. 40; dos Santos et al., 2015). Für den *Nos* Locus wurde die *Nos^C* Mutante gewählt, welche keine enzymatische Aktivität von NOS

mehr aufweist (Yakubovich et al., 2010) und im *Detour* einen defekten Phänotyp zeigt (Abb. 17A).

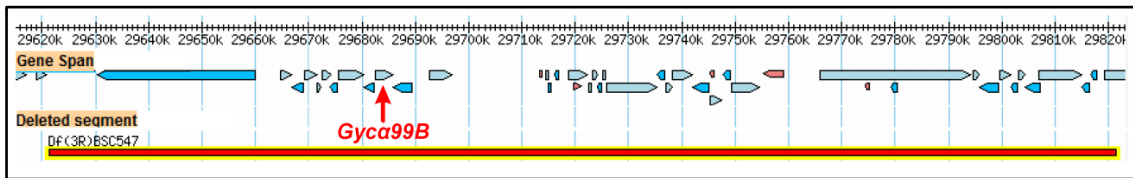


Abb. 40: Die Defizienzlinie *Df(3R)BSC547* umfasst den Genlocus für *GCa99B* (verändert nach dos Santos et al., 2015).

Einfach heterozygote Fliegen, sowohl für die sGC (*Df(sGC)/III*), als auch für NOS (*Nos^C/II*) zeigen ein wildtypisches Arbeitsgedächtnis (Abb. 41A). Doppelt heterozygote Tiere dagegen (*Nos^C/II; Df(sGC)/III*) weisen einen kompletten Verlust des visuellen Gedächtnisses auf, laufen nur zu 60 % zum ursprünglichen Ziel zurück und unterscheiden sich damit nicht vom Zufallsniveau. Als nächster Schritt wurde eine genetische Interaktionsstudie von *Nos* und *for* durchgeführt, um zu zeigen, dass NO nicht nur die sGC, sondern auch die für das Orientierungsgedächtnis benötigte PKG (Kapitel 3.1) aktiviert. Es wurden das Nullallele *Nos^C* und das Letalallel *for⁰²* (dos Santos et al., 2015) gewählt. Die einfach heterozygoten Tiere, *Nos^C/II* und *for⁰²/II* zeigen ein wildtypisches Arbeitsgedächtnis und laufen zu 80 % bzw. 90 % auf die initiale Landmarke zurück (Abb. 41B). Doppelt heterozygote Tiere dagegen (*Nos^C/for⁰²*) weisen den vollständigen Verlust des Arbeitsgedächtnisses auf. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die sGC für das Arbeitsgedächtnis also nicht nur in den R3 Neuronen benötigt wird, sondern dass deren Aktivierung durch NO essentiell für das Orientierungsgedächtnis ist, um anschließend über einen erhöhten cGMP-Level die Aktivität der *for* PKG zu regulieren.

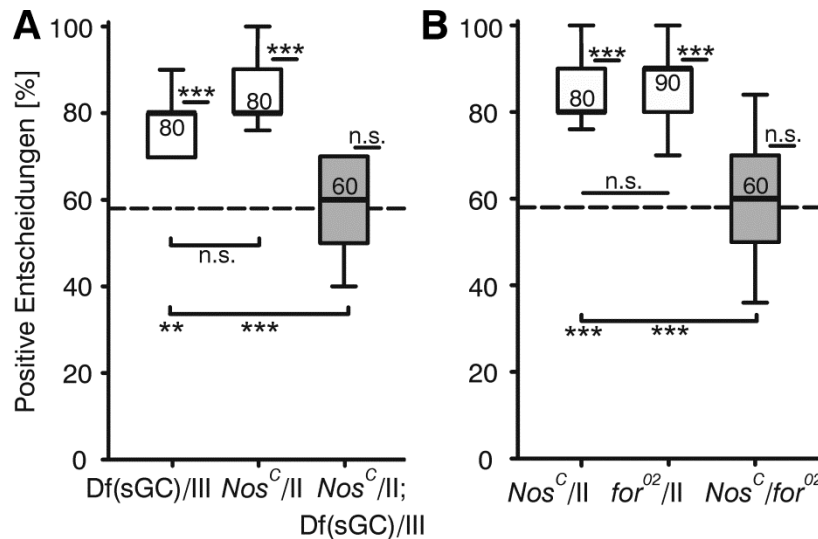


Abb. 41: Genetische Interaktion zwischen *Nos* und *sGC*, sowie *Nos* und *for*. (A) Heterozygote Kontrollen für die Defizienzlinie *Df(sGC)* und für *Nos* zeigen ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis von 80 %, während die doppelt heterozygoten Tiere sich mit ihrer Gedächtnisleistung nicht vom Zufallsniveau unterscheiden (alle Gruppen n = 15). (B) Die heterozygoten Tiere für *Nos* und *for* zeigen eine wildtypische Orientierungsleistung, während die doppelt heterozygoten den vollständigen Verlust des Gedächtnisses aufweisen (alle Gruppen n = 15). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 57 und Tab. 58 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9

3.7. Der Einfluss der Ribosomalen-S6-Kinase II und die Verknüpfung mit der Proteinkinase G

Nach der Etablierung des NO/cGMP/PKG-Signalweges für das Arbeitsgedächtnis, wurde nach weiteren nachgeschalteten (*downstream*) Faktoren gesucht. Es ist bereits bekannt, dass die Ribosomale-S6-Kinase II (RSKII), welche bei *Drosophila* von *ignorant* (*ign*) kodiert wird, in den R3/R4d Neuronen des Ellipsoidkörpers für das visuelle Orientierungsgedächtnis benötigt wird (Neuser et al., 2008).

Um die Notwendigkeit von IGN auch ausschließlich auf die R3 Neurone zu beschränken, wurden weitere Rettungsexperimente durchgeführt. Dafür wurde eine Rekombinante des mutanten *ign*^{58/1} Allels und des UAS-*ign* Transgens (Rintelen et al., 2001) hergestellt. Der Stamm UAS-*ign*²⁻¹ *ign*^{58/1}/FM7a (#24) wurde als positive Rekombinante identifiziert (Anhang Kapitel 8.1.2; Abb. 67). Beim Experimentieren mit der *ign*^{58/1} Mutante wurde mehrfach die Erfahrung gemacht, dass die Tiere über mehrere Generationen ihren Verhaltensphänotyp verlieren. Aufgrund dessen wurden die Tiere vor jedem Experiment über mehrere Generationen *cantonisiert*. Das bedeutet, dass der genetische Hintergrund gegen einen wildtypischen CS Hintergrund ausgetauscht wurde, ohne das Chromosom mit dem defekten *ign*^{58/1} Allel zu verändern. Nach der *Cantonisierung* wurde anschließend im *ign*^{58/1} mutanten Hintergrund die cDNA von *ign*

in allen vier Ringsystemen exprimiert. Das defekte Orientierungsgedächtnis der *ign* Mutante kann durch Expression von *ign* ausschließlich in den R3 Neuronen (189Y) gerettet und das wildtypische Niveau wiederhergestellt werden (Abb. 42). Die Expression in den R1 Neuronen (R28D01-GAL4; Ofstad et al., 2011), in den R2 + R4m Neuronen (c42-GAL4), sowie in den R4 Neuronen (ftz-ng-GAL4) hat keine Verbesserung des Gedächtnisses zur Folge. *ign* RSKII wird also ebenfalls ausschließlich in den R3 Neuronen für ein funktionsfähiges Orientierungsgedächtnis benötigt.

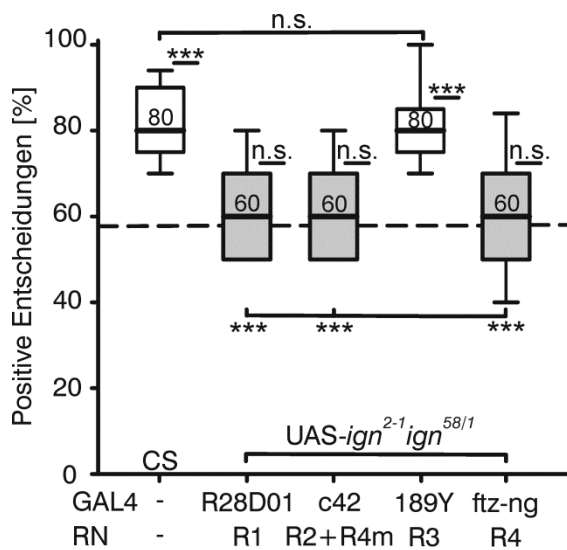


Abb. 42: Expression der *ign* cDNA in den R3 Neuronen rettet das Orientierungsgedächtnis der *ign*^{58/1} Mutante. Während die Expression von UAS-*ign* (Rintelen et al., 2001) in R1 Neuronen (R28D01-GAL4), R2+R4m Neuronen (c42-GAL4) und R4 Neuronen (ftz-ng-GAL4) keine Verbesserung des *ign* defekten Gedächtnisses bewirkt, stellt die Expression in R3 Neuronen (189Y-GAL4) das Gedächtnis auf wildtypisches Niveau wieder her (alle Gruppen n = 25). Die statistische Auswertung ist der Tab. 59 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9. Abkürzung: RN (Ringneuron).

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass sowohl FOR als auch IGN in den Subtypen des Ellipsoidkörpers benötigt werden, wurde eine genetische Interaktionsstudie durchgeführt, um zu überprüfen, ob beide Kinasen auch in derselben Signalkaskade wirken. Transheterozygote *for*^s/*for*^{189Y} Tiere mit zwei hypomorphen Allelen zeigen einen intermediären Phänotyp von 70 % Gedächtnisleistung im *Detour*-Paradigma (Abb. 43). Dies eignet sich besonders für eine Interaktionsstudie, da sowohl supprimierende als auch verstärkende Effekte sichtbar gemacht werden können. Wird in diesem transheterozygoten *sitter* Hintergrund zusätzlich eine Kopie des *ign* Gens reduziert (*ign*^{58/1}/X; *for*^s/*for*^{189Y}), so zeigen diese Fliegen ein stärkeres Gedächtnisdefizit bzw. einen kompletten Verlust des Orientierungsgedächtnisses im Vergleich zu transheterozygoten *sitter* Tieren (*for*^s/*for*^{189Y}). Im Gegensatz zu den Gedächtnisdefiziten der *sitter* Mutanten (*for*^s), zeigen die *Rover* Tiere (*for*^R) ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis (Abb. 9). Wird nun eine Kopie des *ign* Gens in einem heterozygoten *for*^R/*for*^{189Y} Hintergrund eliminiert, hat dies keinen negativen Effekt auf

das Gedächtnis (Abb. 43). $ign^{58/1}/X; for^R/for^{189Y}$ Tiere zeigen ein wildtypisches Verhalten, da sowohl von ign als auch von for ein wildtypisches Allel vorliegt. Die genetische Interaktion zeigt, dass die Kinasen in demselben Signalweg interagieren, welcher für die Funktion des Arbeitsgedächtnisses essentiell ist.

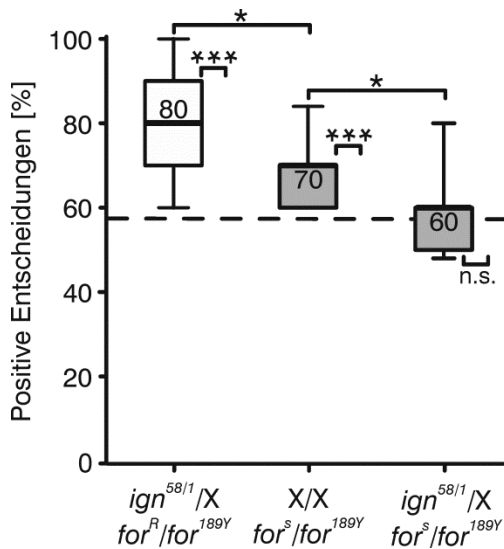


Abb. 43: Genetische Interaktion zwischen for und ign . Transheterozygote for^s/for^{189Y} Tiere zeigen ein intermediäres Gedächtnis von 70 %. Reduziert man in diesem genetischen Hintergrund jedoch zusätzlich eine ign Kopie ($ign^{58/1}/X; for^s/for^{189Y}$), so reduziert sich die Gedächtnisleistung auf Zufallsniveau. Die Reduzierung um eine Kopie ign im Hintergrund des dominanten for^R Allels ($ign^{58/1}/X; for^R/for^{189Y}$) hat jedoch keine Beeinflussung des Gedächtnisses zur Folge (alle Gruppen $n = 27$; eigene Arbeit, veröffentlicht in Kuntz et al., 2012). Die statistische Auswertung ist der Tab. 60 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Als nächster Schritt wurde mit einer epigenetischen Studie die Hierarchie der beiden Kinasen in diesem Signalweg untersucht, indem geprüft wurde, ob eine Überexpression von IGN in den R3 Neuronen den for Phänotyp retten kann. Die Überexpression von IGN in den R3 Neuronen den for Phänotyp retten kann. Die Überexpression von IGN mit 189Y-GAL4 in einem transheterozygoten for Hintergrund rettet das defekte Gedächtnis vollständig ($for^s/for^{189Y}; UAS-ign/III$, Abb. 44A). 189Y-GAL4 dient dabei sowohl als Treiberlinie als auch als for Allel (for^{189Y} ; Abb. 9). Sowohl die GAL4-Kontrolle (transheterozygote for^s/for^{189Y}) als auch die Kontrolle für das UAS-Konstrukt ($for^s/for^s; UAS-ign/III$) zeigen ein signifikant schlechteres Orientierungsgedächtnis. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass IGN unterhalb von FOR in der Signalkaskade steht, da durch vermehrte Expression der IGN Kinase der defekte Phänotyp der for Mutante aufgehoben werden kann. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde das reverse Experiment durchgeführt. for wurde in einem $ign^{58/1}$ mutanten Hintergrund überexprimiert. Jedoch konnte weder mit 189Y- noch mit c232-GAL4 eine Verbesserung oder Rettung des ign Phänotyps erreicht werden (Abb. 44B). Dies unterstützt ebenfalls die oben genannte Hypothese, dass FOR oberhalb von IGN in der Signalkaskade agiert.

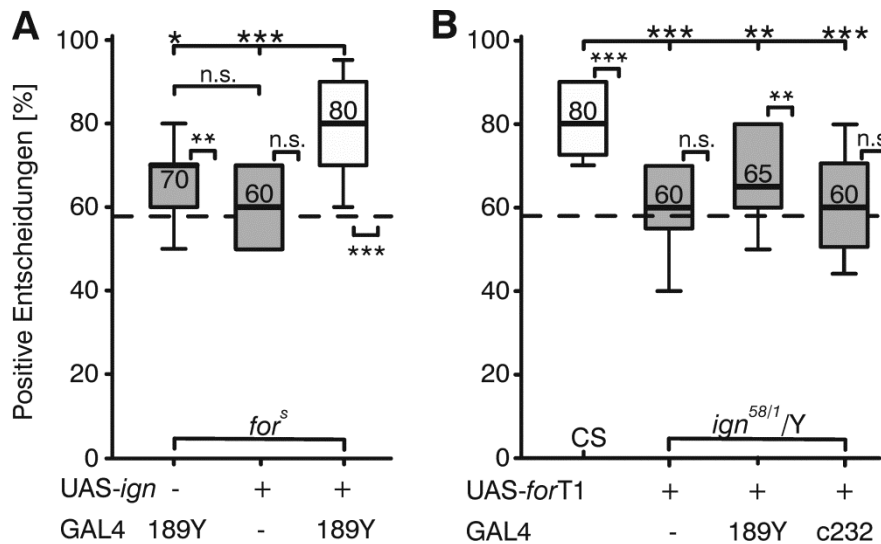


Abb. 44: Epigenetische Interaktionsstudie zwischen *for* und *ign*. (A) Transheterozygote *for^s/for^{189Y}* Tiere zeigen ein intermediäres Gedächtnis von 70 % und auch die Kontrolle für die Expression der *ign* cDNA im *for^s* Hintergrund zeigt ein defektes Gedächtnis. Die Überexpression von IGN in R3 Neuronen (189Y-GAL4) rettet jedoch den *for^s* mutanten Gedächtnisdefekt. (B) Die Überexpression der *for* cDNA in der *ign* Mutante in R3 Neuronen (189Y-GAL4) oder in R3/R4d Neuronen (c232-GAL4) hat keinen Effekt auf das defekte Gedächtnis der *ign^{58/1}* Mutante (alle Gruppen n = 21-24; eigene Arbeit, veröffentlicht in Kuntz et al., 2012). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 61 und Tab. 62 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Um *ign* RSKII mit weiteren vorgeschalteten (*upstream*) Komponenten des Signalwegs zu verknüpfen, wurde eine weitere Interaktion zwischen den Genen *ign* und *Nos* getestet. Doppelt heterozygote Tiere (*ign^{58/1}/X; Nos^{Δ15}/II*) zeigen jedoch kein gerichtetes Anlaufverhalten auf Landmarken, so dass ihr Orientierungsgedächtnis im *Detour*-Paradigma nicht quantifiziert werden konnte. Zur Dokumentation dieses Phänotyps wurde das Lauf- und Orientierungsverhalten der Tiere im *Buridan*-Paradigma analysiert. Dabei zeigte sich eine genetische Interaktion der beiden Gene, da doppelt heterozygote Tiere eine hoch signifikante Verschlechterung der Orientierung gegenüber der heterozygoten Kontrolltiere zeigen (Anhang Kapitel 8.4.2; Abb. 78). Die genetische Interaktion zeigt, dass diese beiden Gene in einem gemeinsamen Signalweg agieren, jedoch konnte die Relevanz dieses Signalweges aufgrund des schlechten Anlaufverhaltens nicht für das Orientierungsgedächtnis etabliert werden.

3.8. Die Rolle des Transkriptionsfaktors dCREB für das Orientierungsgedächtnis

Nachdem eine Interaktion von RSKII und PKG in demselben Signalweg für das Arbeitsgedächtnis etabliert werden konnte, stellte sich die Frage nach weiteren *downstream* Komponenten des Signalweges. In einer Zellkulturlinie wurde gezeigt, dass

ein Phosphorylierungssubstrat der RSKII der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) ist (De Cesare et al., 1998). Wird bei der Ausbildung eines Gedächtnisses die Expression von neuen Genen angeregt, so geschieht dies über Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB (Kandel et al., 2014). Am Modellorganismus *Aplysia* wurde zuerst herausgefunden, dass der Transkriptionsaktivator CREB für die langanhaltende synaptische Plastizität notwendig ist (Dash et al., 1990). *Creb* *-/- knock-out* Mäuse zeigen vielfältige Gedächtnisdefizite, so z.B. bei der Kontext-bezogenen Angstkonditionierung oder bei einem räumlichen Ortsgedächtnis (*Morris water-maze*). Auf Gehirnschnitten dieser Mäuse wurde elektrophysiologisch ebenfalls gemessen, dass die Langzeit-Potenzierung im Hippocampus deutlich verschlechtert ist (Silva et al., 1998). Bei *Drosophila* ist ebenfalls bekannt, dass CREB für die Konsolidierung eines olfaktorischen Langzeitgedächtnisses benötigt wird (Yin und Tully, 1996), nicht jedoch für kürzere Gedächtnisformen (Kahsai und Zars, 2011). Im Folgenden wurde überprüft, ob CREB eine funktionelle Bedeutung für das Orientierungsgedächtnis bei *Drosophila* hat.

Mit Hilfe einer RNAi-Linie wurde ein gewebespezifischer *knock-down* von *dCREB* in R3 Neuronen durchgeführt, im Vergleich zur Kontrolle kann jedoch kein spezifischer Effekt beobachtet werden (Anhang Kapitel 8.3.1, Abb. 71). Daher wurde eine dominant-negative Isoform von dCREB exprimiert (*UAS-dCreb2-b*; Yu et al., 2006). Wird das Transgen einzeln in allen vier Ringsystemen des Ellipsoidkörpers exprimiert, so ist in keinem der Fälle eine deutliche Verschlechterung des Gedächtnisses im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Abb. 45A). Die Expression des dominant-negativen dCREB in R3 Neuronen mit der Treiberlinie 189Y zeigt jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Verschlechterung des Gedächtnisses auf 70 %. Um eine mögliche Kompensierung der dCREB Regulation während der Entwicklung zu umgehen, wurde das Experiment unter zeitlich- und räumlich-kontrollierten Bedingungen mit dem Temperatur-sensitiven GAL4-Repressor *Tub>GAL80^{ts}* (McGuire et al., 2003) wiederholt. Fliegen des Genotyps 189Y *Tub > GAL80^{ts} > UAS-dCreb2-b* wuchsen unter restriktiven Bedingungen bei 18 °C auf und zeigen, ein wildtypisches Orientierungsgedächtnis (Abb. 45B). Dieselben Tiere wurden nach dem Testen für 24 h auf 30 °C gesetzt und anschließend erneut im *Detour*-Paradigma getestet. Bei einer Temperatur von 30 °C wirkt GAL80 nicht mehr als Repressor von GAL4 und die dominant-negative Form von dCREB wurde in den R3 Neuronen exprimiert. Die Tiere

weisen nach der Expression von dCREB2-b einen kompletten Verlust des Orientierungsgedächtnisses auf.

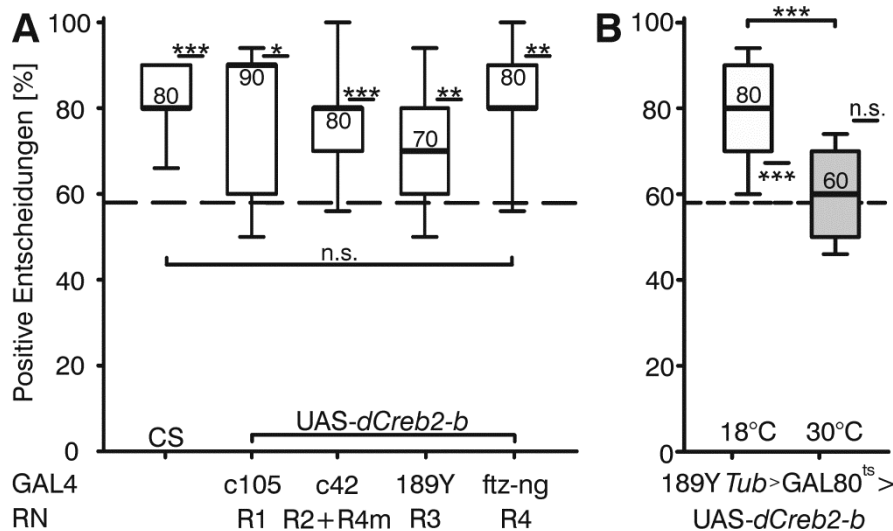


Abb. 45: dCREB ist essentiell für ein funktionsfähiges Orientierungsgedächtnis. (A) Expression eines dominant-negativen *dCreb2-b* Konstrukts in allen vier Ringsystemen hat keinen signifikanten Effekt auf die Gedächtnisleistung im Vergleich zum Wildtyp CS (alle Genotypen n = 15). (B) 189Y *Tub* > GAL80^{ts} > UAS-*dCreb2-b* Fliegen wurden auf 18 °C aufgezogen (Inhibition der GAL4-Aktivität) und zeigen ein normales Orientierungsgedächtnis. Nach 24 h Inkubation auf 30 °C (Induktion der GAL4-Aktivität) haben dieselben Fliegen das Gedächtnis für eine Landmarke vollständig verloren (n = 15). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 63 und Tab. 64 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9. Abkürzung: RN (Ringneuron).

Zur weiteren Verifizierung, dass dCREB in den R3 Neuronen essentiell für das Orientierungsgedächtnis ist, wurde ein Rettungsexperiment durchgeführt. Da homozygote Fliegen des Allels *CrebB*^{S162} letal sind, wurde mit heterozygoten Tieren gearbeitet. Allein die Reduzierung einer Genkopie (*CrebB*^{S162}/X) hat eine deutliche Verschlechterung des Arbeitsgedächtnisses zur Folge (Abb. 46). Anschließend wurde in diesem heterozygoten Zustand in jedem der vier Ringsysteme die cDNA von dCREB exprimiert (UAS-*dCrebB-17A*, Perazzona et al., 2004). Der defekte Phänotyp der Mutante kann nur durch dCREB-Expression in den R3 Neuronen vollständig auf Wildtyp-Niveau gerettet werden. Die Expression von dCREB in den R1 Neuronen (c105-GAL4), in den R2+R4m Neuronen (c42-GAL4) oder in R4 Neuronen (ftz-ng-GAL4) hat keine Verbesserung des Defekts der *CrebB*^{S162}/X Mutante zur Folge. Diese Experimente zeigen, dass ein erhöhter dCREB-Level ausschließlich in den R3 Neuronen das Gedächtnisdefizit der heterozygoten *CrebB*^{S162}/X Mutante wieder auf wildtypisches Niveau herstellen kann.

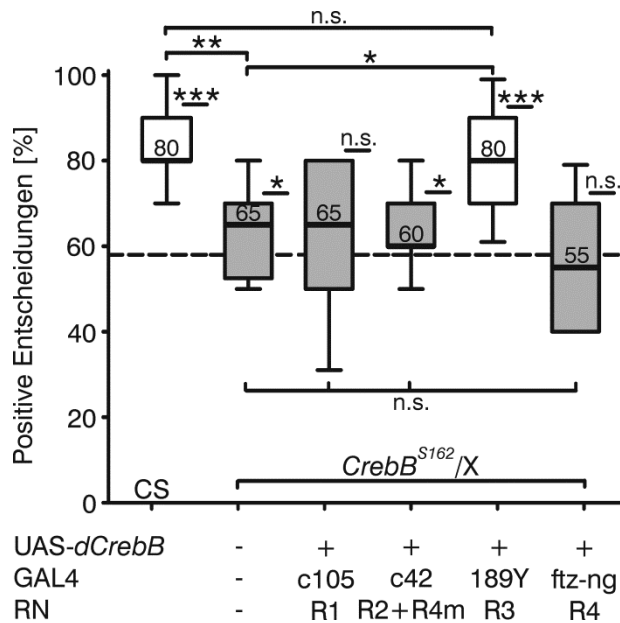


Abb. 46: Rettungsexperiment der heterozygoten *CrebB^{S162}* Mutante. *CrebB^{S162}/X* Fliegen zeigen ein stark reduziertes Orientierungsgedächtnis. Expression der *dCrebB* cDNA in R1 Neuronen (c105-GAL4), R2/R4m Neuronen (c42-GAL4) und in R4 Neuronen (ftz-ng-GAL4) hat keinen Effekt auf die defekte Gedächtnisleistung der Mutante, während die Expression in R3 Neuronen (189Y-GAL4) den Phänotyp vollständig auf Wildtypniveau rettet (alle Genotypen n = 20). Die statistische Auswertung ist der Tab. 65 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9. Abkürzung: RN (Ringneuron).

Zur weiteren Analyse des Signalweges wurde der Zusammenhang zwischen PKG/RSKII und dCREB weiter untersucht, indem ein epistatisches Rettungsexperiment durchgeführt wurde, da alle Komponenten in den R3 Neuronen zur Ausführung eines Orientierungsgedächtnisses benötigt werden (Abb. 11, Abb. 42, Abb. 46). Um dCREB als *downstream* Faktor von RSKII zu identifizieren, sollte der *ign^{58/1}* Phänotyp durch die Überexpression von *dCreb* cDNA gerettet werden.

Sowohl die GAL4-, als auch die UAS-Kontrolle im *ign^{58/1}* mutanten Hintergrund weisen einen vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses auf und laufen nur zu 60 % auf die ursprüngliche Landmarke zurück (Abb. 47). Das Gedächtnis kann durch die Überexpression von dCREB ausschließlich in den R3 Neuronen auf wildtypisches Niveau gerettet werden und zeigt somit, dass dCREB als *downstream* Faktor von *for* PKG und *ign* RSKII in diesem Signalweg agiert.

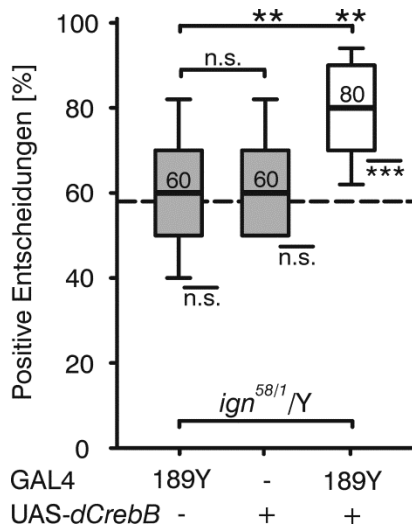


Abb. 47: Die Überexpression der *dCrebB* cDNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) rettet den Gedächtnisdefekt der *ign^{58/1}* Mutante. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die UAS- und die GAL4-Kontrolle im *ign^{58/1}* mutanten Hintergrund nicht vom Zufallsniveau (alle Genotypen n = 15). Die statistische Auswertung ist der Tab. 66 im Anhang zu entnehmen. Darstellungs-konventionen wie in Abb. 9.

Dieser Gedanke wurde noch einen Schritt weitergeführt, indem getestet wurde, ob die zusätzliche Überexpression von *ign* den defekten Gedächtnisphänotyp der *ebo* Mutante rettet, um so die Verknüpfung von EBO und dem RSKII/CREB-Signalweg herzustellen. Auch hier wurden sowohl die GAL4-, als auch die UAS-Kontrolle im *ebo* mutanten Hintergrund gemessen und diese Tiere zeigen den *ebo* Mutanten-typischen Gedächtnisverlust (Abb. 48A). Wird hingegen *ign* in den R3 Neuronen überexprimiert, so lässt sich ein wildtypisches Gedächtnis von 80 % positiven Entscheidungen auf das ursprüngliche Ziel beobachten. Um weiter zu etablieren, dass die Funktion von EBO zu Beginn des postulierten Signalweges der beiden Gasotransmitter steht, sollte der Gedächtnisdefizit der *ebo* Mutante durch die Überexpression von dCREB in adulten R3 Neuronen gerettet werden. Erneut wurde hier der Temperatur-sensitive GAL4 Repressor *Tub > GAL80^{ts}* (McGuire et al., 2003) verwendet. *ebo⁶⁷⁸* Mutanten wurden bei 18 °C aufgezogen, so dass die Transkription durch GAL4 nicht initiiert wurde und die Tiere wurden auf ihren Gedächtnisdefizit im *Detour*-Paradigma getestet (Abb. 48B). Über Nacht wurden dieselben Individuen auf 25 °C gehalten, so dass das Transgen induziert wurde. Die Inkubation zur Induktion von GAL80^{ts} wurde bei unüblichen 25 °C durchgeführt, da die Inkubation der Fliegen bei 24 h auf 30 °C entweder zum Tod der Tiere führte oder zu solch massiven Beeinträchtigungen der Fliegen führte, dass diese nicht mehr im *Detour*-Paradigma testbar waren.

Die moderate Überexpression von dCREB in adulten R3 Neuronen innerhalb von 24 h führt zu einer partiellen Rettung des Gedächtnisdefizits der *ebo⁶⁷⁸* Mutante.

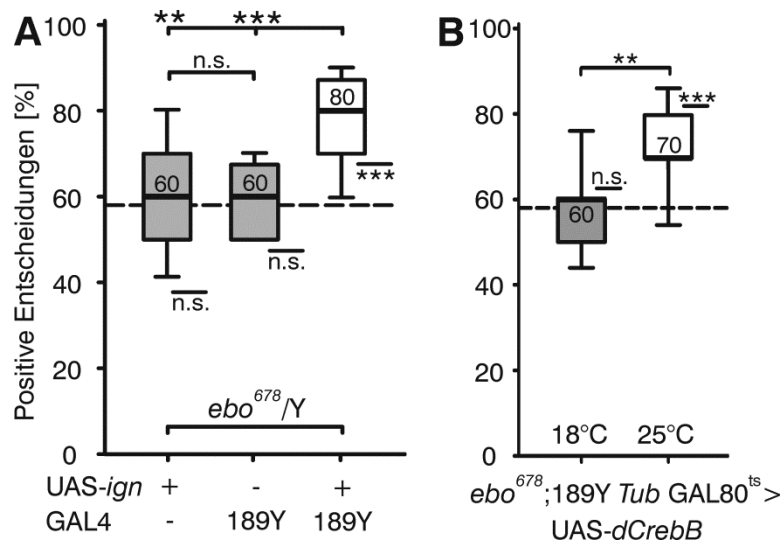


Abb. 48: Rettung des *ebo*⁶⁷⁸ Gedächtnisphänotyps mit Überexpression von IGN und dCREB. (A) Überexpression der *ign* cDNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) rettet den *ebo*⁶⁷⁸ defekten Gedächtnisphänotyp im *Detour*-Paradigma, während das UAS- und auch das GAL4-Konstrukt im *ebo* mutanten Hintergrund kein Orientierungsgedächtnis aufweisen (alle Genotypen n = 20). (B) *ebo*⁶⁷⁸;189Y Tub > GAL80^{ts} > UAS-dCrebB Tiere wuchsen bei 18 °C auf und besitzen kein Orientierungsgedächtnis. 24 h Induktion auf 25 °C erlaubt die GAL4-Aktivität und somit dCREB-Expression und resultiert in einer partiellen Rettung des *ebo*⁶⁷⁸ defekten Gedächtnisphänotyps (n = 15). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 67 und der Tab. 68 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Weitere genetische Interaktionsstudien mit der *dCreb*^{S162} Mutante ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Sowohl die Interaktion zwischen *Nos* und *dCreb* (Anhang Kapitel 8.3.3, Abb. 74), als auch zwischen *ebo* und *dCreb* (Anhang Kapitel 8.3.3, Abb. 75) deckte keine additiven Effekte auf. Des Weiteren wurde *twins* als eine mögliche Phosphatase für dCREB untersucht. Es wurde jedoch weder eine genetische Interaktion zwischen *twins* und *dCreb* noch zwischen *twins* und *Pka-C1* sichtbar (Anhang Kapitel 8.3.4, Abb. 76). Durch eine mutante Kopie einer möglichen dCREB-Phosphatase wäre eine verzögerte Dephosphorylierung von dCREB zu erwarten gewesen, was sich positiv auf das Orientierungsgedächtnis hätte auswirken können.

Obwohl RSKII nur eine der möglichen Kinasen ist, welche CREB phosphorylieren können (Johannessen et al., 2004), wurde im Folgenden untersucht, ob es ein unterschiedliches Verhältnis von P~dCREB (phosphoryliertes CREB) und dCREB in der *ign*^{58/1} Mutante gibt. Das *Drosophila CrebB* Gen kodiert für verschiedene Isoformen, die zwischen 29,8 und 34,4 kDa groß sind (dos Santos et al., 2015). Mit einem *Drosophila*-spezifischen Phospho-dCREB Antiserum (Fropf et al., 2013) und einem anti-CREB Serum gegen ein Peptid, welches in der Umgebung des zweiten Startcodons liegt (anti-ATG2; Fropf et al., 2013) wurde eine vergleichende *Western*

Blot-Analyse von Köpfen der *ign*^{58/1} Mutante und des Wildtyps CS durchgeführt. Die *ign*^{58/1} Fliegen wurden vor der Herstellung der Proteinextrakte über mehrere Generationen *cantonisert* (siehe Kapitel 3.7). Es konnten zwei bis drei Banden im Bereich von 35-40 kDa in beiden Genotypen gefunden werden (Abb. 49A). Das P~dCREB Expressionslevel wurde auf das Expressionslevel von dCREB normalisiert. Das Verhältnis von P~dCREB zu dCREB zeigt eine ~10 % Reduzierung von P~dCREB in der *ign*^{58/1} Mutante (Abb. 49B).

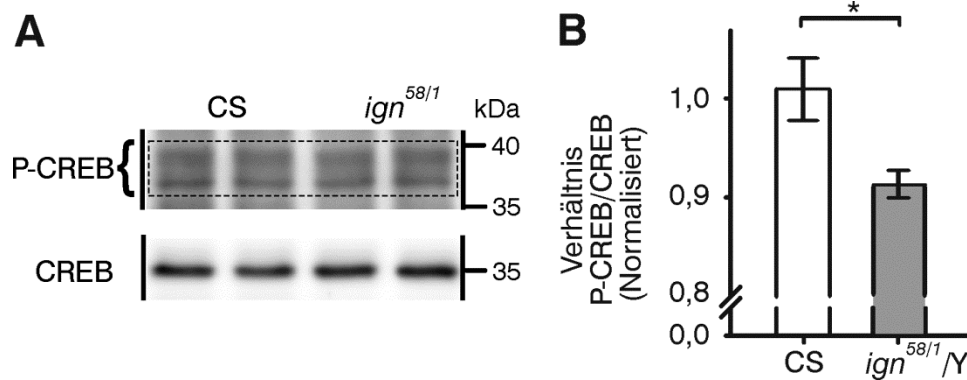


Abb. 49: P-CREB-Expressionslevel in CS und *ign*^{58/1} Fliegen. (A) *Western Blot*-Analyse von Kopfextrakten (10 Köpfe pro Spur) mit einem *Drosophila*-spezifischen P~CREB- und CREB-Antikörper. Die Proben wurden halbiert und die gleiche Menge auf zwei verschiedene Gele aufgetragen, so dass ein Gel (10 %) gegen P~CREB und das zweite Gel (10 %) gegen CREB gefärbt wurde. Es sind nur die relevanten Ausschnitte der Gele zwischen 30 und 40 kDa gezeigt. P~CREB wurde im Bereich zwischen 35-40 kDa detektiert und die Intensitäten gegen die Expressionsintensität des CREB-Level verrechnet. Pro Genotyp wurden jeweils neun unabhängige Proben erstellt. (B) Quantifizierung des Verhältnisses von P~CREB-zu-CREB in CS und *ign*^{58/1} Fliegen. Die Pixelintensitäten wurden für jeden Genotyp normalisiert (beide Genotypen n = 9; p = 0,043). Die statistische Auswertung ist der Tab. 69 im Anhang zu entnehmen. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler.

Zusammenfassend lässt sich aus den durchgeführten Experimenten sagen, dass das H₂S-produzierende Enzym CBS unter der transkriptionellen Kontrolle von dSRF/dMRTF steht, welche durch den Verlust der EBO-Aktivität inhibiert wird (Abb. 50). Des Weiteren führen die beiden diffundierenden Neuromodulatoren NO und H₂S zu einem erhöhten cGMP-Level in der Zelle, wodurch die *for* PKG und die *ign* RSKII aktiviert werden, was schließlich zu einer Aktivitätssteigerung von dCREB führt. Betrachtet man jedoch die zeitliche Spanne von Genregulation und Transkription, sowie ggf. Translation und Modifikation, so wird deutlich, dass diese Mechanismen nicht innerhalb des untersuchten 4 s Gedächtnisses ablaufen können. dCREB als Transkriptionsfaktor wird also nicht akut für die direkte Entscheidungsfindung benötigt, sondern dCREB wird akut innerhalb eines 24 h Fensters, in dem es exprimiert wurde (Abb. 45) benötigt. In den R3 Neuronen wird offenbar ein wohl definiertes dCREB-

Niveau benötigt, um die Expression von Proteinen, welche für die synaptische Plastizität notwendig sind, gleichmäßig stabil und hoch zu halten. Diese Proteine, im Folgenden *Kompetenzfaktoren* genannt, statten die R3 Neurone dann mit der Fähigkeit aus, das Arbeitsgedächtnis für umgebende Landmarken permanent während des Laufens zu aktualisieren und zu speichern. Reduziert man CREB in diesem System, so stehen die Kompetenzfaktoren nicht in ausreichender Menge zur Verfügung und die präzise, sowie sehr schnelle Funktionalität des Arbeitsgedächtnisses wird nicht mehr gewährleistet.

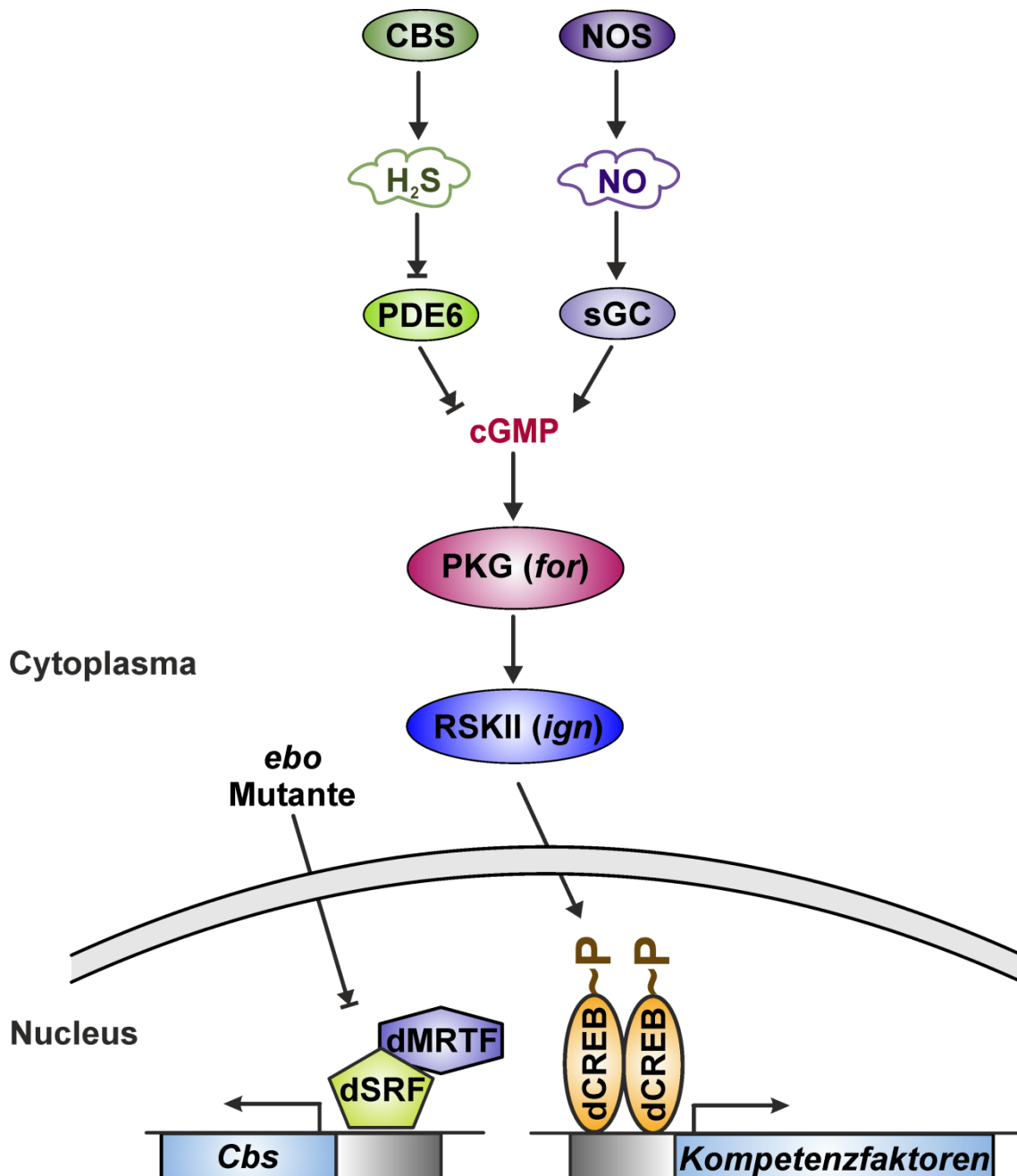


Abb. 50: Schematische Zusammenfassung des postulierten Signalweges. Über die beiden Gase NO und H₂S wird der cGMP-Level reguliert. Die anschließende Aktivierung von PKG und RSKII resultiert in der Phosphorylierung von dCREB, welches wiederum für die Zelle notwendige Kompetenzfaktoren reguliert. *Cbs* steht unter der transkriptionellen Kontrolle von dSRF/dMRTF und wird in der *ebo* Mutante durch Aktinakkumulation im Zellkern inhibiert. Abkürzungen: dSRF (*Drosophila* Serum Response Factor), dMRTF (*Drosophila* Myocardin-related transcription factor), *Cbs* und CBS (Cystathionin-β-Synthase), H₂S (Hydrosulfid), PDE6 (Phosphodiesterase 6), NOS (Nitritoxid-Synthase), NO (Stickstoffmonoxid), sGC (lösliche Guanylylzyklase), cGMP (Zyklisches Guanosinmonophosphat), PKG (Proteinkinase G), *for* (*foraging*), Ribosomale-S6-Kinase II (RSKII), *ignorant* (*ign*), dCREB~P phosphoryliertes (aktiviertes) *Drosophila* cAMP response element-binding protein).

3.9. *homer* als möglicher Kompetenzfaktor

Im folgenden Experiment soll das Gen *homer* als möglicher Kompetenzfaktor untersucht werden, der für die Ausführung des visuellen Orientierungsgedächtnisses relevant sein könnte. Die Mitglieder der Familie der Homer Proteine besitzen eine Protein-bindende Domäne und interagieren bei Vertebraten als Gerüstprotein, um die strukturelle und damit auch funktionelle Organisation der metabotropen glutamatergen Rezeptoren, sowie der IP3-Rezeptoren zu steuern (Brakeman et al., 1997; Tu et al., 1998). Bei *Drosophila* gibt es ein *homer* Gen, welches starke Homologie zu den drei *Homer* Genen aus der Maus zeigt. Außerdem ist *homer* im zentralen, adulten Nervensystem angereichert und wird vermehrt am Endoplasmatischen Reticulum, sowie in den optischen Loben und im Zentralkomplex gefunden (Diagana et al., 2002, Urizar et al., 2007). Außerdem zeigt die *homer* Nullmutante ein reduziertes Gedächtnis in der Balzkonditionierung (Diagana et al., 2002). In einer anderen Studie wurde der *homer* Mutante ein Defekt des olfaktorischen Langzeitgedächtnisses zugeschrieben. Zusätzlich zeigten trainierte Fliegen nach der Konditionierung eine stark erhöhte *homer*-Expression, welche durch dCREB-Aktivität vermittelt wurde (Miyashita et al., 2012).

Das Allel *homer*^{R102} ist durch das unpräzise Entfernen des P-Elements EP2141 entstanden, das benachbarte Gen *Liprin-alpha* wurde jedoch nicht beschädigt. *homer*^{R102} ist ein Nullallel, wohingegen *homer*^{EP2141} ein hypomorphes Allel ist und nur eine leichte Reduzierung des Proteinlevels aufweist, da das P-Element 60 bp *upstream* des ersten Exons von *homer* ins Genom integriert ist (Diagana et al., 2002). Homozygote *homer*^{R102} Fliegen zeigen nicht nur den kompletten Verlust des Orientierungsgedächtnisses, sondern zusätzlich auch noch den Verlust der *Turn-Kompensation*, was sich an einem Median von 50 % zeigt (Abb. 51). Die *Turn-Kompensation* beschreibt das Phänomen, dass nach einer Rechtsdrehung der Fliege die Wahrscheinlichkeit für eine Linksdrehung höher ist als eine erneute Rechtsdrehung, und umgekehrt. Entfällt diese, so zeigen die Mutanten nur noch 50 % positive Entscheidungen auf die ursprüngliche Landmarke (siehe Kapitel 2.2). Zusätzlich wurden auch transheterozygote *homer*^{R102}/*homer*^{EP2141} Fliegen im *Detour*-Paradigma getestet. Auch diese Fliegen zeigen einen vollständigen Verlust des Gedächtnisses auf nur 60 % positive Entscheidungen im Median, die *Turn-Kompensation* ist jedoch noch vorhanden.

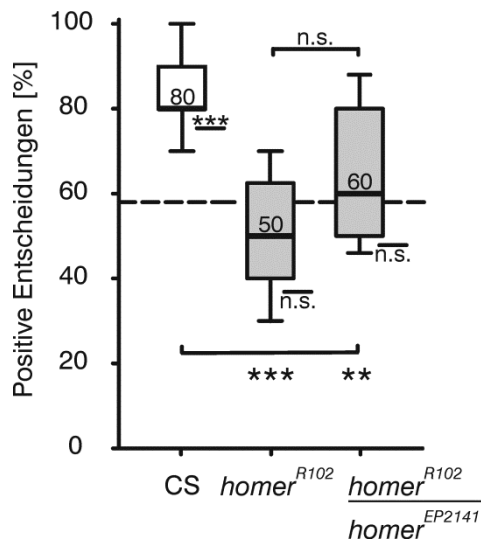


Abb. 51: *homer* als möglicher Kompetenzfaktor. Die Nullmutante *homer*^{R102} zeigt einen vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses und zusätzlich auch der *Turn-Kompensation*. Transheterozygote Fliegen *homer*^{R102}/*homer*^{EP2141} unterscheiden sich mit ihrer Gedächtnisleistung ebenfalls nicht vom Zufallsniveau (alle Genotypen n = 18). Die statistische Auswertung ist der Tab. 70 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Für die weitere Analyse der Mutante wurde versucht, eine Phänokopie mittels RNAi zu erzeugen. Der *knock-down* von *homer* wurde in allen vier Ringsystemen durchgeführt (Abb. 52A; UAS-*homer*RNAi: Ni et al., 2008). Weder die UAS-Kontrolle für das RNAi-Transgen, noch die Expression dieses Konstrukts in den R1 Neuronen (c105-GAL4), R2 Neuronen (EB1-GAL4) oder R4 Neuronen (ftz-ng-GAL4) führen zu einem negativen Effekt in Bezug auf das Arbeitsgedächtnis. Allein die Herunterregulierung der *homer* mRNA in den R3 Neuronen hat einen deutlichen Effekt und führt zum kompletten Gedächtnisverlust, welcher eine vollständige Phänokopie der Mutante *homer*^{R102} widerspiegelt.

Um Entwicklungsdefekte des Nervensystems in der Mutante als Grund für das fehlende Arbeitsgedächtnis auszuschließen, wurde zusätzlich ein konditionaler *knock-down* durchgeführt. Die Tiere (189Y *Tub* > GAL80^{ts} > UAS-*homer*RNAi) wuchsen während der Entwicklung unter restriktiven Bedingungen bei 18 °C auf und zeigen anschließend eine wildtypische Gedächtnisleistung von 80 % (Abb. 52B). Dieselben Tiere wurden 24 h auf 30 °C gehalten, so dass sich der Repressor GAL80 von GAL4 löst und die Transkription der RNAi erlaubt. Anschließend wurden dieselben Tiere erneut getestet. Die Expression der *homer*RNAi in adulten Tieren hat einen vollständigen Verlust des Arbeitsgedächtnisses zur Folge. Auch bei der *homer* Mutante wird das Protein in einer adult-spezifischen Funktion benötigt.

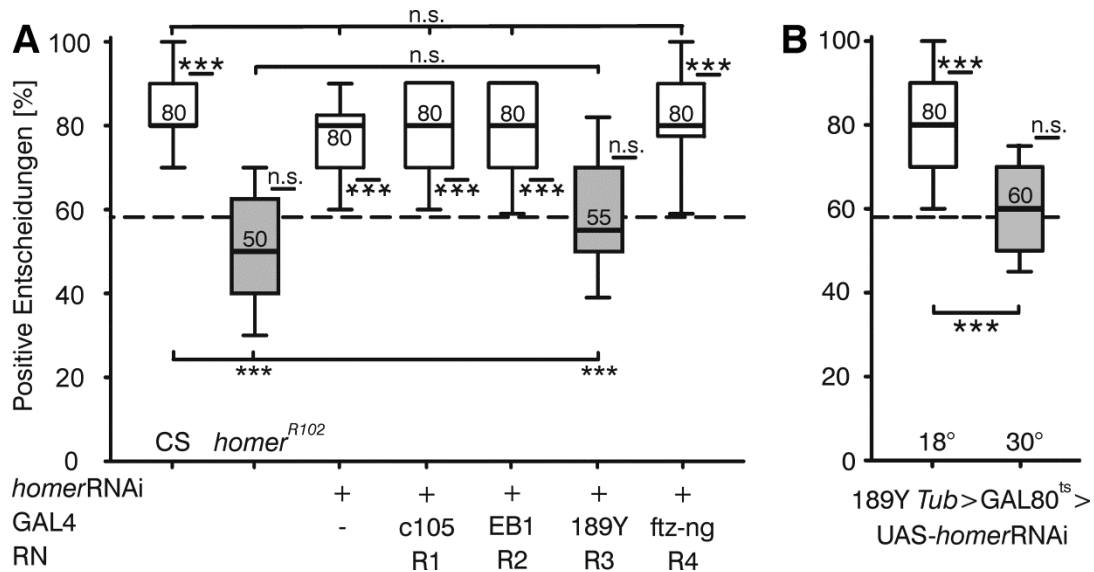


Abb. 52: *homer* wird in den R3 Neuronen für das visuelle Arbeitsgedächtnis benötigt. (A) Der *knock-down* der *homer* mRNA mittels RNAi in R1 Neuronen (c105-GAL4), R2 Neuronen (EB1-GAL4) und R4 Neuronen (ftz-ng-GAL4) zeigt keinen Einfluss auf das Orientierungsgedächtnis und unterscheidet sich somit nicht vom Wildtyp CS. Der *knock-down* in R3 Neuronen (189Y-GAL4) hat jedoch einen vollständigen Verlust des Gedächtnisses zur Folge und der Genotyp unterscheidet sich nicht mehr zur Nullmutante (alle Genotypen n = 18). (B) 189Y *Tub* > GAL80^{ts} > UAS-*homer*RNAi Tiere wuchsen bei 18 °C auf und weisen ein wildtypisches Gedächtnis auf. Induktion der RNAi durch Inkubation auf 30 °C für 24 h führt zum vollständigen Verlust der Gedächtnisleistung (beide Genotypen n = 14). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 71 und der Tab. 72 im Anhang zu entnehmen. Darstellungs-konventionen wie in Abb. 9. Abkürzung: RN (Ringneuron).

Um die bisherigen Befunde, dass Homer in R3 Neuronen für das Arbeitsgedächtnis benötigt wird, weiter zu unterstützen, wurde als nächster Schritt ein Rettungsexperiment durchgeführt. Da sowohl *homer* als auch 189Y-GAL4 (R3 Neurone) auf dem zweiten Chromosom liegen, wurde mit dem Allel *homer*^{EP2141} und dem Transgen 189Y-GAL4 eine Rekombination durchgeführt (Anhang Kapitel 8.1.3; Abb. 68).

Testet man sowohl die UAS-Kontrolle als auch das rekombinierte *homer*^{EP2141} Allel mit 189Y in einem *homer*^{R102} mutanten Hintergrund, so zeigen beide Stämme ein defektes Orientierungsgedächtnis (Abb. 53). Der Genotyp *homer*^{R102}/*homer*^{EP2141} 189Y-GAL4 weist mit einem Median von 50 % erneut keine *Turn-Kompensation* auf, jedoch unterscheidet er sich nicht von der UAS-Kontrolle (*homer*^{R102}/*homer*^{EP214}; UAS-*homer*/III), welche bei 60 % läuft. Wird jedoch in diesem genetischen Hintergrund zusätzlich die cDNA von *homer* (Diagana et al., 2002) in den R3 Neuronen exprimiert (*homer*^{R102}/*homer*^{EP2141} 189Y-GAL4; UAS-*homer*/III), so wird das Gedächtnis auf ein wildtypisches Niveau von 80 % vollständig wiederhergestellt. Dieses Experiment zeigt, dass die Funktion von Homer für das visuelle Orientierungsgedächtnis ausschließlich in den R3 Neuronen benötigt wird. Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass *homer*

nicht nur für ein Langzeitgedächtnis (Miyashita et al., 2012), sondern auch für die Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses benötigt wird.

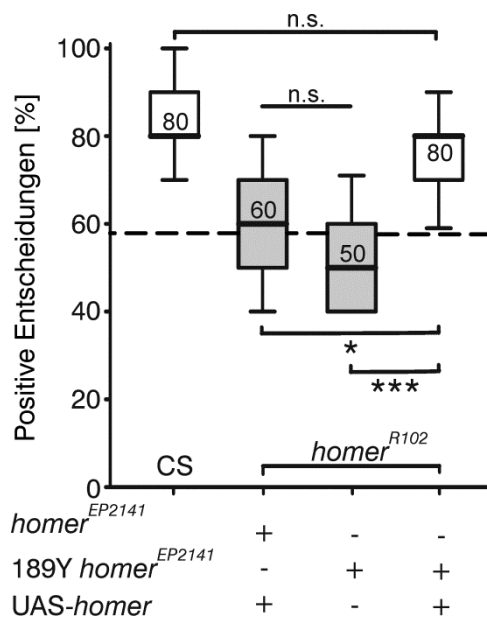


Abb. 53: Expression der *homer* cDNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) rettet den defekten Gedächtnisphänotyp der transheterozygoten *homer*^{R102}/*homer*^{EP2141} Tiere auf wildtypisches Niveau (alle Genotypen n = 18). Die statistische Auswertung ist der Tab. 73 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

3.10. Die Rolle des cAMP/Proteinkinase A-Signalweges

Der cAMP-Signaltransduktionsweg hat eine fundamentale und zentrale Rolle für die Gedächtnisbildung von *Drosophila* (McGuire et al., 2005; Kahsai und Zars, 2011; Waddell und Quinn, 2001). Jedoch konnte der Einfluss dieses Signalwegs auf das Ausbilden eines funktionsfähigen Arbeitsgedächtnisses noch nicht eindeutig geklärt werden (siehe Kapitel 1.5), da die *rut* Mutante keine gezielte Orientierung auf Landmarken zeigt und daher nicht im *Detour*-Paradigma getestet werden kann. Außerdem sind die Ergebnisse der *dnc*¹ Mutante (Neuser et al., 2008) aufgrund der 50 % PDE-Restaktivität des Allels (Davis und Kiger, 1981) nicht eindeutig.

Um die Beteiligung der cAMP-Signalkaskade noch einmal genauer zu betrachten, wurden konditionale RNAi-Experimente gegen *rut* durchgeführt (UAS-*rut*RNAi; Dietzl et al., 2007). Die transgenen Tiere (189Y *Tub* > GAL80^{ts}/II > UAS-*rut*RNAi) wurden unter restriktiven Bedingungen bei 18 °C aufgezogen und zeigen ein funktionales Orientierungsgedächtnis (Abb. 54). Hält man dieselben Tiere anschließend für 24 h auf 30 °C und induziert so die Expression der *rut*RNAi ausschließlich in den R3 Neuronen, so zeigen die Tiere erstens noch ein gerichtetes Anlaufverhalten auf die Landmarken, aber zweitens weisen sie den vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses auf.

Dieses Experiment zeigt sehr gezielt, dass die *rut* AC in den adulten R3 Neuronen für die Ausführung des visuellen Arbeitsgedächtnisses benötigt wird.

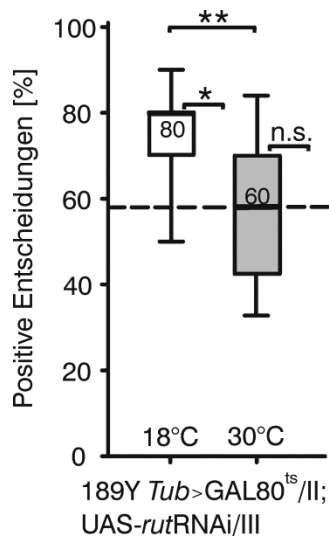


Abb. 54: Die *rut* AC wird in den R3 Neuronen für das Orientierungsgedächtnis benötigt. 189Y *Tub* > GAL80^{ts}/II > UAS-*rut*RNAi Fliegen wurden bei 18 °C aufgezogen und zeigen ein wildtypisches Gedächtnis. Induktion des *knock-downs* der *rut* mRNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) durch Inkubation auf 30 °C für 24 h führt zu einem vollständigen Verlust des Gedächtnisses (beide Genotypen n = 12). Die statistische Auswertung ist der Tab. 74 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Die Aktivität der Adenylzyklase (AC) führt zu einer vermehrten Produktion von cAMP, welches wiederum an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) bindet und durch eine Konformationsänderung die katalytischen Untereinheiten aktiviert (Waddell und Quinn, 2001). Bei *Drosophila* wurden drei katalytische Untereinheiten (PKA-C1, -C2, -C3) identifiziert (Kalderon und Rubin, 1988). Um zu überprüfen, ob auch die PKA für das visuelle Arbeitsgedächtnis benötigt wird, wurden ebenfalls konditionale *knock-down* Experimente gegen die drei katalytischen Untereinheiten der PKA induziert in den R3 Neuronen durchgeführt (Abb. 55). Alle transgenen Tiere wuchsen unter restriktiven Bedingungen auf, da bei 18 °C die Repressorfunktion von GAL80^{ts} aktiv ist (McGuire et al., 2003), keine RNAi induziert wurde und somit die Fliegen ein wildtypartiges Orientierungsgedächtnis von 80 % aufweisen. Reguliert man jedoch die PKA-C1 in den adulten R3 Neuronen herunter (24 h Induktion auf 30 °C), so zeigen die Fliegen einen kompletten Verlust des Gedächtnisses (Abb. 55A; UAS-*Pka-C1*RNAi: Dietzl et al., 2007). Auch die Transkription der PKA-C2RNAi hat eine leichte, aber nicht signifikante Reduzierung des Gedächtnisses auf 70 % zur Folge (UAS-*Pka-C2*RNAi; Ni et al., 2008). Es bleibt jedoch ein Restgedächtnis vorhanden (Abb. 55B). Der *knock-down* von PKA-C3 in adulten R3 Neuronen führt dagegen zu 60 % positiven Entscheidungen für die initiale

Landmarke und somit zu einem vollständigen Verlust des Gedächtnisses (Abb. 55C; UAS-*Pka-C3*RNAi: Ni et al., 2008).

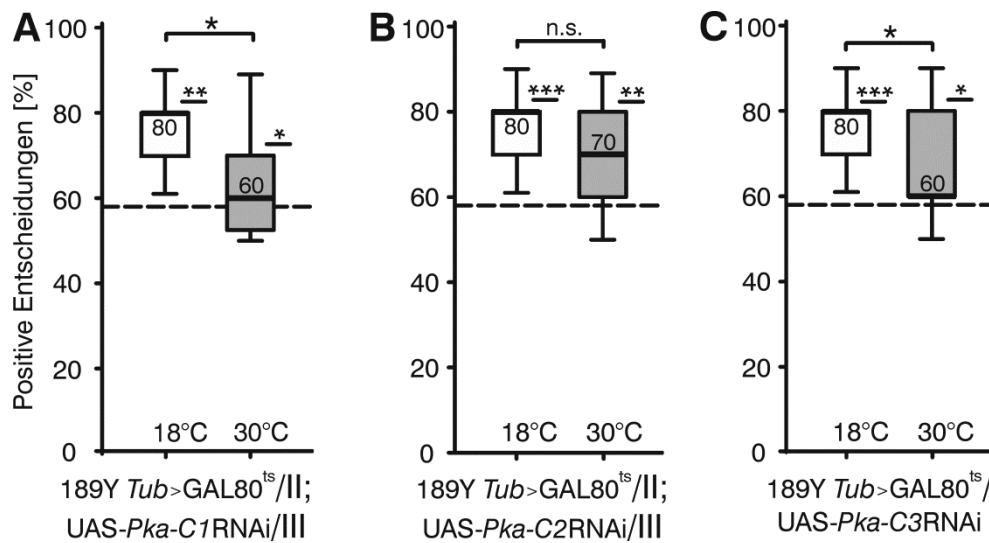


Abb. 55: Die Beteiligung der PKA-Untereinheiten. (A) Der adult-induzierte *knock-down* der *Pka-C1* mRNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) führt zu einem stark reduziertem Orientierungsgedächtnis (n = 12). (B) Der adult-induzierte *knock-down* der *Pka-C2* mRNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) zeigt eine leichte Verschlechterung auf 70 % Gedächtnisleistung, jedoch ist dies kein signifikanter Effekt (n = 12). (C) Der adult-induzierte *knock-down* der *Pka-C3* mRNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) hat ebenfalls eine deutliche Reduzierung der Gedächtnisleistung zur Folge (n = 12). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 75 bis Tab. 77 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Die Ergebnisse der RNAi-Experimente wurden mit einer Mutantenanalyse bestätigt und es wurden heterozygote Tiere des letalen *Pka-C1*^{H2} Allels (Lane und Kalderon, 1993) getestet. Diese Tiere zeigen ein reduziertes Orientierungsgedächtnis von 70 % Rückkehr auf das ursprüngliche Ziel und sind damit hoch signifikant schlechter als der Wildtyp CS (Abb. 56A). Zusätzlich wurde eine *Pka-C3* Mutante getestet, das homozygot lebensfähige *Pka-C3*^{BRL10} Nullallel, welche mit Hilfe einer synthetischen Deletion hergestellt wurde (Doris Kretzschmar; OHSU Portland). Homozygot mutante *Pka-C3* Fliegen weisen einen vollständigen Verlust des visuellen Arbeitsgedächtnisses auf und schlagen nur zu 60 % den ursprünglichen Weg wieder ein (Abb. 56B). Das defekte Orientierungsgedächtnis der *Pka-C3*^{BRL10} Mutanten kann jedoch nicht mit der spezifischen Treiberlinie 189Y-GAL4 gerettet werden. *Pka-C3*^{BRL10} Mutanten mit einer panneuralen Expression (*elav*-GAL4; III. Chromosom) von UAS-*Pka-C3* konnten nicht im *Detour*-Paradigma getestet werden, da sie kein gerichtetes Anlaufverhalten auf die Landmarken zeigen.

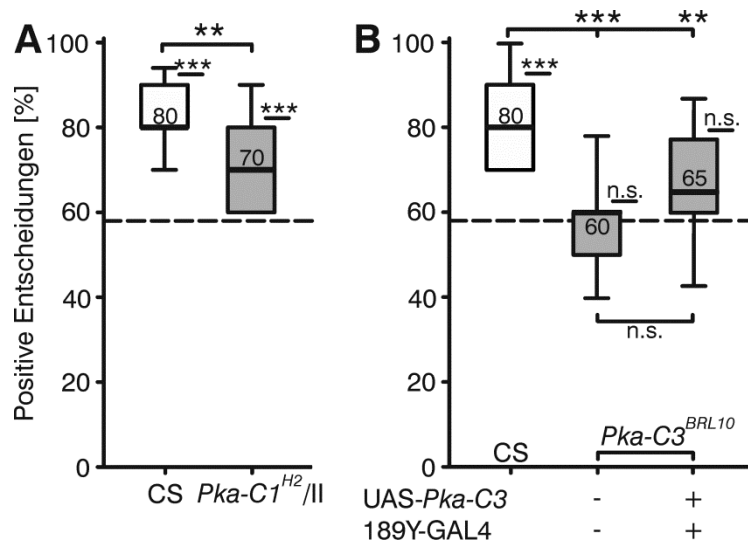


Abb. 56: Die Ergebnisse der RNAi-Experimente zur Beteiligung der PKA-Untereinheiten kann mit den Mutanten *Pka-C1^{H2}* und *Pka-C3^{BRL}* bestätigt werden. (A) Heterozygote *Pka-C1^{H2}/II* Mutanten zeigen ein reduziertes Orientierungsgedächtnis (beide Genotypen n = 15). (B) Die Mutante *Pka-C3^{BRL}* weist im Gegensatz zum Wildtyp CS einen vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses auf, dieser kann jedoch nicht in R3 Neuronen (189Y-GAL4) gerettet werden (alle Genotypen n = 12-15). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 78 und der Tab. 79 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass sowohl heterozygote *Pka-C1^{H2}/II* (Abb. 56A) als auch heterozygote *CrebB^{S162}/X* (Abb. 46) Tiere ein intermediäres Gedächtnis von 70 % im *Detour*-Paradigma haben und dass die Phosphorylierung von dCREB durch *ign* RSKII in den R3 Neuronen essentiell für das visuelle Arbeitsgedächtnis ist. Aus anderen Tiermodellen (*Aplysia*, *Apis mellifera*, *Mus musculus*) ist bekannt, dass die Aktivität der PKA über den Transkriptionsfaktor CREB zu induzierter Genexpression führt, welche wiederum zu synaptischer Plastizität führt (Kandel et al., 2014).

In einer genetischen Interaktionsstudie sollte nun auch für das Orientierungsgedächtnis untersucht werden, ob PKA und dCREB in einem Signalweg interagieren, also ob die Phosphorylierung von dCREB durch PKA notwendig für das Ausbilden des Gedächtnisses ist. Wie bereits erwähnt, haben sowohl heterozygote *Pka-C1^{H2}/II* als auch heterozygote *CrebB^{S162}/X* einen intermediären Phänotyp im *Detour*-Paradigma (Abb. 57). Doppelt heterozygote Tiere (*CrebB^{S162}/X*; *Pka-C1^{H2}/II*) hingegen zeigen keinen additiven Effekt, also keine Verschlechterung des Orientierungsgedächtnisses. Dieses Ergebnis ergibt keine eindeutige Erkenntnis, da eine genetische Interaktion nicht unbedingt im Phänotyp sichtbar werden muss. Jedoch gibt es erste Hinweise darauf, dass PKA und dCREB nicht in demselben Signalweg interagieren.

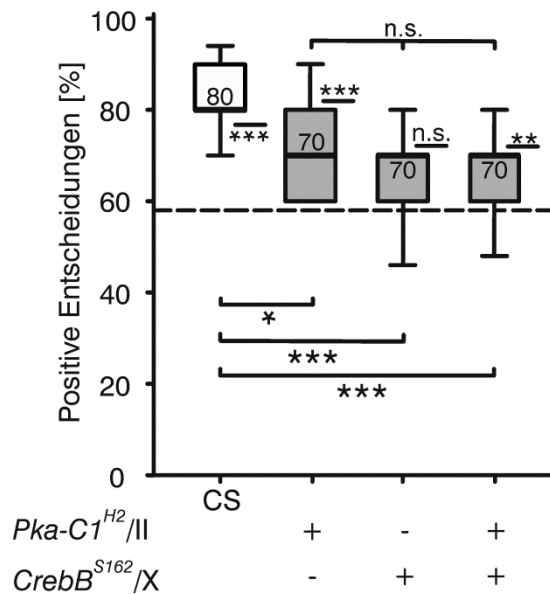


Abb. 57: Genetische Interaktion zwischen *Pka-C1* und *CrebB*^{S162}. Sowohl heterozygote *Pka-C1*^{H2/II} als auch *CrebB*^{S162/X} Fliegen zeigen ein reduziertes Orientierungsgedächtnis im Vergleich zum Wildtyp CS. Doppelt heterozygote Fliegen weisen jedoch keine additiven Effekte der Phänotypen auf (alle Genotypen n = 15). Die statistische Auswertung ist der Tab. 80 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Auf der Suche nach einem weiteren Signalweg, der mit cAMP/PKA assoziiert ist und unabhängig von dCREB ist, wurde das Synapsen-assoziierte Protein Synapsin untersucht. Bei Vertebraten ist die Familie der Synapsine gut untersucht - sie binden an synaptische Vesikel und ebenso an Aktin des Cytoskeletts (Greengard et al., 1993; Hilfiker et al., 1999), wodurch der sogenannte Reservepool aus Vesikeln zusammengehalten wird. Durch PKA-Phosphorylierung des Synapsins können die synaptischen Vesikel von diesem Reservepool dissoziieren und zur aktiven Zone wandern (Hosaka et al., 1999; Akbergenova und Bykhovskaia, 2007 und 2010). Bei *Drosophila* gibt es nur ein Gen für *Synapsin* (*Syn*; Klagges et al., 1996) und eine Nullmutante *Syn*⁹⁷, bei der Teile des Promotors inklusive des wahrscheinlichen Transkriptionsstarts, das erste Exon und Teile des ersten Introns deletiert sind (Godenschwege et al., 2004).

Die *Syn*⁹⁷ Mutanten zeigen einen deutlichen Verlust des visuellen Orientierungsgedächtnisses im Vergleich zum Wildtyp CS (Abb. 58). Dieser lässt sich jedoch durch die Expression der cDNA in den R3 Neuronen auf ein wildtypisches Niveau wiederherstellen (189Y/II; *Syn*⁹⁷/UAS-*Syn* (UAS-*Syn*: Godenschwege et al., 2004)). Die UAS- und die GAL4-Kontrolle hingegen zeigen den defekten Phänotyp.

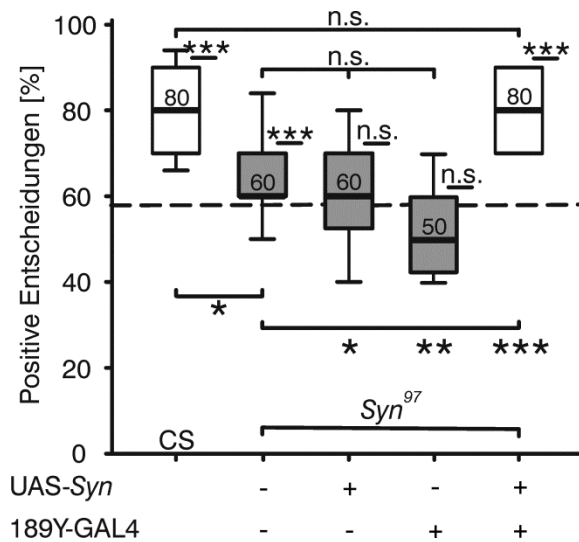


Abb. 58: *Synapsin* wird für ein funktionsfähiges Orientierungsgedächtnis in R3 Neuronen benötigt. Die Mutante *Syn⁹⁷* zeigt eine reduzierte Orientierungsleistung im Vergleich zu CS, welche jedoch durch Expression der *Syn* cDNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) auf wildtypisches Niveau gerettet werden kann. Kontrollen für das UAS- und das GAL4-Konstrukt im *Syn⁹⁷* mutanten Hintergrund unterscheiden sich nicht vom Zufallsniveau (alle Genotypen n = 15-20). Die statistische Auswertung ist der Tab. 81 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Als nächster Schritt sollte die Verknüpfung zum cAMP/PKA-Signalweg untersucht werden. Heterozygote Tiere (*Pka-C1^{H2}/II* und *Syn⁹⁷/III*) zeigen einen intermediären bzw. einen wildtypischen Gedächtnislevel (Abb. 59). Doppelt heterozygote Tiere (*Pka-C1^{H2}/II; Syn⁹⁷/III*) hingegen weisen einen vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses auf, was auf ein Zusammenwirken dieser beiden Komponenten schließen lässt.

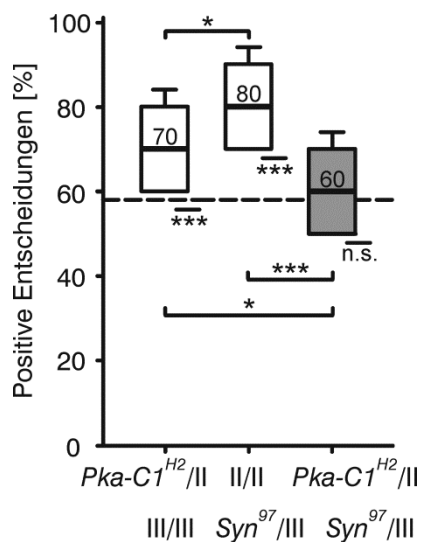


Abb. 59: Genetische Interaktion zwischen *Syn* und *Pka-C1*. Heterozygote *Pka-C1^{H2}/II* Fliegen zeigen ein intermediäres Orientierungsgedächtnis, während einfach heterozygote *Syn⁹⁷/II* Tiere ein wildtypisches Gedächtnis aufweisen. Doppelt heterozygote Fliegen hingegen zeigen einen additiven Effekt der Phänotypen und haben das Orientierungsgedächtnis vollständig verloren. (alle Genotypen n = 25). Die statistische Auswertung ist der Tab. 82 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Durch die genetische Interaktion von *Pka* und *Syn* konnte ein weiterer Hinweis gesammelt werden, dass cAMP/PKA/SYN in einem Signalweg interagieren, in dem möglicherweise eine Kurzzeitkomponente für das Arbeitsgedächtnis liegt, die über die schnelle Verfügbarkeit von Vesikel reguliert wird. Zur Überprüfung der Hypothese,

dass der PKA-Signalweg für eine Kurzzeitkomponente verantwortlich sein könnte, wurden pharmakologische Experimente mit dem PKA-Inhibitor Rp-cAMPS (Vergleichsstudie: Moore et al., 1998) durchgeführt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Eine Kontrollgruppe (erhält nur die Zuckerlösung) und eine experimentelle Gruppe (erhält die Zuckerlösung und zusätzlich das Pharmakon). Die Tiere wurden sowohl vor als auch nach der Inkubationszeit im *Detour*-Paradigma getestet. Die Tiere wurden individuell gehalten, so dass ein eins-zu-eins Vergleich möglich war.

Der PKA-Inhibitor Rp-cAMPS wurde als erstes mit einer Konzentration von 200 μM und einer Inkubationszeit von 2 h an CS Tiere verfüttert (Abb. 60A). Während die Kontrollgruppe, welche 2 h nur auf der Zuckerlösung saß, keine Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung zeigt, ist bei der experimentellen Gruppe nach Aufnahme des Inhibitors der komplette Verlust des Arbeitsgedächtnisses zu beobachten. Die Tiere zeigen sogar nur ein Zurückkehren auf die alte Landmarke in 50 % der Fälle, was bedeutet, dass die *Turn-Kompensation* durch den Inhibitor ebenfalls eliminiert wurde. Wird die Inkubationszeit des Inhibitors auf 30 min reduziert (ebenso 200 μM ; Abb. 60B), wird eine ähnliche Wirkung erzielt. Selbst nach der verkürzten Inkubationszeit zeigt sich der vollständige Verlust des Gedächtnisses durch die Aufnahme des Inhibitors. Die Kontrollgruppe zeigt eine leichte Verschlechterung des Orientierungsgedächtnisses auf 75 %. Verkürzt man die Inkubationszeit auf 5 min bei gleichbleibender Konzentration von 200 μM , so zeigt sich immer noch eine starke Verschlechterung des visuellen Orientierungsgedächtnisses auf 55 % (Abb. 60C). Die Kontrollgruppe zeigt auch hier vor und nach der Zuckeraufnahme im Median ein Gedächtnis von 80 %, jedoch gibt es eine signifikante Verschlechterung der Einzeltiere. Da eine weitere zeitliche Graduierung experimentell schwer durchführbar ist, wurde als nächster Schritt die Konzentration des Inhibitors auf 100 μM gesenkt (Abb. 60D). Nach 5 min Inkubationszeit zeigen die Fliegen ein reduziertes Gedächtnis auf 70 % positive Entscheidungen, welches sich nicht vom Zufallsniveau unterscheidet. Jedoch ist auch eine deutlich schwächere Wirkung des Inhibitors aufgrund der verminderten Konzentration zu beobachten. Die Kontrollgruppe zeigt das gleiche Phänomen wie in Abb. 60C. Reduziert man die Konzentration des PKA-Inhibitors weiter auf 50 μM (Abb. 60E) bei einer Inkubationszeit von 5 min, so zeigt sich immer noch ein reduziertes Gedächtnisniveau von 70 %, jedoch ist hier ein leichter Trend nach oben zu erkennen und die Entscheidungen der Fliege unterscheiden sich höchst signifikant vom Zufallsniveau. Die Kontrollgruppe zeigt erneut keine Beeinflussung durch die

Applikation. Reduziert man die Konzentration von Rp-cAMPS weiter auf 10 μ M bei einer Inkubationszeit von 5 min, so ist kein Einfluss des Inhibitors mehr auf das Arbeitsgedächtnis der Fliegen zu beobachten (Abb. 60F). Die Kontrollgruppe zeigt erneut keinen Einfluss der Behandlung.

Die Kontrollgruppen, welche eine Zuckerlösung als Medium verabreicht bekommen haben, zeigen in einigen Telexperimenten ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der Gedächtnisleistung vor und nach der Aufnahme des Mediums. Der Median der gesamten Kontrollgruppe bleibt jedoch bei 80 % oder fällt nicht unter 75 %, so dass die Fliegen immer noch ein normales, wildtypisches Gedächtnis aufweisen. Die leichte Verschlechterung der Einzeltiere ist vermutlich auf die Handhabung der Fliegen während des Experiments, sowie während der Inhibitorapplikation oder auf äußere Bedingungen zurückzuführen. Die Verfütterung des PKA-Inhibitors an wildtypische Fliegen zeigt, dass dieser das visuelle Orientierungsgedächtnis nicht nur innerhalb von 2 Stunden, sondern sogar innerhalb von 5 Minuten vollständig zerstören kann. Damit kann dem cAMP/PKA-Signalweg eine Rolle in der schnellen und kurzfristigen Modulation der Neurone für dieses 4 s Gedächtnis zugeordnet werden.

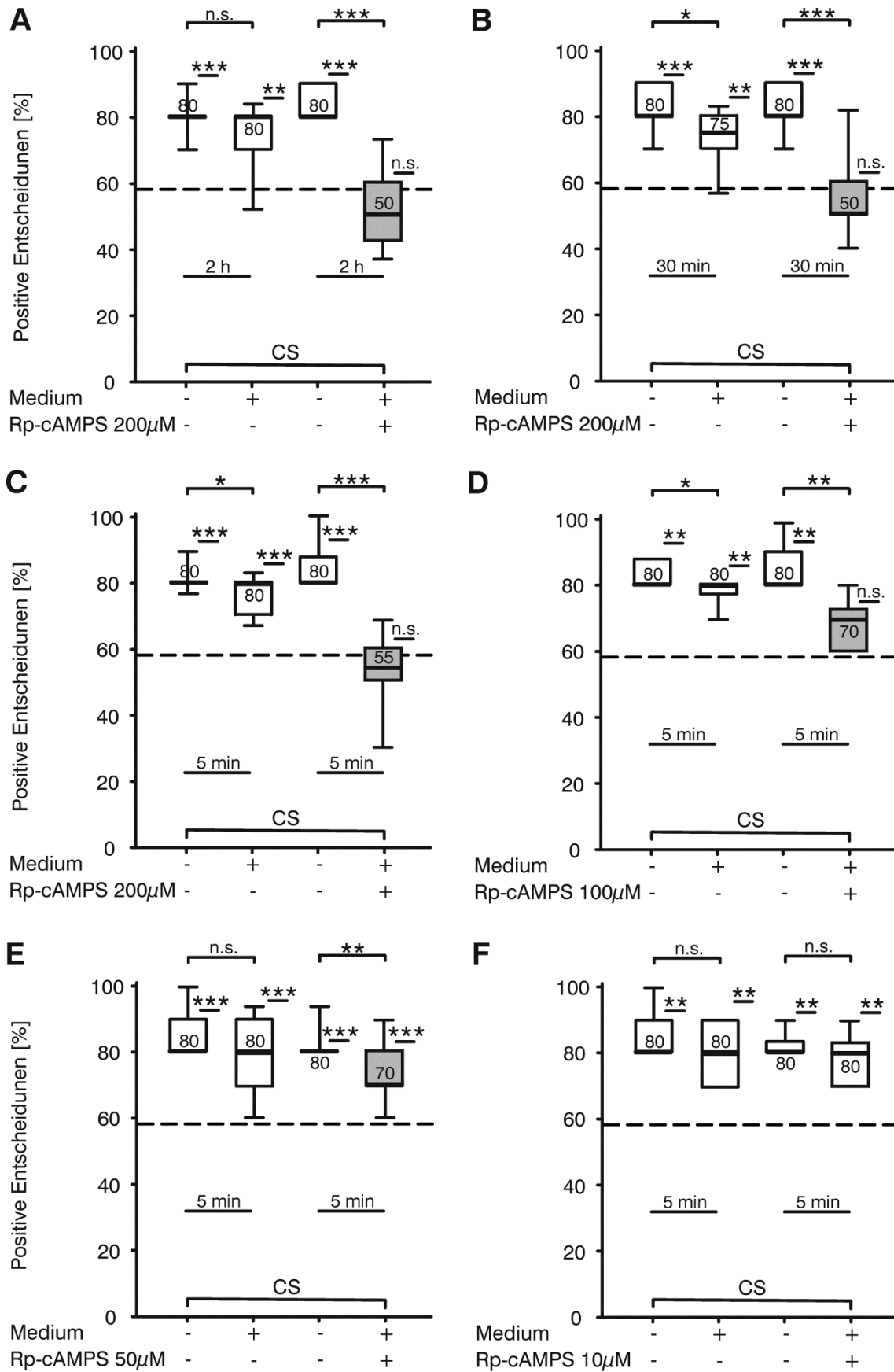


Abb.60: Abbildungsunterschrift siehe nächste Seite.

Abb. 60: Pharmakologische Applikation des PKA-Inhibitors Rp-cAMPS. Dieselben Individuen wurden vor und nach der Behandlung ohne Inhibitor (Kontrollgruppe) oder mit Inhibitor (experimentelle Gruppe) getestet (alle Gruppen n = 15-16). (A) Konzentration des Inhibitors: 200 μ M, Inkubation: 2 h zerstört das Orientierungsgedächtnis vollständig. Die Kontrollgruppe zeigt keinen Effekt. (B) Konzentration des Inhibitors: 200 μ M, Inkubation: 30 min zerstört das Orientierungsgedächtnis vollständig. Die Kontrollgruppe zeigt ebenfalls eine leichte Verschlechterung. (C) Konzentration des Inhibitors: 200 μ M, Inkubation: 5 min führt zu einem vollständigen Verlust des Gedächtnisses. Die Kontrollgruppe zeigt nach der Aufnahme von Zuckermedium einen Median von 80 % Orientierungsleistung, jedoch haben die Einzeltiere eine Verschlechterung durch die Inkubation erfahren. (D) Konzentration des Inhibitors: 100 μ M, Inkubation: 5 min reduziert das Orientierungsgedächtnis auf 70 %. Die Kontrollgruppe zeigt die gleichen Effekte wie in (C). (E) Konzentration des Inhibitors: 50 μ M, Inkubation: 5 min reduziert das Orientierungsgedächtnis auf 70 %. Die Kontrollgruppe zeigt keine Effekte. (F) Konzentration des Inhibitors: 10 μ M, Inkubation: 5 min. Weder in der Kontroll-, noch in der experimentellen Gruppe sind Effekte durch das Zuckermedium oder den Inhibitor zu beobachten. Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 83 bis Tab. 88 im Anhang zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Orientierungsverhalten von *Drosophila*, welches den Tieren eine ununterbrochene zielgerichtete Bewegung in der Umwelt ermöglicht. Dabei spielen nicht nur akute sensorische Eingänge eine Rolle, sondern auch gespeicherte Informationen, auf die zurückgegriffen wird, wenn Erstere kurzzeitig nicht zugänglich sind. Mit Hilfe des Modellorganismus *Drosophila* wurde ein visuelles Arbeitsgedächtnis für Zielobjekte untersucht. Wird eine Fliege beim zielgerichteten Anlaufen einer Landmarke durch ein neues, kurzzeitig sichtbares Objekt abgelenkt und erhält anschließend keinerlei visuelle Information zur Orientierung, so findet sie trotzdem die Position der ersten Landmarke wieder und kann ihre zielgerichtete Bewegung fortsetzen. Dieses Orientierungsverhalten beruht auf Pfadintegration (Dissertation Mronz, 2004; Neuser et al., 2008).

Für das visuelle Orientierungsgedächtnis konnten in dieser Arbeit zwei beteiligte Gasotransmitter, Schwefelwasserstoff (H_2S) und Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden. Für H_2S wurde dabei erstmals überhaupt eine endogene Rolle in Lern- und Gedächtnisprozessen nachgewiesen. Des Weiteren wurde für *Drosophila* erstmals die Beteiligung von NO an einer Gedächtnisbildung gezeigt. Dabei ist die NO-Synthase (NOS) vermutlich präsynaptisch lokalisiert und außerdem wurde eine intrazelluläre Wirkung von NO beschrieben. Schließlich wurden auch die Proteinkinase A (PKA) und Synapsin als relevante Faktoren für kurzzeitige Veränderungen der Ringneurone des Typs R3 identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der biochemische Signalweg für die Ausbildung des visuellen Orientierungsgedächtnisses bei *Drosophila* analysiert (Abb. 61): NO wird durch die NO-Synthase (NOS) synthetisiert, während die Entstehung von H_2S vielseitig ist und bei *Drosophila* die beiden Enzyme Cystathionin- β -Synthase (CBS) und Cystathionin- γ -Lyase (CSE) verantwortlich sind. Beide Gase werden benötigt, um den cGMP-Level in den R3 Neuronen auf einem hohen Niveau zu halten. NO wirkt dabei über die lösliche Guanylylzyklase (sGC), welche die Umwandlung von Guanosin-triphosphat in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert (Davies, 2006). H_2S hat hingegen eine inhibitorische Wirkung auf die cGMP-Phosphodiesterase (cGMP-PDE; Bucci et al., 2010), welche für den Abbau von cGMP verantwortlich ist. Durch die Freisetzung von H_2S wird also die Aktivität der cGMP-PDE reduziert,

wodurch wiederum der Abbau von cGMP verzögert wird. Der erhöhte cGMP-Level in den R3 Neuronen führt zur Aktivierung der *for* PKG und schließlich zur Aktivierung der *ign* RSKII, welche wiederum die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element-binding protein*) fördert und somit für ein permanent erhöhtes CREB-Level in den R3 Neuronen sorgt. Ein erhöhter CREB-Level erlaubt es der Zelle, permanent das Expressionslevel von Kompetenzfaktoren wie *homer* auf einem hohen Niveau zu halten.

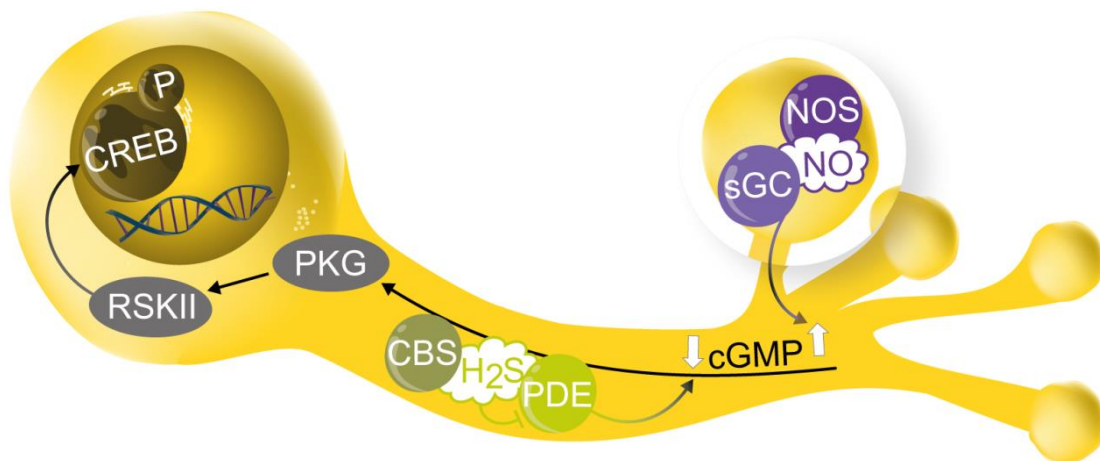


Abb. 61: Schematische Darstellung der konzertierten Wirkung von NO und H₂S auf die Aufrechterhaltung eines erhöhten cGMP-Niveaus in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers. cGMP aktiviert die PKG, welche wiederum aktivierenden Einfluss auf die RSKII hat. Die Phosphorylierung von dCREB durch RSKII führt zu einer vermehrten Expression von Kompetenzfaktoren, welche essentiell für ein funktionsfähiges visuelles Orientierungsgedächtnis sind. Abkürzungen: NOS (Nitritoxid-Synthase), NO (Stickstoffmonoxid), sGC (lösliche Guanylylzyklase), cGMP (Zyklisches Guanosinmonophosphat), CBS (Cystathionin-β-Synthase), H₂S (Schwefelwasserstoff), PDE6 (Phosphodiesterase 6), PKG (Protein-kinase G), RSKII (Ribosomale-S6-Kinase II), P-CREB (phosphoryliertes (aktiviertes) *cAMP response element-binding protein*).

4.1. Die endogene Rolle von H₂S bei Lern- und Gedächtnisprozessen

Während die neuronale Funktion von NO als retrograder Botschaftenstoff und als gasförmiger Transmitter ausgiebig erforscht und anerkannt ist, blieb die Rolle von H₂S als Neuromodulator sehr kontrovers. Bereits im 16. Jahrhundert wurde die toxische Wirkung von H₂S beschrieben. Menschen, die eine Sulfidvergiftung überlebten, zeigten starke Gedächtnisverluste und heute ist bekannt, dass eine akute Intoxikation mit H₂S die Monoamin-Oxidase inhibiert und so enormen Einfluss auf den Neurotransmitter-Level im Gehirn hat (Warenycia et al., 1989). In elektrophysiologischen Studien wurde außerdem gezeigt, dass H₂S sowohl Ca²⁺-Kanäle als auch Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle in

serotonergen Neuronen aktiviert und so in die Neurotransmission eingreift (Kombian et al., 1993). Des Weiteren wurden Fehlfunktionen des H₂S-produzierenden Enzyms CBS mit neurodegenerativen Krankheiten wie dem *Down Syndrom* und der Alzheimer Krankheit in Verbindung gebracht. Es wurden jedoch auch neuroprotektive Eigenschaften von H₂S gegen den oxidativen Stress einer Zelle beschrieben, was auch auf eine physiologische Funktion von endogenem H₂S rückschließen lässt. H₂S wirkt sich ebenfalls auf die Relaxation der glatten Muskulatur aus, wirkt als Modulator bei Entzündungsreaktionen, hat anti-nozizeptive Effekte auf den Gastrointestinal-Trakt und wurde als Mediator von Nozizeption im peripheren Gewebe beschrieben (ausführlicher Review Kimura, 2010).

Sowohl die Enzyme CBS und CSE, als auch geringe Mengen endogenes H₂S wurden im Gehirn nachgewiesen (Paul und Snyder, 2012; Paul et al., 2014; Brintjes et al., 2014). Die Detektion und Messung von frei diffundierenden H₂S-Mengen im Gehirn oder in Gewebe ist äußerst schwierig. Die gemessenen Werte unterscheiden sich stark und sind abhängig von der angewandten Quantifizierungsmethode. Es lässt sich jedoch festhalten, dass H₂S als Neurotransmitter in sehr geringen Mengen im nM- bis µM-Bereich vorkommt. Außerdem kommt H₂S auch in gebundener Form vor und dient so als H₂S-Speicher (Kimura, 2010). Über die Wirkungsweise von H₂S ist relativ wenig bekannt, jedoch ist der Mechanismus der Protein-Sulfydrierung aufgeklärt, der an einem reaktiven Cystein-Aminosäurerest eines Zielproteins angreift. Eine Sulfydrierung könnte den Cystein-Aminosäurerest vor Oxidierung schützen und auf diese Weise neuroprotektiv gegen oxidativen Stress wirken (Paul und Snyder, 2012).

In Menschen führen Defekte im *Cbs* Gen zu der Aminosäurestoffwechselkrankheit Homocystinurie, was in weitreichenden Entwicklungsdefiziten und kognitiven Beeinträchtigungen resultiert. Häufig wird als Therapieform eine aminosäurearme Diät und eine zusätzliche Aufnahme von Cystein und Vitamin B6 verordnet (Schiff und Blom, 2012). Ähnliches konnte in einer aktuellen Studie mit *cse* *-/- knock-out* Mäusen gezeigt werden. Diese Mäuse sind durch Phänotypen wie oxidativem Stress und motorische Defizite charakterisiert. Gleichartige Phänotypen aufgrund von oxidativem Stress werden auch bei Mäusen gefunden, in denen mutantes Huntingtin exprimiert wird. Und in der Tat ist die CSE-Expression in den Modellmäusen der Huntington-Krankheit bzw. in erkrankten Patienten deutlich reduziert. Durch einfaches Zufüttern von Cystein als Substrat der CSE können in diesen Mäusen sowohl die neurodegenerativen Prozesse abgemildert, als auch motorische Defizite aufgehoben werden. Dies lässt Rückschlüsse

zu, dass Teile der Symptomatik der Huntington-Krankheit auf die verminderte CSE-Expression und somit verminderte H₂S-Produktion zurückzuführen ist (Paul et al., 2014). Wie vermindert H₂S den oxidativen Stress in Zellen? In Fibroblastenzellen der Maus wurde gezeigt, dass H₂S zur Sulfhydrierung von *Keap1* führt. *Keap1* ist ein negativer Regulator des Transkriptionsfaktors *Nrf2*. Durch die Sulfhydrierung von *Keap1* dissoziiert dieser Regulator von *Nrf2* und fördert somit die Expression der Zielgene von *Nrf2*. Zu diesen Zielgenen gehört die Glutathion-Reduktase, welche Glutathiondisulfid zu Glutathion reduziert. Glutathion wirkt als einer der wichtigsten Antioxidantien in der Zelle und hat somit positive Effekte auf den oxidativen Stress einer Zelle (Yang et al., 2012). Auch das *Drosophila* Homolog zu *Nrf2* (*cap-n-collar*) ist in der Zellantwort auf oxidativen Stress involviert und reguliert die transkriptionale Kontrolle von Enzymen, welche in die Glutathion-Synthese involviert sind (Sykiotis et al., 2011).

Die Rolle von H₂S bei der synaptischen Plastizität konnte bisher hingegen nicht eindeutig geklärt werden. Zwar wurde auf hippocampalen Gehirnschnitten von Ratten durch die Zugabe von exogenem H₂S die Bildung einer Langzeit-Potenzierung begünstigt (Abe und Kimura, 1996), jedoch konnten diese Ergebnisse mit hippocampalen Gehirnschnitten einer *cbs* *-/-* *knock-out* Maus nicht bestätigt werden (diskutiert in Boehning und Snyder, 2003). Eine neue Studie zeigt jedoch einen Mechanismus, wie H₂S die Gedächtnisausbildung in einem weiteren Krankheitsmodell beeinflusst. Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 β induziert die Transkription von *Cbs*, was zu einer vermehrten H₂S-Produktion führt. In Dendriten modifiziert H₂S über den Mechanismus der Sulfhydrierung die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, wodurch die Bindung zu einer Ubiquitin-Ligase gefestigt wird, was schließlich zum Abbau von PSD 95 (*postsynaptic density protein 95*) führt. PSD 95 ist an der strukturellen Organisation von Synapsen beteiligt und spielt daher eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität bzw. bei der Stabilisierung von synaptischen Modifikationen bei der Langzeit-Potenzierung. Dementsprechend wurde bei Mäusen, die einen durch Interleukin-1 β induzierten und H₂S-vermittelten Abbau von PSD 95 erfuhren, ein verschlechtertes Gedächtnis beobachtet. Diese Verhaltensdefizite konnten durch Heterozygotität des *Cbs* Gens und somit reduzierter H₂S-Aktivität teilweise aufgehoben werden (Mir et al., 2014). Da jedoch heterozygote *cbs* *+/-* Mäuse keine Defekte im Lernverhalten zeigen, blieb die Frage nach der endogenen Funktion von neuronaler CBS und H₂S offen.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals eine Funktion von endogenem H₂S für eine Gedächtnisleistung. Dies zeigt sich am Beispiel des visuellen Orientierungsgedächtnisses bei *Drosophila*, da sowohl CBS-Mutanten, die das hypomorphe *Cbs*^{EY} Allel tragen, als auch CSE-Mutanten, die mit dem Allel *Eip55E*^{KG} ausgestattet sind, einen vollständigen Verlust des Gedächtnisses aufweisen (Abb. 21). Da die Untersuchungen der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante in der Hypothese zur Beteiligung eines diffusiblen Faktors resultierten (Thran et al., 2013), wurde ein Zusammenhang zwischen *ebo*⁶⁷⁸ und H₂S mit Hilfe einer genetischen Interaktion überprüft. Diese konnte positiv bestätigt werden, da doppelt heterozygote Tiere (*ebo*⁶⁷⁸/Df(CBS) bzw. *ebo*⁶⁷⁸/X; Df(CSE)/II) einen vollständigen Verlust bzw. eine starke Reduzierung des Orientierungsgedächtnisses aufweisen (Abb. 24). Des Weiteren kann das Gedächtnisdefizit der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante durch die gezielte Überexpression von CBS in R2 oder R3 Neuronen gerettet werden (Abb. 25). Dieses erfolgreiche Rettungsexperiment zeigt nicht nur, dass die Überexpression von *Cbs* den *ebo*⁶⁷⁸ Gedächtnisphänotyp kompensieren kann, sondern auch dass H₂S offenbar über Zellgrenzen hinweg wirken kann, da die Gedächtnisspur in den R3 Neuronen lokalisiert wurde (Abb. 11; Abb. 42; Abb. 46; Abb. 52), eine Überexpression in den R2 Neuronen jedoch ebenso die Kompensation des Gedächtnisdefizits bewirkt. H₂S nimmt somit für die Ausbildung des visuellen Arbeitsgedächtnisses seine Funktion als Gasotransmitter wahr. Das defekte Orientierungsgedächtnis der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante kann ebenfalls durch die einfache Zufütterung von Cystein gerettet werden (Abb. 26). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch die Erhöhung des Substrats Cystein der Umsatz von den in der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante verbleibenden CBS- und CSE-Enzymen erhöht wird, was wiederum in einem höheren H₂S-Niveau resultiert und schließlich über die Hemmung der PDE6 durch H₂S zu einer Erhöhung der cGMP-Menge in der Zelle führt.

4.2. Eine neue Rolle von NO beim Lernen von *Drosophila*

Neben dem Gasotransmitter H₂S wurde auch NO als relevanter gasförmiger Neuromodulator für das visuelle Arbeitsgedächtnis identifiziert. NO wurde in den 80er Jahren bereits als relaxierender Faktor für das Endothelium identifiziert, 1990 wurde das erste NOS-Enzym aus dem Cerebellum einer Ratte aufgereinigt und kloniert, und anschließend wurden drei verschiedene Isoformen charakterisiert: Die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS) und die induzierbare NOS (iNOS; Cossenza et al., 2014). NO werden heute vielfältige Funktionen zugeschrieben: Unter ihnen ein

normales Lernverhalten und die Gedächtnisausbildung, Regulation des Ess- und Schlafverhaltens, Einfluss auf das Reproduktionsverhalten, sowie diverse Rollen bei sensorischen und motorischen Funktionen (Garthwaite, 2008). Die berühmteste neuronale Funktion übt NO wohl als retrograder Botenstoff aus. Dabei werden die NMDA-Rezeptoren durch Glutamat von der Präsynapse erregt, so dass es zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom kommt, welcher NOS aktiviert. NO wirkt interzellulär und diffundiert anschließend retrograd zur Präsynapse, wo es die Transmitterausschüttung beeinflusst und auf diese Weise Langzeit-Potenzierung oder Langzeit-Depression induziert (O'Dell et al., 1991; Garthwaite 2008).

Der Gasotransmitter NO wirkt ebenfalls in niedermolekularen Bereichen von 1 nM mit einer Halbwertszeit der Aktivität von 200 ms und einem Diffusionskoeffizienten von $0,8 \mu\text{m}/100 \mu\text{s}$ in neuronalem Geweben, so dass eine konstante Diffusion in und aus dem NO-produzierenden Kompartiment gegeben ist. NO kann also sowohl gleichzeitig prä- als auch postsynaptisch wirken, je nach Lokalisation des NO-Rezeptors. Die kanonische Signaltransduktion von NO geht über den Hauptrezeptor sGC, resultierend in einem erhöhten cGMP-Level und der anschließenden Aktivierung der PKG (Garthwaite 2008). Es wurden jedoch auch viele andere nachgeschaltete Signalwege identifiziert, sowie der NO-Einfluss auf die Ausschüttung diverser Neurotransmitter berichtet. Unter den vielfältigen Befunden über die Beteiligung von NO auf diverse Lernverhalten (Cossenza et al., 2014) befindet sich auch eine erste Verhaltensstudie mit *nos* *-/- knock-out* Mäusen, die eine frühe Verschlechterung des räumlichen Gedächtnisses im *Morris-water-maze*-Paradigma der *nos* *-/- knock-out* Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Artgenossen nachweist (Kirchner et al., 2004; Weitzdoerfer et al., 2004). Der pharmakologische Einsatz von NOS-Inhibitoren hat hingegen zu kontroversen Aussagen geführt. Bei Ratten wurde eine Verschlechterung des räumlichen Lernens durch Applikation eines NOS-Inhibitors (7-Nitro Indazole) beschrieben (Hölscher et al., 1996). In einer anderen Studie wurden die Auswirkungen des NOS-Inhibitors L-NNA (N ω -Nitro-L-Arginin) nicht als Ursache für eine Verschlechterung des räumlichen Ortsgedächtnisses gesehen, da die Ratten trotz Inhibitor z.B. ein Ortsgedächtnis für die versunkene Plattform nach nur einem Trainingsversuch ausbilden konnten (Bannerman et al., 1994). Eine neuere Studie mit Ratten zeigt jedoch, dass die Injektion des NOS-Inhibitors L-NNA in die CA1-Region des Hippocampus zu einer Verschlechterung des Ortsgedächtnisses im *Morris water-maze*-Paradigma führt, welche jedoch durch die Gabe von L-Arginin, der Vorstufe von NO, wieder aufgehoben werden kann (Majlessi

et al., 2008). Auch bei Invertebraten wurden bisher nur NOS-Inhibitor-Experimente durchgeführt. In der Honigbiene *Apis mellifera* hat die Inhibition der NO-Synthase die Verschlechterung eines olfaktorischen Langzeitgedächtnisses zu Folge (Müller, 1996), während im Tabakschwärmer *Manduca sexta* durch NOS-Inhibition die Beeinträchtigung eines olfaktorischen Kurzzeitgedächtnisses berichtet wird (Gage et al., 2013). Bei Grillen wurde außerdem durch eine pharmakologische Blockade der NOS eine Reduzierung eines visuellen Mustergedächtnisses beobachtet (Matsumoto et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Nos* Mutanten im visuellen Orientierungsparadigma ein stark verschlechtertes Gedächtnis auf die verschwundene Landmarke ausbilden (Abb. 17A). Die Lokalisation von NOS wurde im adulten Gehirn mit einem *Drosophila*-spezifischen Antikörper analysiert. NOS ist im gesamten Gehirn breit exprimiert, mit besonders starker Expression in den optischen Loben, dem suboesophagalen Ganglion, dem fächerförmigen Körper und dem Ellipsoidkörper. Die Expression tritt stark strukturiert in Clustern auf und es befindet sich kaum Expression in den Zellkörpern (Abb. 13). Die „Pünktchen“ oder Cluster zeigen eine präzise und sehr zielgerichtete Anordnung der Synthase. In den axonalen Projektionen und den synaptischen Regionen der R3 Neurone kann eine dichte Packung der NOS-Cluster beobachtet werden, während um diesen Ring eine Anordnung von einer geringen Clusterbildung („Pünktchenwolke“) detektiert werden kann. Diese punktuellen Strukturen, welche die R3 Neuronen umgeben, liegen im Bereich der R2 Neurone. Daher könnte es sich um Cluster handeln, die eine synaptische Verbindung zwischen R2, R3 Neuronen und/oder Kleinfeldneuronen (*small field neurons*) ausbilden. Dies kann aufgrund der Auflösungsgrenze des Objektivs nicht eindeutig beurteilt werden.

Neben der NOS-Lokalisation in den axonalen Projektionen der R3 Neurone kann mit dem anti-NOS-Serum keine Lokalisation der Synthase in den Zellkörpern der R3 Neurone gefunden werden (Abb. 13). Es sollte hier jedoch beachtet werden, dass NOS im gesamten Gehirn kaum in Zellkörpern nachgewiesen werden kann, obwohl eine breite Expression des Proteins im Gehirn vorliegt. Das Fehlen der NOS-Färbung in den Zellkörpern und die Organisation in strukturierten Clustern könnten darauf hinweisen, dass NOS nicht im Zellkörper vorliegt, sondern nach der Translation präferentiell sofort an die axonalen Endigungen transportiert wird. Die Lokalisation von NOS in den R3 Neuronen bedeutet, dass die Synthase vermehrt präsynaptisch lokalisiert ist, da hauptsächlich präsynaptische Markerproteine in der axonalen, ringförmigen Struktur dieser Neurone gefunden werden (Zhang et al., 2013; unpublizierte Daten der AG

Strauss). In den dendritischen Eingängen der Ringneurone (in der Region der lateralen Triangel/*Bulb*) ist keine NOS-Färbung zu sehen, was ebenfalls die Hypothese unterstützt, dass NOS im Ellipsoidkörper hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert ist (Abb. 61). Es wird hier also eine präsynaptische Rolle von NOS und eine intrazelluläre Wirkung von NO beschrieben. Dies steht im Gegensatz zu der bei Vertebraten häufig untersuchten postsynaptischen Lokalisation von NOS und der interzellulären Wirkung von NO als retrograder Transmitter (Huang, 1997). Es wurden jedoch auch präsynaptische Funktionen von NO beschrieben, so zum Beispiel der Einfluss von NO auf die Transmitter-Freisetzung. Die exogene Zugabe einer NO-produzierenden Chemikalie auf hippocampale Gehirnschnitte von Ratten führt zu einer erhöhten Ausschüttung des exzitatorischen Transmitters Glutamat. Auch die Ausschüttung des inhibitorischen Transmitters GABA (γ -Aminobuttersäure) kann in Abhängigkeit der NO-Konzentration sowohl positiv als auch negativ reguliert werden. Sowohl Glutamat als auch GABA wurden als Neurotransmitter in den Ringneuronen des Ellipsoidkörpers nachgewiesen (Renn et al., 1999; Kahsai und Winther, 2011; Martín-Peña et al., 2014). Die Beeinflussung der Freisetzung von Dopamin und Serotonin ist ebenfalls bekannt. (Cossenza et al., 2014). NO beeinflusst als präsynaptische Funktionen nicht nur die Transmitter-Freisetzung, sondern hat ebenfalls Effekte auf das Recyclen von Vesikeln und auf die Bereitstellung der synaptischen Vesikel vom Reservepool zum *readily-releasable-pool* (Hardingham et al., 2013). Als Konsequenz der eben genannten präsynaptischen Funktionen werden die synaptischen Eigenschaften der Zelle maßgeblich verändert, wodurch die synaptische Plastizität der Zelle und somit Lern- und Gedächtnisprozesse moduliert werden können.

Bei der weiteren Betrachtung des NOS-Expressions-musters im *Drosophila* Gehirn ist auffällig, dass die Pilzkörper als prominente Struktur für Lernen und Gedächtnis (Davis, 2005) keine NOS-Expression zeigen. Die Aktivität der *for* PKG wird hingegen in den α/β -Loben der Pilzkörper für das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis benötigt (Mery et al., 2007). Aus diesen beiden Befunden lässt sich rückschließen, dass das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis (~15 Min) und das visuelle Orientierungsgedächtnis (~4 s) vermutlich auf unterschiedlichen biochemischen Mechanismen beruhen. Beide Gedächtnisformen benötigen zwar die *for* PKG, jedoch scheint die Erfordernis der NOS spezifisch für das visuelle Arbeitsgedächtnis zu sein, da die Synthese nicht in den relevanten Strukturen für das olfaktorische Lernen lokalisiert werden konnte.

Die Ergebnisse der *Nos* Mutanten im *Detour*-Paradigma wurden mit einem RNAi-Experiment bestätigt. Die Herunterregulierung der *Nos* mRNA zeigt sowohl in histologischen Präparaten als auch im *Detour*-Verhaltensparadigma, dass NOS in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers vorkommt und dort auch für die vollständige Funktionalität des Gedächtnisses benötigt wird (Abb. 16; Abb. 17B). Der *knock-down* der *Nos* mRNA in den R3 Neuronen führt zu einer deutlichen Reduzierung von NOS im Ellipsoidkörper, jedoch erscheint die Färbung des fächerförmigen Körpers sogar eher etwas stärker als in den Kontrolltieren. Der fächerförmige Körper wurde als interne Kontrolle für die Intensität der Antikörperfärbung gewählt, da diese Struktur nicht von der GAL4-Linie 189Y adressiert wird und somit keinen Einfluss des 189Y>*Nos*RNAi *knock-downs* zeigen sollte. Die leicht erhöhte Färbung im fächerförmigen Körper könnte eine Kompensierung als Folge der fehlenden NOS-Expression im Ellipsoidkörper sein.

Das defekte Gedächtnis der *Nos* Mutanten konnte jedoch nicht durch die gezielte Expression der cDNA in den R3 Neuronen gerettet werden (Abb. 19). Durch die Leckexpression des UAS-*Nos*-Konstruktes wird lediglich eine tendenzielle Verbesserung auf einen intermediären Gedächtnisphänotyp von 70 % erreicht, der durch die gezielte Expression in den R3/R4d Neuronen (c232-GAL4) nicht mehr signifikant gesteigert werden kann. Betrachtet man erneut die NOS-Expression im Zentralkomplex, so ist nicht nur eine deutliche Ellipsoidkörperfärbung zu beobachten, sondern auch eine starke Färbung des fächerförmigen Körpers (Abb. 13; Abb. 16). Da auch der fächerförmige Körper für die Ausbildung des visuellen Arbeitsgedächtnisses von Bedeutung ist (siehe Kapitel 1.5; Dissertation Neuser, 2012; Dissertation Thran, 2013) und diese Struktur von der Treiberlinie c232-GAL4 nicht adressiert wird, besteht die Möglichkeit, dass auch die Verfügbarkeit von NOS im fächerförmigen Körper essentiell für die Ausbildung des Orientierungsgedächtnisses ist. Diese Hypothese wird ebenfalls durch das Expressionsmuster der Treiberlinie VT202672-GAL4 bestätigt, welche durch die Verwendung von endogenen *Enhancer*-DNA-Fragmenten das endogene NOS-Expressionsmuster teilweise widerspiegeln sollte. Diese GAL4-Linie zeigt Expression in der obersten dorsalen Schicht (oder in den oberen dorsalen Schichten) des fächerförmigen Körpers (Abb. 18) und *Nos*RNAi in diesen Neuronen führt zu einem stark reduzierten Orientierungsgedächtnis (Abb. 17). Dieselbe dorsale Region des fächerförmigen Körpers wird von der GAL4-Linie NP2320 (Young und Armstrong, 2010) adressiert, in deren Muster die Expression des *gurkenflieger* Gens essentiell für

das Orientierungsgedächtnis ist (Dissertation Thran, 2013). Um die Hypothese zu überprüfen, dass NOS nicht nur im Ellipsoidkörper, sondern auch im dorsalen Bereich des fächerförmigen Körpers für das Orientierungsgedächtnis benötigt wird, müsste entweder eine entsprechende GAL4-Linie gefunden werden, die sowohl in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers als auch in der ersten Schicht des fächerförmigen Körpers exprimiert oder es müssten zwei GAL4-Linien, die diese beiden Neuropile adressieren, rekombiniert werden, um anschließend ein Rettungsexperiment im *Detour*-Paradigma durchzuführen. Der dorsale Bereich des fächerförmigen Körpers wird bei *Drosophila* für den Parameter ‚Höhe‘ eines visuellen Mustergedächtnisses im Flugsimulator benötigt (Liu et al., 2006). Außerdem wurde diesen Neuronen eine Abhängigkeit von der *for* PKG für dieses Mustergedächtnis zugeschrieben (Wang et al., 2008). Des Weiteren wird in dieser dorsalen Region des fächerförmigen Körpers die *Formaldehyd-Dehydrogenase (fdh*; das Homolog zur *S-Nitrosoglutathion Reduktase* bei Vertebraten) für das Mustergedächtnis benötigt. Dieses Enzym greift in den NO-Metabolismus ein und wirkt der Funktion von NO entgegen. Die Überexpression führt zu einer Verschlechterung des visuellen Mustergedächtnisses, welche durch gleichzeitige Expression der *for* PKG wieder aufgehoben werden kann und somit der erste Hinweis auf eine Rolle von NO bei Lern- und Gedächtnisprozessen von *Drosophila* lieferte (Hou et al., 2011).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde NO, ebenso wie H₂S, als diffusibler Faktor untersucht, der die Redundanz von EBO in allen vier Ringsystemen erklärt. Eine genetische Interaktion zwischen *ebo*⁶⁷⁸ und *Nos*^{Δ15} zeigt die Beteiligung der beiden Gene an einem gemeinsamen Signalweg (Abb. 27). Weiterführend konnte der *ebo*⁶⁷⁸ mutante Gedächtnisphänotyp durch die Überexpression von NOS in R2 und R3 Neuronen gerettet werden (Abb. 28). Die Erhöhung des Gasotransmitters NO kann also ebenso wie H₂S das Orientierungsgedächtnis der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante retten. Dieses Rettungsexperiment zeigt außerdem, dass NO genauso wie H₂S über Zellgrenzen hinweg wirken kann, da die Überexpression in R2 Neuronen die Gedächtnisspur in den R3 Neuronen ermöglichen kann.

4.3. Die Regulation durch den Transkriptionskomplex dSRF/dMRTF

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Gene *Nos* und/oder *Cbs/Eip55E* unter der transkriptionellen Regulation des dSRF/dMRTF-Komplexes stehen, dessen Aktivität in der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante durch die Akkumulation von Aktin im Zellkern inhibiert wird.

Aufgrund der Redundanz der EBO Funktion in allen vier Ringsystemen wurde die Hypothese formuliert, dass dieser Komplex die Transkription eines Gasotransmitterproduzierenden Enzyms reguliert (Abb. 5; Thran et al., 2013).

Die NOS-Expression in den R3 Neuronen ist in der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante gegenüber der heterozygoten Kontrolle nicht deutlich reduziert (Abb. 29). Allerdings sollte hier beachtet werden, dass der *knock-down* von Exportin 6 (*ebo*) in Zellkulturexperimenten dazu führt, dass die allgemeine Transkriptionsrate stark reduziert wird (Dopie et al., 2012). Eine mögliche reduzierte NOS-Expression könnte also unentdeckt bleiben, falls das Expressionslevel von GFP gleichermaßen herunterreguliert wird. Es wurden heterozygote Tiere (*ebo*⁶⁷⁸/X) als Kontrolle gewählt, um die Antikörperfärbung der experimentellen Tiere und der Kontrolltiere zusammen in einem Eppendorfgefäß durchführen zu können und somit die Variationen in der Antikörperfärbung möglichst zu minimieren. Des Weiteren wurden heterozygote Kontrolltiere aus derselben Kreuzung gewählt, um den gleichen genetischen Hintergrund in den Tieren zu haben und somit Effekte aufgrund von genetischer Varianz zu minimieren. Auf der Grundlage des morphologischen Defekts in der Ellipsoidkörperstruktur wurden die Gehirne für die Quantifizierung wieder getrennt. Die Wahl für die heterozygote Kontrolle ist jedoch nicht optimal, da die Funktion von EBO (Exportin 6) dosisabhängig ist (Thran et al., 2013) und somit im heterozygoten Zustand bereits Veränderungen im Vergleich zur wildtypischen Situation auftreten können. Dies würde ebenso das Aufdecken eines reduzierten Expressionslevels von NOS in der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante erschweren.

Durch Expression der Transkriptionsfaktoren dSRF/dMRTF wurde ebenfalls versucht, eine ektopische NOS-Expression zu induzieren und histologisch zu quantifizieren. Dies ergab jedoch weder signifikante Ergebnisse mit der Expression der Einzelfaktoren in den R2 Neuronen, noch mit der panneuralen Expression des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF (Abb. 30; Abb. 32). Jedoch kann aufgrund der Auflösungsgrenze des Objektivs keine Aussage über die Anzahl der vereinzelt NOS-Cluster in der Region der R2 Neurone getroffen werden. Die alleinige panneurale Überexpression des Transkriptionsfaktors dSRF mit der Treiberlinie *elav Appl-GAL4* hatte in der *Western Blot*-Analyse jedoch einen hoch signifikanten Anstieg des NOS-Expressionslevels zur Folge (Abb. 31). Da diese induzierte Expression nicht mit dem Transkriptionskomplex dSRF/dMRTF reproduziert werden konnte (siehe unten), liegt die Vermutung nahe, dass *Nos* nur von dSRF allein reguliert wird. SRF kann mit

verschiedenen Kofaktoren einen Transkriptionskomplex bilden und auf diese Weise die Expression von unterschiedlichen Genen regulieren (Knöll, 2010).

Sowohl die genetischen Experimente (Abb. 25) als auch der pharmakologische Ansatz (Abb. 26) unterstützen die Hypothese, dass das H₂S-produzierende Enzym CBS und/oder CSE unter der regulatorischen Kontrolle des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF stehen (siehe Diskussion Kapitel 4.1). Da der Antikörper gegen das humane CBS nicht nur eine Kreuzreaktion mit *Drosophila* CBS zeigt, sondern auch mit weiteren undefinierten Proteinen kreuzreagiert, konnten keine histologischen Färbungen zur Untersuchung des CBS-Expressionslevels durchgeführt werden. In einer *Western Blot*-Analyse hingegen wurde sowohl der CBS- als auch der NOS-Expressionslevel nach panneuraler Überexpression des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF bestimmt (Abb. 35). Entsprechend der histologischen Ergebnisse hatte die Überexpression von dSRF/dMRTF keine signifikante Erhöhung des NOS-Levels zur Folge, jedoch resultierte sie in einem um 13 % erhöhten CBS-Expressionslevel. Dieser Zusammenhang wurde zusätzlich in einem unabhängigen RT-qPCR-Experiment analysiert (Abb. 34). Jedoch erbrachte die Analyse auf dem Level der mRNA (RT-qPCR) nicht die gleichen Ergebnisse wie auf Proteinebene (*Western Blot*). Die regulatorische Kontrolle des *Cbs* Gens konnte hier nicht bestätigt werden. Allgemein zeigen die Ergebnisse der RT-qPCR jedoch starke Schwankungen, was die Aussage des Experiments schwächt. Die starken Schwankungen in der Expression der Enzyme CBS und CSE wurden jedoch auch bei der durchgeführten Aktivitätsbestimmung im nativen Gel beobachtet (Abb. 33). Da beide Enzyme stark mit dem Aminosäurehaushalt und somit auch mit dem Futterzustand der Fliege zusammenhängen, könnte die Expression der Enzyme im gesamten Gehirn stark variieren und vor allem vom individuellen Zustand der Fliege abhängen. Dies könnte eine Ursache für die starken Schwankungen in der Expression von CBS und CSE sein. Brintjes et al. (2014) berichten eine altersabhängige Expressionsstärke der CBS. Es ist also durchaus vorstellbar, dass die Expression von CBS auch ernährungsbedingt angepasst wird.

Festzuhalten bleibt, dass in den genetischen Ansätzen der Verhaltensanalyse sowohl die Überexpression von NOS als auch von CBS den *ebo*⁶⁷⁸ defekten Gedächtnisphänotyp kompensieren kann. Auf Protein- bzw.- mRNA-Ebene konnte jedoch keine regulatorische Kontrolle des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF über das *Nos* Gen nachgewiesen werden. Hingegen wurde auf Proteinebene in der *Western Blot*-Analyse eine induzierte CBS-Expression durch dSRF/dMRTF detektiert, was für eine

regulatorische Kontrolle spricht. *Nos* könnte hingegen allein durch dSRF reguliert werden. Außerdem ist bereits bekannt, dass bei Vertebraten das Gen *Cse* über den Transkriptionsfaktoren SP1 (*specificity protein 1*) reguliert wird (Paul et al., 2014).

Die erfolgreiche Rettung des *ebo* defekten Gedächtnisphänotyps durch die Überexpression von NOS und die verringerte, jedoch nicht signifikante Reduktion der NOS-Färbung in der *ebo* Mutante auf der einen Seite und die nicht erfolgreiche Modulation der NOS-Expression durch Überexpression von dSRF/dMRTF auf der anderen Seite lassen vermuten, dass NOS zwar in der *ebo* Mutante leicht reduziert ist, *Nos* jedoch nicht über den Transkriptionskomplex dSRF/dMRTF reguliert wird. Die Reduktion von NOS könnte allein durch eine allgemein geringere Transkriptionsrate in der *ebo* Mutante hervorgerufen werden, welche durch die erhöhte Aktinakkumulation im Zellkern verursacht wird. Die Verringerung der allgemeinen Transkriptionsrate durch eine Reduktion der Exportin 6 (*ebo*) mRNA mittels RNAi und somit eine erhöhte Aktinakkumulation im Zellkern wurde in Zellkultur nachgewiesen (Dopie et al., 2012). Diese Beobachtung wird ebenfalls durch einen histologischen Befund in der *ebo* Mutante unterstützt, da in den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen die Aktinakkumulationen vor allem an den Interbanden der Chromosomen, also an den offenen Chromatinstrukturen, zu finden ist, an denen aktive Transkription stattfindet (Thran et al., 2013).

4.4. Ein hoher cGMP-Haushalt in den R3 Neuronen

Warum rettet sowohl die Überexpression von H₂S, als auch die Überexpression von NO den *ebo*⁶⁷⁸ defekten Gedächtnisphänotyp? Sowohl die Freisetzung von NO als auch die Freisetzung von H₂S haben Einfluss auf den cGMP-Level einer Zelle. Der Hauptrezeptor von NO ist die sGC, deren Aktivierung zu einer vermehrten Produktion von cGMP führt (Davies, 2006). Dieser Rezeptor spielt auch für das visuelle Orientierungsgedächtnis eine entscheidende Rolle. Ein *knock-down* der sGC in den R3 Neuronen führt zu einem reduzierten Gedächtnis (Abb. 39) und eine genetische Interaktion bestätigt ebenfalls das notwendige Zusammenspiel von NOS und sGC im Zusammenhang mit einem funktionsfähigen Orientierungsgedächtnis (Abb. 41A). H₂S beeinflusst ebenfalls den cGMP-Level einer Zelle als endogener Inhibitor der cGMP-PDE-Aktivität (Bucci et al., 2010). H₂S ändert vermutlich die Disulfidbrücken, welche für die PDE-Aktivität essentiell sind (Bibli et al., 2015). Auf diese Weise wird durch die Freisetzung von H₂S der cGMP-Level ebenfalls erhöht. Homozygote *Pde6*^{Mi} Fliegen

zeigen tendenziell ein leicht verbessertes Orientierungsgedächtnis als der Wildtyp (Abb. 36A). Dies könnte auf ein leicht erhöhtes cGMP-Level in der *Pde6* Mutante zurückzuführen sein, da der Abbau von cGMP in dieser Mutante reduziert sein sollte. Der Gedächtnisdefizit der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante kann durch die Reduzierung einer Genkopie von *Pde6* oder durch die Reduzierung der *Pde6* mRNA-Menge spezifisch in den R3 Neuronen gerettet werden (Abb. 36). Ein weiterer Beweis, dass ein hoher cGMP-Level in den R3 Neuronen für ein funktionsfähiges visuelles Orientierungsgedächtnis benötigt wird, liefert ein pharmakologischer Ansatz. Die Verfütterung des PDE6-spezifischen Inhibitors Zaprinast verbessert bzw. rettet das Gedächtnis der *ebo*⁶⁷⁸ und der *Nos*^{Δ15} Mutante durch Inhibition der PDE6 und damit der Erhöhung des cGMP-Spiegels (Abb. 37). Die konzertierte Regulation des cGMP-Niveaus durch NO und H₂S wurde bisher nur für das kardiovaskuläre System beschrieben (Coletta et al., 2012), jedoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass dieser Mechanismus ebenfalls für die Gedächtnisbildung eine Rolle spielt.

Der kanonische Signalweg von cGMP führt zur Aktivierung der PKG (Wang und Robinson, 1997). Die essentielle Rolle der PKG auf vielseitige Lernprozesse bzw. Gedächtnisbildungen wurde sowohl bei Mäusen, als auch bei *Drosophila* ausführlich untersucht. Auf Gehirnschnitten von Mäusen und in Zellkultur wurde beobachtet, dass die Aktivität der sGC und der PKG zu einer erhöhten Langzeit-Potenzierung führt (Zhuo et al., 1994; Arancio et al., 2001). Bei *Drosophila* wurde die Beteiligung der *for* PKG am olfaktorischen Gedächtnis gezeigt (Kaun et al., 2007; Mery et al., 2007). Zusätzlich wird die Funktion von *for* im Zentralkomplex auch im visuellen Mustergedächtnis von *Drosophila* benötigt (Wang et al., 2008). Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, dass *for* PKG ebenfalls in den R3 Neuronen für die Ausbildung des Orientierungsgedächtnisses benötigt wird. Das hypomorphe *sitter* Allel zeigt einen vollständigen Verlust des visuellen Arbeitsgedächtnisses, während das dominante *Rover* Allel ein wildtypisches Gedächtnis aufweist (Abb. 9). In Kopfextrakten der Fliegen wurde zwischen den beiden Allelen ein Unterschied von 10 % in der gesamten PKG-Aktivität gemessen (Osborne et al., 1997). Da jedoch nur die Gesamtaktivität beider PKGs berechnet wurde, kann man davon ausgehen, dass der Unterschied in der FOR-Aktivität wesentlich größer ist. Nach der Mutantanalyse wurde ein gewebe-spezifischer *knock-down* der *for* mRNA in den R3 Neuronen durchgeführt, welcher in einer Phänokopie des defekten Phänotyps der *sitter* Mutante resultiert (Abb. 12). Dass die *for* PKG ausschließlich in den R3 Neuronen für die Funktionalität des

Orientierungsgedächtnisses benötigt wird, zeigt ein Rettungsexperiment, in dem die Expression der *for* cDNA ausschließlich in den R3 Neuronen das defekte *for^s* Gedächtnis auf wildtypisches Niveau wiederherstellt und die Expression in den verbleibenden Ringen ohne Effekt bleibt (Abb. 11). Die beiden *for* Allele, *Rover* und *sitter*, zeigen keinen Unterschied in einem operanten Ortsgedächtnis (*heat-box*), ein Kurzzeitgedächtnis von wenigen Minuten (Gioia und Zars, 2009). Dies könnte auf eine mögliche biochemische Abgrenzung der Funktionsweisen dieser unterschiedlichen Gedächtnisformen hinweisen.

Eine genetische Interaktion zwischen *Nos* und *for* zeigt außerdem (Abb. 41B), dass auch für das Orientierungsgedächtnis die *for* PKG über NO bzw. cGMP aktiviert wird. Aufgrund seiner geringen Aktionsreichweite ist es unwahrscheinlich, dass NO in den präsynaptischen Strukturen der Ringneurone produziert wird und schließend bis zum Zellkern diffundiert, um dort weitere Partner der cGMP/PKG-Transduktionskaskade zu aktivieren. Studien zur Kinetik der NO-Transmission zeigen, dass die Haltbarkeit von NO in wässrigen Lösungen sehr gering ist und nach etwa 500 ms das NO-Signal wieder auf Basisniveau abgesunken ist. Außerdem erreicht die Konzentration eines NO-Signals bestenfalls 1 nM (Garthwaite, 2005). Dagegen liegt die *for* PKG im adulten *Drosophila* Gehirn zwar auch in den axonalen Projektionen der Ringneurone des Ellipsoidkörpers vor, sie ist aber maßgeblich in den Zellkernen dieser angereichert (Belay et al., 2007). Die Berücksichtigung der Reichweite von NO und der Lokalisation der *for* PKG führt zu der Hypothese, dass cGMP entlang der axonalen Projektionen Richtung Zellkern bzw. Axonhügel wandert und dort die *for* PKG aktiviert (Abb. 61).

Die erhöhte Aktivität der *for* PKG führt zu einer Phosphorylierung von Zielproteinen. Da *ign* RSKII in denselben Neuronen (R3 Neurone; Abb. 42) für das visuelle Arbeitsgedächtnis benötigt wird wie die *for* PKG, wurde untersucht, ob die beiden Kinasen in demselben Signalweg interagieren. Mit Hilfe einer epigenetischen Interaktionsstudie wurde die *ign* RSKII als nachgeschaltete (*downstream*) Komponente der *for* PKG identifiziert (Abb. 44). Durch die Beteiligung der *ign* RSKII an dem beschriebenen cGMP-Signalweg (Abb. 61) grenzt sich dieser von den bisherigen Modellen des cGMP-Signalwegs zur Ausbildung von Neuroplastizität und der damit verbundenen induzierten Proteinexpression ab. Gallo und Iadecola (2011) beschreiben, dass NO über cGMP und PKG den ERK/MAPK (*extracellular-signal regulated kinase*)/(*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg aktiviert, welcher für die

Verknüpfung von synaptischen Stimuli und veränderter Genexpression bekannt ist (Thomas und Hugarir, 2004). Des Weiteren fördert der cGMP-Signalweg über ERK/MAPK die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses (Gallo und Iadecole, 2011), während der cGMP-Signalweg im *Detour*-Paradigma eine Funktion für ein Kurzzeitgedächtnis übernimmt.

Bei Vertebraten gibt es verschiedene RSK-Isoformen, welche mit vielfältigen Zellprozessen wie dem Zellwachstum, der Zellmotilität, der Zell-Überlebensdauer und der Zellproliferation in Verbindung gebracht werden. Dabei ist die Aktivierung der RSKs durch den ERK/MAPK-Signalweg ein gut untersuchtes Phänomen (Anjum und Blenis, 2008). Bei *Drosophila* existiert in der *ign* RSKII jedoch die Phosphorylierungsstelle der MAPK (*Drosophila* Homolog: *rolled*) nicht (Carriere et al., 2008). Daraus resultiert die Hypothese, dass die *ign* RSKII bei *Drosophila* nicht durch den ERK/MAPK-Signalweg aktiviert wird. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass für die Ausbildung des visuellen Orientierungsgedächtnisses eine Aktivierung der *ign* RSKII durch den cGMP/PKG-Signalweg erfolgt.

Einen Einfluss der RSKII auf Ortsgedächtnisse bzw. räumliche Orientierung wurde auch in einer *rsk2* *-/- knock-out* Maus beobachtet, welche Defizite im räumlichen Kurz- und Langzeitgedächtnis zeigt (Poirier et al., 2007). Beim Menschen führt die Mutation im *rsk2* Gen zum Coffin-Lowry-Syndrom, welches neben körperlichen Fehlbildungen aus zu geistiger Beeinträchtigung führt (Pereira et al., 2009).

Ziel der beschriebenen Signaltransduktionskaskade ist der Transkriptionsfaktor CREB (Abb. 61). Die Expression eines dominant-negativen *dCreb*-Konstrukts in den R3 Neuronen führt zu einem vollständigen Verlust des Orientierungsgedächtnisses (Abb. 45B). Dabei wurden entwicklungsbiologische Defekte durch den Gebrauch von GAL80^{ts} ausgeschlossen. Heterozygote *Creb*^{S162}/X Mutanten zeigen ebenfalls ein stark reduziertes Orientierungsgedächtnis und die Expression der *dCreb* cDNA in den R3 Neuronen kann dieses Defizit retten (Abb. 46). Auch die defizitären Gedächtnisphänotypen der *ign*^{58/1}, sowie der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante können durch Überexpression von dCREB in den R3 Neuronen vollständig gerettet bzw. deutlich verbessert werden (Abb. 47, Abb. 48). Dass die Phosphorylierung von dCREB zumindest in spezifischen Bereichen des adulten *Drosophila* Gehirns entscheidend von der *ign* RSKII vorgenommen wird, zeigen nicht nur die genetischen Ansätze in den Verhaltensexperimenten, sondern auch die Analyse auf Proteinebene des Verhältnisses

P~dCREB-zu-dCREB im adulten Gehirn. Mit einem *Drosophila*-spezifischen Antiserum lässt sich in der *ign*^{58/1} Mutante im Vergleich zum Wildtyp etwa 10 % weniger P~dCREB detektieren (Abb. 49). In neuronalen Zellen von Vertebraten wurde RSKII schon früh als Kinase identifiziert, welche CREB phosphorylieren kann (Xing et al., 1996), jedoch konnte die Relevanz der Phosphorylierung von dCREB durch RSKII noch nicht für das Gehirn gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem eine endogene Funktion der dCREB-abhängigen Phosphorylierung von *ign* RSKII für das visuelle Arbeitsgedächtnis beschrieben.

Bekannt ist CREB für seine Rolle als Transkriptionsfaktor bei der Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses, um über Genregulation neuronale Plastizität zu gewährleisten (Kandel et al., 2014). Allerdings zeigen transgene Mäuse mit erhöhter CREB-Aktivität nicht nur ein verbessertes Langzeit-, sondern auch ein verbessertes Kurzzeitgedächtnis. Die Erhöhung der CREB-Aktivität resultiert in einem höheren Grundlevel des BDN-Faktors (*brain-derived neurotrophic factor*), der wiederum für die Verbesserung des Kurzzeitgedächtnisses verantwortlich ist (Suzuki et al., 2011). Bei *Drosophila* ist bisher ebenfalls bekannt, dass dCREB für die Konsolidierung eines olfaktorischen Langzeitgedächtnisses benötigt wird (Yin und Tully, 1996; Perazzona 2004; Miyashita et al., 2012), nicht jedoch für kürzere Gedächtnisformen (Kahsai und Zars, 2011).

Die konditionale Expression des dominant-negativen dCREB2-b weist darauf hin, dass dCREB ausschließlich adult-spezifisch in Neuronen des Subtyps R3 für die korrekte Ausführung des Orientierungsgedächtnisses benötigt wird. Wie bereits im Ergebnisteil (siehe Kapitel 3.8) erwähnt, ist die zeitliche Dauer von Genregulation und damit Transkription, Translation und ggf. Modifikation zu lange, um ein relevanter Mechanismen innerhalb dieses 4 s Gedächtnisses zu sein. Die adult-spezifische Funktion von dCREB als Transkriptionsfaktor in den R3 Neuronen wird offenbar benötigt, um die Expression von Proteinen, welche für die synaptische Plastizität notwendig sind, gleichmäßig stabil und aufrecht zu halten. Diese *Kompetenzfaktoren* statten die R3 Neurone mit der Fähigkeit aus, die Position umgebender Landmarken in Relation zur eigenen Position während des Laufens permanent zu aktualisieren und zu speichern. Reduziert man dCREB in diesem System, so stehen die Kompetenzfaktoren nicht in ausreichender Menge zur Verfügung und die präzise, sowie sehr schnelle Funktionalität des Arbeitsgedächtnisses wird nicht mehr gewährleistet.

Kompetenzfaktoren könnten vor allem die synaptische Ausstattung der R3 Neurone betreffen, so z.B. die ausreichende Expression von Ionenkanälen und Neurotransmittern

oder synaptischen Strukturproteinen. Ein ähnliches Beispiel wurde in den Projektionsneuronen des Striatums bei Mäusen beobachtet, wo über NO/cGMP/PKG/CREB-Signalübertragung die transkriptionale Kontrolle des vesikulären GABA-Transporters vermittelt wird. Auf diese Weise wird die GABA-Transmission dieser Neurone und dadurch die Regulation motorischer Fähigkeiten beeinflusst (Sagi et al., 2014).

4.4.1. *homer* als Kompetenzfaktor

Die benötigten Kompetenzfaktoren könnten einfacherweise dieselben Proteine sein, die auch bei der Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses von dCREB induziert werden. Eines dieser Gene, dessen Transkription bei der Konsolidierung eines olfaktorischen Gedächtnisses von dCREB initiiert wird, ist *homer* (Miyashita et al., 2012), welches im Nervensystem der Fliege hauptsächlich als dendritisch lokalisiertes Protein vorkommt (Rolls et al., 2007). Die *homer* Mutante zeigt außerdem eine reduzierte Plastizität in der Balzkonditionierung (Diagana et al., 2002) und Homer wird in den R2 und R4m Neuronen des Ellipsoidkörpers für eine normale Alkoholsensitivität und –toleranz benötigt (Urizar et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *homer* Allele getestet, welche alle einen vollständigen Verlust des visuellen Orientierungsgedächtnisses aufweisen und deren Gedächtnisdefizit durch die Expression der *homer* cDNA in den R3 Neuronen wieder auf wildtypisches Niveau gerettet werden kann (Abb. 51; Abb. 53). Der *knock-down* der *homer* mRNA in allen Ringsystemen des Ellipsoidkörpers zeigt außerdem, dass *homer* spezifisch in R3 Neuronen benötigt wird (Abb. 52). Zusammenfassend lässt sich durch die erhobenen Daten sagen, dass *homer* am Ende des beschriebenen Signalwegs ein möglicher Kompetenzfaktor sein könnte, der durch dCREB induziert werden könnte. Die Induktion erhöhter *homer* Expression wird beim olfaktorischen Langzeitgedächtnis bei *Drosophila* durch NMDA-Rezeptoraktivität und verstärkte dCREB-Aktivität vermittelt. Ein Mg^{2+} -Ion im NMDA-Rezeptor scheint dabei die Spleißaktivität für die *dCreb* mRNA zu beeinflussen. Ist der Mg^{2+} -Block vorhanden, wird die Bildung der Repressorform dCREB2-b unterdrückt und somit wird die dCREB-abhängige Genexpression, z.B. von *homer*, für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses ermöglicht. Bei der olfaktorischen Konditionierung wird *homer* weder beim Lernen noch in einem Anästhesie-resistenten Gedächtnis (ARM) benötigt, sondern ausschließlich für die Bildung eines Langzeitgedächtnisses (Miyashita et al., 2012). Ergänzend zu Miyashita et al. (2012) zeigen die vorliegenden Experimente

dieser Arbeit erstmals, dass *homer* auch für die Ausführung eines Kurzzeitgedächtnisses benötigt wird.

Die Familie der Homer Proteine besitzt eine Protein-bindende Domäne und interagiert bei Vertebraten als Gerüstprotein, um die strukturelle und damit auch funktionelle Organisation der metabotropen Glutamatrezeptoren, sowie der IP₃-Rezeptoren zu steuern (Brakeman et al., 1997; Tu et al., 1998). In einem *knock-out homer*^{-/-} Mausmodell zeigt sich, dass diese Tiere an größerer Ängstlichkeit leiden, dass die sensomotorische Verarbeitung beeinträchtigt ist und dass die Tiere ein verschlechtertes Arbeitsgedächtnis aufweisen (Lominac et al., 2005). Homer könnte also an der synaptischen Organisation in den R3 Neuronen eine entscheidende Rolle spielen, welche essentiell für ein funktionsfähiges visuelles Arbeitsgedächtnis ist.

4.5. NO als Kurzzeitkomponente in einem visuellen Arbeitsgedächtnis von *Drosophila*

Der postulierte Signalweg mit der gemeinsamen Wirkung von NO und H₂S resultiert schließlich in einer Erhöhung der dCREB-Aktivität, die zur Aufrechterhaltung des Expressionslevels von Kompetenzfaktoren dient (Abb. 61). Zwar zeigen die genetischen Ansätze in der Verhaltensanalyse des visuellen Arbeitsgedächtnisses, dass diese Faktoren adult-spezifisch innerhalb eines 24 h Stunden-Fensters benötigt werden, jedoch kann es sich aus zeitlichen Gründen nicht um Prozesse handeln, die während der Richtungsentscheidung auf die ursprüngliche Landmarke ablaufen. Die Anwendung des NOS-Inhibitors L-NNA weist hingegen auf eine duale Rolle von NOS hin. Die Aufnahme des NOS-Inhibitors zerstört nicht nur innerhalb von 2 Stunden das Gedächtnis vollständig, sondern reduziert dieses auch deutlich bereits 5 Minuten nach der Aufnahme (Abb. 20). Dieser pharmakologische Ansatz zeigt, dass NOS auch eine akute Funktion für das Orientierungsgedächtnis hat, da 5 Minuten nicht ausreichen, um die beschriebene Signalkaskade zu aktivieren, sowie die Transkription, die Translation und gegebenenfalls die Modifikation von Kompetenzfaktoren auszuführen. Selbst wenn es zu einer kurz- oder mittelfristigen Reduktion der Transkriptionsrate der Kompetenzfaktoren kommt, so sollte sich dies nicht direkt auf die Gedächtnisleistung auswirken, da die Lebensdauer und der Abbau der vorhandenen Kompetenzfaktoren bestimmt, ab wann diese unter ein kritisches Niveau fallen und die volle Funktionalität des visuellen Arbeitsgedächtnisses nicht mehr gewährleistet ist.

Auch in hippocampalen Gehirnschnitten von Mäusen und Ratten wurden zwei verschiedene Arten von NO-Signalen gefunden. Ein tonisches Signal der eNOS und ein phasisches Signal der nNOS. Beide NO-Signale scheinen zur Ausbildung einer Langzeit-Potenzierung im Hippocampus beizutragen (Hopper und Garthwaite, 2006). Da es bei *Drosophila* nur eine Isoform der NOS gibt, könnte dieses Enzym beide Funktionen wahrnehmen: Zum einen eine kontinuierlich schwächere NO-Produktion zur Aufrechterhaltung des cGMP-Levels, welcher schließlich zur dCREB-gesteuerten Transkription von Kompetenzfaktoren führt und zum anderen eine kurze, lokale und Synapsen-spezifische starke NO-Produktion. Ein phasisches NO-Signal und damit die kurzzeitige Erhöhung des cGMP-Levels könnte in der Aktivierung der zyklisch-Nukleotid-gesteuerten Kanäle (*cyclic nucleotide-gated ion channel*; CNG-Kanäle) oder der Hyperpolarisations-aktivierten-zyklisch-Nukleotid-gesteuerten Kanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*; HCN-Kanäle) resultieren.

CNG-Kanäle sind nicht-selektive Kationkanäle, die sich durch die Bindung von zyklischen Nukleotiden öffnen. HCN-Kanäle haben ähnliche Eigenschaften wie die CNG-Kanäle, jedoch können sie ebenso auch von einer Membranhyperpolarisation aktiviert werden und sind leicht selektiv für Kaliumionen. Bei Vertebraten werden die Kanäle aus Proteinuntereinheiten aufgebaut, die sowohl Hetero- als auch Homotetramere bilden können (Biel, 2009). In einem RNAi-Screen wurden die *Drosophila* CNG-Untereinheiten CNG-A und CNG-L als relevante Komponenten für das visuelle Orientierungsgedächtnis identifiziert. Die konditionale Herunterregulierung der *CngA* und der *Cngl* mRNA in den R3 Neuronen für 48 h führte zu einem vollständigen Gedächtnisverlust im *Detour*-Paradigma (Diplomarbeit Schneider, 2015). Ein phasisches NO-Signal bzw. cGMP könnte neben der Aktivierung der CNG- bzw. HCN-Kanäle außerdem die PKG aktivieren. PKG wiederum kann durch die Phosphorylierung von weiteren Ionenkanälen Einfluss auf die neuronale Aktivität der Zelle nehmen (Wang und Robinson 1997; Hardingham et al., 2013). Auf Hirnschnitten von Ratten wurde im Hirnstamm die positive Modulation von Ca^{2+} -Kanälen durch die Phosphorylierung durch PKG beschrieben, welche in einer erhöhten Amplitude des postsynaptischen Potentials resultiert (Huang et al., 2003). Bei Grillen wurde ebenfalls der Einfluss von NO auf einen spannungs-abhängigen Ca^{2+} -Kanal in dissoziierten Kenyonzellen der Pilzkörper nachgewiesen. Dabei wird über die Phosphorylierung durch die PKG die Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals erhöht (Kosakai et al., 2015).

In Nervenzellen der Hypophyse konnte gezeigt werden, dass PKG die Aktivität eines Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanals erhöht. Daraus resultiert eine verstärkte Hyperpolarisationsphase, was zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom führt (Klyachko et al., 2001).

Über ein lokales NO-Signal und somit die zeitlich definierte Aktivierung der CNG/HCN-Kanäle oder anderer Ionenkanäle könnte eine anhaltende Aktivität der R3 Neurone gewährleistet werden, die benötigt wird, um die Position der Landmarke auch nach deren visuellen Verschwinden noch weiter zu erinnern. Bisher wurde gezeigt, dass die Ringneurone zwar durch visuelle Information einer Landmarke angeregt werden (Seelig und Jayaraman, 2013), die Hypothese einer anhaltenden elektrischen Aktivität und damit die Information über die Position einer Landmarke müsste jedoch überprüft werden.

4.6. Die Kurzzeitkomponente von Proteinkinase A und Synapsin in einem visuellen Arbeitsgedächtnis von *Drosophila*

Für das visuelle Orientierungsgedächtnis wurde in dieser Arbeit die *ign* RSKII als essentielle Kinase identifiziert, welche dCREB phosphoryliert und somit die CREB-Aktivität reguliert. Es gibt jedoch mehrere Kinasen, die CREB phosphorylieren können. Vor allem bei *Aplysia* wurde die Aktivierung von CREB durch den cAMP/PKA-Signalweg und deren Einfluss auf die Ausbildung einer Langzeitpotenzierung ausgiebig untersucht (Kandel et al., 2014). Bei *Drosophila* wurden sowohl die cAMP-produzierende *rutabaga*-Adenylylzyklase (*rut* AC; Livingstone et al., 1984), die Proteinkinase A (PKA; Horiuchi et al., 2008) als auch dCREB (Yin und Tully, 1996; Perazzona et al., 2004) als wichtige biochemische Komponenten für die Ausbildung eines olfaktorischen Langzeitgedächtnisses identifiziert. Damit haben ebenfalls wie bei *Aplysia* alle Komponenten des cAMP-Signalwegs eine Funktion für die Gedächtnisausbildung, jedoch konnte bisher bei *Drosophila* die direkte Phosphorylierung von CREB durch PKA nie bewiesen werden. Eine erhöhte dCREB-Aktivität nach erhöhter PKA-Expression wurde jedoch bei *Drosophila* beobachtet (Iijima-Ando et al., 2005). In Bezug auf das visuelle Orientierungsgedächtnis wurde in der vorliegenden Arbeit nun der Einfluss des klassischen cAMP/PKA-Signalwegs und dessen Aktivität auf dCREB untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss der *rut* AC auf das visuelle Orientierungsgedächtnis untersucht. Da die Mutante keine zielgerichtete Bewegung auf Landmarken zeigt, wurde eine RNAi-vermittelte Herunterregulierung der *rut* AC

mRNA spezifisch in den R3 Neuronen vorgenommen, was den vollständigen Verlust des Gedächtnisses zur Folge hat (Abb. 54). Auch die PKA-Untereinheiten C1 und C3 werden für die Funktionalität des Orientierungsgedächtnisses benötigt. Dies wurde sowohl in einem RNAi-Experiment (Abb. 55) als auch in einer Mutantenanalyse verifiziert (Abb. 56). Um zu überprüfen, ob PKA und dCREB in einem Signalweg wirken, wurde erneut eine genetische Interaktion getestet, die jedoch keinen additiven Effekt der Phänotypen zeigt (Abb. 57). Dieses Ergebnis ist jedoch kein Beweis, dass PKA und dCREB in zwei verschiedenen Signalwegen agieren, da additive Effekte bei einer genetischen Interaktion nicht unbedingt sichtbar werden müssen. Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, dass viele durchgeführte Manipulationen bzw. Beeinträchtigungen des Signalwegs zu deutlichen Effekten im *Detour*-Paradigma geführt haben. Dies gilt auch für das Testen von heterozygoten Tieren bzw. mehreren genetischen Interaktionen (Abb. 24, Abb. 27, Abb. 36, Abb. 41, Abb. 43). Die biochemische Maschinerie dieses Arbeitsgedächtnisses scheint also sehr eng bemessen zu sein, was dieses Gedächtnis sehr anfällig für Störungen bzw. Beeinträchtigungen macht. Unter Berücksichtigung der eben genannten Punkte könnte die nicht-erfolgreiche Interaktion zwischen PKA und dCREB ein Hinweis sein, dass diese beiden Faktoren in zwei unterschiedlichen Signalkaskaden wirken. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass ebenfalls eine genetische Interaktion zwischen der *rut* AC und der PKA im *Detour*-Paradigma beobachtet werden konnte (Masterarbeit Lalotra, 2014). Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass zwar cAMP und PKA als Kurzzeitkomponenten zusammen interagieren, nicht aber mit der Langzeitkomponente dCREB in einem Signalweg zusammenwirken. Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht PKA, sondern *ign* RSKII in diesem System dCREB phosphoryliert und aktiviert. Diese Hypothese grenzt den untersuchten Signalweg von der klassischen cAMP/PKA/CREB-Transduktion ab.

cAMP und PKA könnten also in einem zweiten Signalweg agieren, der parallel zu dem bisher postulierten Signalweg (Abb. 61) existiert und indem kurzzeitige Veränderungen der Neuroneigenschaften vermittelt werden, die dieses 4 s Gedächtnis modulieren und eine Repräsentation der Umwelt und somit der Position der verschwundenen Landmarke gewährleisten. Um die Hypothese zu überprüfen, dass PKA als Kurzzeitkomponente für das visuelle Orientierungsgedächtnis von Bedeutung ist, wurde ein pharmakologischer Ansatz verfolgt. Durch die Aufnahme des PKA-

Inhibitors Rp-cAMPS wurde das Orientierungsgedächtnis der Fliegen nicht nur nach 2 Stunden, sondern bereits nach 5 Minuten Wirkungszeit vollständig verhindert (Abb. 60). Mit Verringerung der Inhibitor-Konzentration nimmt auch der negative Einfluss auf das Gedächtnis graduell ab. Die sofortige Wirkung des PKA-Inhibitors innerhalb von 5 min auf das Orientierungsgedächtnis liefert im Gegensatz zu den genetischen Manipulationen einen Hinweis auf nicht-transkriptionelle Prozesse bzw. einen Hinweis auf akute und schnelle Prozesse in der Zelle, was die Hypothese unterstützt, dass der cAMP/PKA-Signalweg eine Kurzzeitkomponente des Orientierungsgedächtnisses modulieren könnte.

In diesem Zusammenhang wurde außerdem das Synapsen-assoziierte Protein *Synapsin* untersucht. Synapsine binden an synaptische Vesikel und ebenso an Aktin des Zytoskeletts, wodurch der sogenannte Reservepool aus Vesikeln zusammengehalten wird. Durch Phosphorylierung der Synapsine können die synaptischen Vesikel von diesem Reservepool dissoziieren und zur aktiven Zone wandern (Greengard et al., 1993; Cesca et al., 2010) und so eine hoch-frequentierte oder anhaltende Neurotransmission ermöglichen. Synapsin wird klassischerweise von PKA phosphoryliert, jedoch gibt es auch weitere Kinasedomänen für eine mögliche Phosphorylierung von Synapsin (Cesca et al., 2010). Bei *Drosophila* besitzt Synapsin zwei Konsensusdomänen für eine mögliche PKA-Phosphorylierung (Klagges et al., 1996). Es wurde bisher jedoch nur die Phosphorylierung durch die CaM-Kinase II (Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinasen II) nachgewiesen, welche für die olfaktorische Kurzzeithabituation eines Duftes benötigt wird (Sadanandappa et al., 2013). Die Abhängigkeit von Synapsin für die Ausbildung einer Kurzzeitplastizität wurde bei Invertebraten erstmals bei *Aplysia* nachgewiesen (Humeau et al., 2001). Die *Drosophila Syn⁹⁷* Nullmutante zeigt keine offensichtlichen morphologischen Defekte im Gehirn und keine stark abweichenden Verhaltensweisen, jedoch weisen sowohl Larven (Michels et al., 2005) als auch adulte Fliegen (Godenschwege et al., 2004) ein reduziertes olfaktorisches Kurzzeitgedächtnis auf. Es wurde ebenfalls ein leicht defektes Ortsgedächtnis in der *heat-box* beobachtet (Godenschwege et al., 2004).

Die durchgeführten Experimente in dieser Arbeit zeigen, dass die *Syn⁹⁷* Mutante unter dem Verlust des visuellen Orientierungsgedächtnisses leidet und dieser durch die Expression der cDNA in den R3 Neuronen auf wildtypisches Niveau gerettet werden kann. Das Zusammenspiel von PKA und Synapsin wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine genetische Interaktion dieser beiden Gene bewiesen (Abb. 59). Damit konnte

bei *Drosophila* erstmals ein verhaltensrelevanter Zusammenhang zwischen PKA und Synapsin gezeigt werden. Die Bereitstellung der synaptischen Vesikel vom Reservepool zum *readily-releasable-pool* und somit die Verstärkung der neuronalen Transmission scheint also ein essentieller Bestandteil der biochemischen Maschinerie des Arbeitsgedächtnisses zu sein. Außerdem konnte durch die genetische Interaktion von *Pka* und *Syn* ein weiterer Hinweis gesammelt werden, dass cAMP/PKA/SYN in einem Signalweg interagieren, in dem möglicherweise eine Kurzzeitkomponente für das Arbeitsgedächtnis liegt, die über die schnelle Verfügbarkeit von Vesikeln reguliert wird. Diese Hypothese passt zu der Beobachtung an der neuromuskulären Synapse bei *Drosophila*, dass die Rekrutierung von Vesikeln aus dem Reservepool während einer tetanischen Stimulation durch einen Inhibitor des cAMP/PKA-Signalwegs reduziert wird (Kuromi und Kidokoro, 2000).

In einem groß angelegten Experiment für verstärkende oder supprimierende Faktoren, welche gemeinsam mit PKA das visuelle Orientierungsgedächtnis modulieren, wurde *rugose* als supprimierender Effektor gefunden (Masterarbeit Lalotra, 2014). Während heterozygote *Pka-C1^{H2}/II* Fliegen einen intermediären Phänotyp von 70 % Gedächtnisleistung im *Detour*-Paradigma aufweisen, zeigen die doppelt heterozygoten Tiere (*rugose^{v5}/X; Pka-C1^{H2}/II*) ein Gedächtnis von 80 % und somit einen supprimierenden Phänotyp im Vergleich zu den heterozygoten *Pka-C1^{H2}/II* Kontrollen (Masterarbeit Zeyen, 2015). *Rugose* ist ein Ankerprotein der PKA (*A-kinase anchoring protein*; AKAPs), welches durch eine gezielte subzelluläre Lokalisation das Zusammenspiel der PKA und ihrer Interaktionspartner verbessert (Edwards und Scott, 2000). Während bei *Drosophila* Träger des hypomorphen *rugose^{v5}* Allels einen Defekt im olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis zeigen (Volders et al., 2012), zeigen die gleichen Tiere ein wildtypisches visuelles Orientierungsgedächtnis im *Detour*-Paradigma (Masterarbeit Zeyen, 2015). Die genetische Interaktion zwischen *rugose* und *Pka-C1* zeigt ebenfalls einen verstärkten, defekten Phänotyp im olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis (Zhao et al., 2013), erneut sind die Ergebnisse konträr zu den beschriebenen Ergebnissen aus dem *Detour*-Paradigma (Masterarbeit Zeyen, 2015). Während die Verankerung der PKA in der Nähe des G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) und der *rut* AC für das olfaktorische Gedächtnis essentiell ist, so scheint diese Verankerung für das Orientierungsgedächtnis eher eine negative Funktion zu haben und freibewegliche PKA-Enzyme werden für die Ausbildung des visuellen Arbeitsgedäch-

nisses benötigt (Abb. 62). In diesem Modell für ein R3 Neuron stehen mehr freibewegliche PKA-Enzyme in der Nähe des Reservepools der Vesikel zur Verfügung, um dort Synapsin zu phosphorylieren und die schnelle und anhaltende Freisetzung der Vesikel zu garantieren. Die Phosphorylierung von Ionenkanälen durch PKA wäre eine Möglichkeit der Modulation für kurzzeitige Plastizitätsveränderungen am Neuron. Diese ist jedoch weder für das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis, noch für das visuelle Orientierungsgedächtnis bekannt. Es gibt lediglich eine Studie mit primären *Drosophila* Neuronen, in der elektrophysiologisch die Modulation der GABA-Transmission durch den cAMP-Signalweg berichtet wurde (Ganguly und Lee, 2013). Zumindest bei *Aplysia* konnte der direkte Effekt der PKA auf einen K^+ -Kanal nachgewiesen werden (Kandel, 2001).

Für die Phosphorylierung von dCREB ist für das visuelle Orientierungsgedächtnis der cGMP/PKG-Signalweg anstelle des klassischen cAMP/PKA-Signalweges verantwortlich. Im Gegensatz dazu wird für das olfaktorische Gedächtnis die Aktivierung von dCREB über den cAMP/PKA-Signalweg postuliert (Davis, 2005).

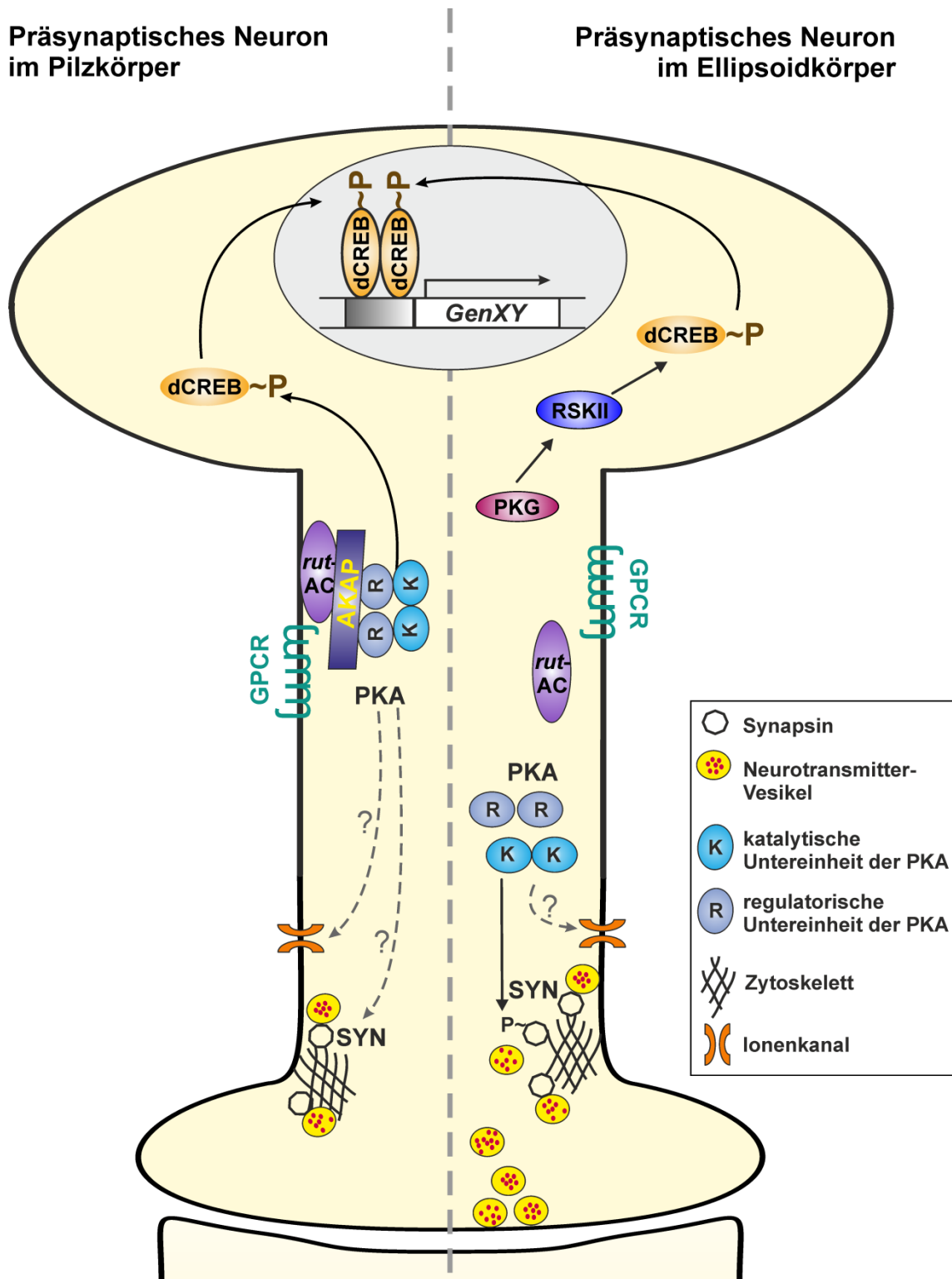


Abb. 62: Modell für den cAMP/PKA-Signalweg im visuellen Orientierungsgedächtnis im Gegensatz zum olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis von *Drosophila*. Während für das olfaktorische Gedächtnis eine feste zelluläre Lokalisation der PKA über spezifische Ankerproteine notwendig ist, ist für das visuelle Orientierungsgedächtnis eine freibewegliche Form der PKA förderlich für das Gedächtnis. Abkürzungen: GPCR (G-Protein gekoppelter Rezeptor), AC (Adenylylzyklase), AKAP (Ankerprotein der Proteinkinase A), cAMP (Zyklisches Adenosinmonophosphat), PKA (Proteinkinase A), R (regulatorische Untereinheit der PKA), C (katalytische Untereinheit der PKA), SYN (Synapsin), PKG (Proteinkinase G), RSKII (Ribosomale-S6-Kinase II), P~dCREB (phosphoryliertes (aktiviertes) *Drosophila* cAMP response element-binding protein).

4.7. Ein Modell zum visuellen Orientierungsgedächtnis von *Drosophila*

Die Möglichkeit zur Orientierung auf eine feste Position bzw. ein Objekt im Raum auch ohne akute visuelle Informationen erfordert die ständige Speicherung der Zielposition eines Objektes und die Speicherung der Eigenbewegung in Relation zu der festen Raumposition des Objektes. Eine vorübergehende Speicherung der visuellen Information während diese noch zur Verfügung steht, erlaubt anschließend für kurze Zeit das Zurückgreifen auf diese Information, wenn die sensorische Information nicht mehr zugänglich ist. Im Folgenden wird in einem hypothetischen Modell versucht, die Verarbeitung der visuellen und ideothetischen Information für das untersuchte visuelle Orientierungsgedächtnis zu erklären.

Als Erstes soll der Weg der visuellen Information und ihre Verarbeitungsstellen im Zentralkomplex grob skizziert werden (Abb. 63). In den Ellipsoidkörper gelangt visuelle Information von den optischen Tuberkeln in die Dendriten der Ringneurone des Subtyps R2 und R4d, die in der Region der lateralen Triangel (*Bulb*) liegen. Diese neuronale Verbindung wurde sowohl anatomisch beschrieben (Lin et al., 2013; <http://www.flycircuit.tw>), als auch physiologisch untersucht. In den Dendriten der R2 und R4d Neurone kann ein präferenzielles Antwortverhalten auf visuelle Landmarken bestimmter Höhen und Winkel im visuellen Blickfeld der Fliege gemessen werden und aufgrund dessen eine retinotop Karte für die Dendriten der Ringneurone erstellt werden (Seelig und Jayaraman, 2013). Vermutlich gibt es jedoch noch ein weiteres Projektionssystem der visuellen Information in den Zentralkomplex. Fragmente eines solchen Projektionssystems von den optischen Tuberkeln in die Protocerebralbrücke wurden bereits früh beschrieben (Dissertation Hanesch, 1986), jedoch wurde in keiner genaueren oder aktuelleren anatomischen Analyse weiter nach diesen Neuronen gesucht und sie daher auch nicht im Detail beschrieben. Es gibt jedoch zahlreiche Verbindungen vom optischen System zum Zentralhirn bzw. ins ventrolaterale Protocerebrum oder ins posteriore laterale Protocerebrum (Otsuna und Ito, 2006). Die genauere Weiterleitung der visuellen Information in den Zentralkomplex fehlt jedoch auch in dieser Studie. In Heuschrecken wurde die Verbindung des visuellen Systems über visuelle Tuberkel im lateralen Bereich des Protocerebrums in den Zentralkomplex jedoch sowohl anatomisch als auch funktional ausführlich beschrieben (Homborg et al., 2003; el Jundi et al., 2014). Visuelle Information, welche in die Protocerebralbrücke gelangt, könnte der direkten Kopplung eines akuten visuellen Stimulus und der benötigten Schrittlänge zum Anlaufen des Objektes dienen. Die Protocerebralbrücke ist ein Neuropil, welches für die

Modulation der Schrittlängen und –frequenzen verantwortlich ist (Strauss, 2002). Zusätzlich bestehen zahlreiche kolumnäre Projektionssysteme von der Protocerebralbrücke zum fächerförmigen Körper oder zum Ellipsoidkörper (Lin et al., 2013; Wolff et al., 2015). In Experimenten im Flugsimulator wurde gezeigt, dass im fächerförmigen Körper ebenfalls visuelle Information hinterlegt ist. So werden Merkmale wie Höhe über dem Horizont und Winkellage zur Horizontlinie, sowie die Größe eines Objekts in den verschiedenen Schichten dieses Neuropils verarbeitet (Liu et al., 2006). Im fächerförmigen Körper könnte also die Richtung der Fortbewegung moduliert werden, indem ein Objekt bewertet wird und als Folge eine Hinwendung auf das Objekt erfolgt oder eine Abwendung.

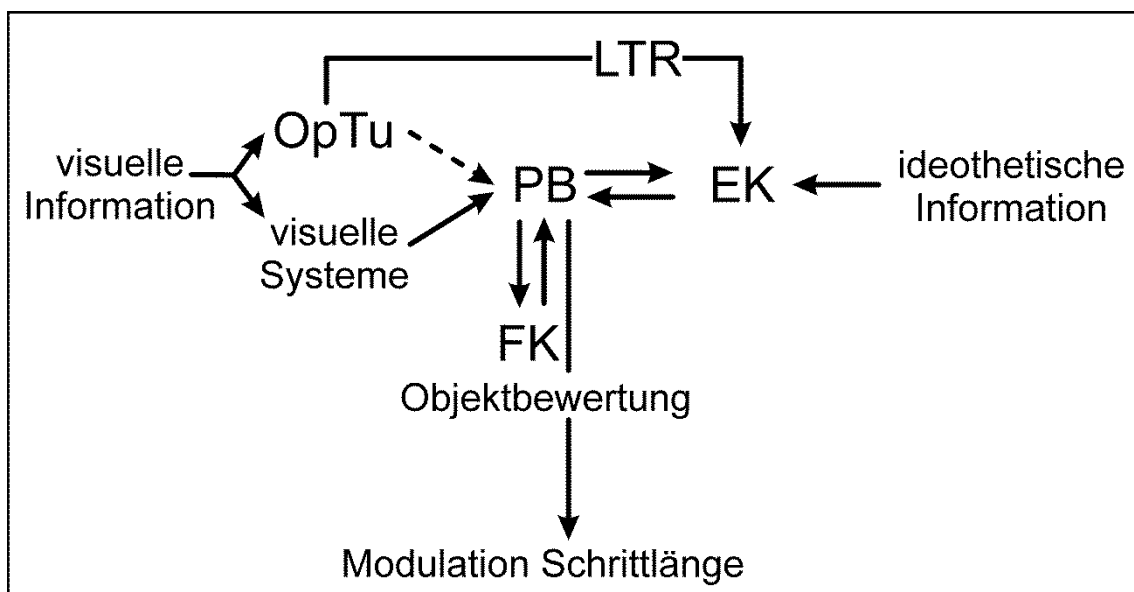


Abb. 63: Übersichtsmodell zur Verarbeitung von visueller Information im Zentralkomplex bei einer laufenden Fliege. Die visuelle Information wird über die visuellen Systeme in den Zentralkomplex eingespeist. Nachgewiesen ist Weiterleitung visueller Information über die optischen Tuberkeln (OpTu) in die lateralen Triangel (LTR; *Bulb*) und somit in den Ellipsoidkörper (EK). Es gibt jedoch weitere visuelle Verarbeitungssysteme im Protocerebrum, welche visuelle Information an die Protocerebralbrücke (PB) vermitteln können. Die Neuropile des Zentralkomplexes sind untereinander stark verknüpft. Die Bewertung eines visuellen Objektes erfolgt im fächerförmigen Körper (FK) und schließlich führt die Modulation der Schrittlängen zu einer Hin- oder Abwendung zum Objekt.

Die visuelle Information über die absolute Position einer Landmarke gelangt über die Dendriten in den lateralen Triangeln (*Bulb*) in die axonalen Projektionen der Ringneurone R2 und R4d und wird im Ellipsoidkörper weiterverarbeitet (Seelig und Jayaraman, 2013; Abb. 64 hellgrünes Neuron). In einer neuen Studie wurde eine nachgeschaltete Neuronenpopulation identifiziert und physiologisch beschrieben,

welche den Azimut der Fliege relativ zu ihrer Umgebung oder einem Objekt kodiert. Diese Neurone beinhalten laut Seelig und Jayaraman (2015) keine absolute Positionszuordnung mehr, sondern kodieren nur noch die relative Lage zwischen der Eigenposition und einer umgebenden Landmarke. Diese Neurone werden im Folgenden als *Kompassneurone* bezeichnet werden (siehe Einleitung Kapitel 1.4; *EBw.s* in Seelig und Jayaraman, 2015; *EBw.s-PBg.b-gall.b* in Wolff et al., 2015; *EIP* in Lin et al., 2013 und *eb-pb-vbo* in Hanesch et al., 1989; Abb. 64 rotes Neuron). Diese Kompassneurone beinhalten eine Kompass-ähnliche Repräsentation der Orientierung der Fliege in Relation zu einer visuellen Landmarke (Seelig und Jayaraman, 2015). Sie greifen Informationen aus den radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers ab und projizieren anschließend zum einen in spezifische Glomeruli der Protocerebralbrücke und zum anderen in die Gall. Diese Neurone werden hauptsächlich durch visuelle Stimuli aktiviert, die Aktivität kann aber auch durch die Eigenbewegungen der Fliege, also durch die ideothetische Information (Abb. 64 hypothetisches blaues Neuron), moduliert werden. Verschwindet eine visuelle Landmarke, so behalten diese Kompassneurone die relative Position in Form von neuronaler Aktivität über einige Sekunden bei (bis über 30 s). In dieser Situation wird die Modulation der Kompass-ähnlichen Repräsentation nur noch über die Eigenbewegung der Fliege gesteuert. Die Kodierung dieser relativen Position scheint an einer beliebigen Position im Ellipsoidkörper zu starten und wird dann entsprechend ihrer Drehbewegungen in den benachbarten radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers an die jeweiligen Kompassneurone weitergegeben (Seelig und Jayaraman, 2015). Hier besteht die Möglichkeit, dass es sich tatsächlich um ein entkoppeltes Kompasssystem von der Außenwelt handelt, oder dass diese Kopplung von der Außenwelt künstlich durch den experimentellen Aufbau geschehen ist. Aus Verhaltensexperimenten mit Bienen und Ameisen ist bekannt, dass diese ihren internen Kompass sowohl durch Sonnenlicht als auch durch polarisiertes Licht der externen Außenwelt angleichen können. In der Heuschrecke ist die Eichung eines solchen Kompasssystems mit Hilfe des Polarisationslichts besonders gut erforscht. Das Polarisationsmuster des Himmels wird über den dorsalen Rand (*dorsal rim area*), einem spezialisierten Teil des Komplexauges wahrgenommen (el Jundi et al., 2014). Dieser spezifische Bereich existiert auch in *Drosophila* (Wernet et al., 2012), so dass dieser prinzipiell auch zur Eichung des inneren Kompass an die Weltkoordinaten dienen könnte und somit auch ein absolutes und kein relatives Positionssystem in der Fliege herrschen könnte.

Zusätzlich muss der Ellipsoidkörper ideothetische Informationen über die Lauf- und Drehbewegungen der Fliege bekommen. Die Existenz der Information über die eigengenerierte Lokomotion in Form einer Efferenzkopie wurde schon früh im sogenannten Reafferenzprinzip postuliert (von Holst und Mittelstaedt, 1950). Über die Art der Neurone, die diese ideothetische Information vermitteln, liegen jedoch keinerlei experimentelle Daten vor. Denkbar sind hier Projektionssysteme, die aus der Protocerebralbrücke oder aus dem fächerförmigen Körper kommen. Aber auch ein Projektionssystem zur Vermittlung der ideothetischen Information, welches direkt aus dem Ventralganglion aufsteigt und auf die Neurone des Ellipsoidkörpers verschaltet, wäre möglich. Dies wäre dann nach von Holst und Mittelstaedt (1950) eine Exafferenz. Dieses ideothetische System ist nicht topographisch mit absoluten Positionszuordnungen organisiert, sondern beinhaltet ausschließlich relative Positionsänderungen über die Eigenbewegung der Fliege. Die ideothetischen Neurone müssten jedoch gezielt in die einzelnen radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers (*wedges*) projizieren. Da die Kompassneurone relative und nicht absolute Positionen kodieren, kann das Einspeisen der ideothetischen Information in den Ellipsoidkörper in einer beliebigen radialen Einheit starten und wird anschließend entsprechend der Drehbewegung der Fliege in die benachbarten radialen Einheiten weiterverschoben. Da bisher nichts über die Lage eines solchen Satzes von Neuronen bekannt ist, wurden nur die Projektionen in die radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers eingezeichnet (Abb. 64; blau skizziertes Neuron).

Im vorgeschlagenen Modell wird die neuronale Aktivität in den Kompassneuronen (Abb. 64; rotes Neuron) sowohl durch visuelle als auch durch ideothetische Information hervorgerufen (Seelig und Jayaraman, 2015). Diese Aktivität ist punktuell zu beobachten und wird von einer radialen Einheit des Ellipsoidkörpers zur nächsten radialen Einheit verschoben, so dass hier die aktuelle, relative Positionszuordnung kodiert ist. Wandert ein visuelles Objekt über das Blickfeld der Fliege, so wandert auch diese Aktivität in Abhängigkeit von der Relation der Fliege zum Objekt durch die radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers. Diese Positionsinformation ist nur relativ und nicht absolut zur Landmarke (Seelig und Jayaraman, 2015). Läuft eine Fliege nun eine Landmarke an, so wird entsprechend des visuellen Winkels ein spezifisches Ringneuron durch die visuelle Information angeregt. Aufgrund der ringförmigen Struktur des Ringneurons (hier vom Subtyp R2 + R4d), welches in alle 16 radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers projiziert, kann dieses Neuron keine relative Positionsinformation weiterleiten. Diese wird in dem vorgestellten Modell über das ideothetische Neuron

vermittelt. Dieses Neuron könnte die relative Position der Eigenbewegung wiedergeben. Läuft die Fliege nun geradeaus auf den Balken zu, so würde ein ideothetisches Neuron feuern, welches wiederum in eine spezifische radiale Einheit des Ellipsoidkörpers projiziert und dort eine lokale Erregung des Ringneurons hervorrufen könnte (Abb. 64A). Eine allgemeine graduierte Aktivität des Ringneurons in allen radialen Einheiten durch die visuelle Information könnte somit in einer radialen Einheit durch die zusätzliche Aktivität eines ideothetischen Neurons lokal verstärkt werden. Verschiebt sich eine Landmarke, z.B. um 15° (Abb. 64B), so würde ein „benachbartes“ ideothetisches Neuron eine Drehung um 15° melden und eine lokale Aktivität des Ringneurons in der benachbarten radialen Einheit erzeugen. In dieser benachbarten radialen Einheit befindet sich das nächste Kompassneuron, so dass die Aktivität (die Information über die relative Positionsänderung um 15°) im Ellipsoidkörper um eine radiale Einheit weiterverschoben würde.

Die Beobachtungen von Seelig und Jayaraman (2015) über die neuronalen Eigenschaften der Kompassneurone beschreiben die Orientierung bei akuter visueller Information und ermöglichen außerdem die anhaltende Orientierung auf ein Objekt, falls dieses nicht mehr zu sehen ist. Das Phänomen des Weiteranlaufens eines Objektes über mehrere Sekunden, obwohl dieses Objekt bereits verschwunden ist, wurde als *persistence of orientation* beschrieben (Strauss und Pichler, 1998). Dieses Phänomen gleicht der Situation bei Seelig und Jayaraman (2015), wenn das Licht in der Arena ausgeschaltet wird und in den Kompassneuronen die zuvor fixierte Landmarke repräsentiert wird und das Ca^{2+} -Signal eine leichte ideothetische Modulation erfährt. Durch diese ideothetische Modulation könnte die Fliege merken, wenn sie von ihrem Kurs auf die ursprünglich fixierte Position abkommt. Dabei kann der beschriebene Kompass eine relative Karte repräsentieren, oder durch den experimentellen Aufbau einer artifiziellen relativen Darstellung unterliegen. Die Ereignisse des *Detour*-Paradigmas können mit diesem System jedoch nicht erklärt werden, weil mit dem Ablenkbalken der Fliege eine weitere Landmarke präsentiert wird und sie nach einer Abbiegung von ihrem ursprünglichen Laufweg entscheidet, ob sie die erste oder zweite Landmarke anläuft. Daher wird im Folgenden ein zweites Modell vorgeschlagen, welches eine Orientierung trotz Verschwinden der visuellen Information ermöglicht und welches zusätzlich nicht nur das letzte fixierte Objekt, sondern auch ein vorheriges Objekt repräsentiert.

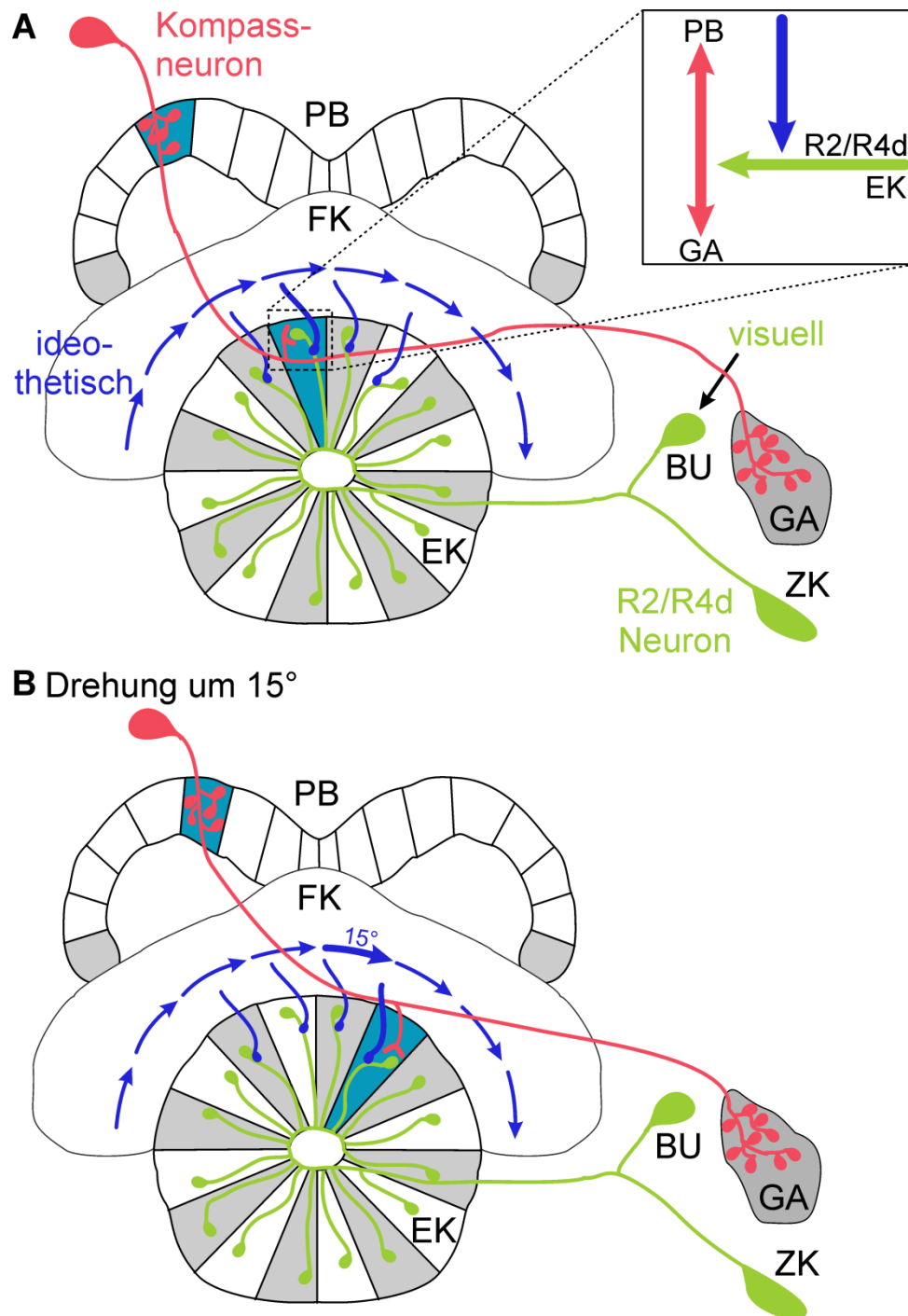


Abb. 64: Modell eines Kompassneurons zur Informationsübertragung in einem relativen Positionssystem von *Drosophila*. (A) Die R3 Neurone (hellgrün) haben ihre Dendriten in den *Bulbs* (BU; laterale Triangel) und bilden synaptische Ausgänge in allen radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers (EK). Das Kompassneuron (rot) greift durch seine Dendriten im Ellipsoidkörper Informationen ab und leitet diese über synaptische Ausgänge an die Protocerebralbrücke (PB) und die Gall (GA) weiter. Ein weiteres Neuron (blau) führt ideothetische Information in den Ellipsoidkörper ein. Während die visuelle Information das R3 Neuron in allen radialen Einheiten aktiviert, sorgt die ideothetische Information für eine lokale spezifische Erregung und aktiviert als Folge die NOS. Der Synergismus von visueller und ideothetischer Stimulation führt zur lokalen NO-Produktion und einem anhaltenden Signal an das Kompassneuron. Diese lokale Aktivität spiegelt die relative Positionsinformation wider. (B) Dreht sich die Fliege um 15°, so führt dies zu einer Verschiebung der lokalen Aktivität in eine benachbarte radiale Einheit des Ellipsoidkörpers. Weitere Abkürzungen: FK (fächerförmiger Körper), NO (Stickstoffmonoxid), ZK (Zellkörper der Ringneurone).

Die Analyse der biochemischen Komponenten, welche zur Ausbildung des untersuchten visuellen Orientierungsgedächtnisses benötigt werden, legt nahe, dass dieses Gedächtnis in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers gebildet wird. Dieses Gedächtnis benötigt ebenfalls die visuelle Information über ein Objekt und die ideothetische Information der Eigenbewegung. In einem hypothetischen Modell zur Funktionalität des Orientierungsgedächtnisses könnte die visuelle Information an die R3 Neurone von einem R2 Partnerneuron stammen, welches ein Objekt meldet (Abb. 65A). Da ein Ringneuron 16 Ausgänge in alle radialen Einheiten des Ellipsoidkörpers hat, muss eine spezifische, lokale Aktivität in einer radialen Einheit durch eine dritte Information bestimmt werden. In dem vorgestellten Modell wird dies durch das ideothetische Neuron vermittelt. Die Koinzidenz von ideothetischer und visueller Information könnte das R3 Neuron aktivieren und somit die NOS, welche in den axonalen Ausgängen der R3 Neurone exprimiert ist, ebenfalls aktivieren. Auf diese Weise könnte eine lokale NO-Produktion entstehen, die proportional zur Länge der Anlaufzeit auf eine Landmarke akkumulieren könnte. Die R3 Neurone haben jedoch ebenfalls eine dendritische Region in der *Bulb* und sind somit anatomisch ähnlich aufgebaut wie die R2 oder R4d Neuronen, welche die visuelle Information über ein Objekt kodieren. Denkbar wäre hier, dass die R3 Neurone ein *off*-Signal kodieren könnten. Entsprechend ihres R2 Partnerneurons könnten sie ihr rezeptives Feld ebenfalls in einem definierten Blickwinkel der Fliege besitzen, jedoch könnten sie auf das Verschwinden von Objekten reagieren. Verschwindet nun der ursprüngliche Balken im durchgeführten *Detour*-Experiment, so könnte dieser in einer durch visuelle und ideothetische Information definierten radialen Einheit eine Aktivität im R3 Neuron hinterlassen, die die bereits ausgelöste neuronale Aktivität (über die Position des Balkens und der Eigenbewegung) verlängern könnte. Diese länger anhaltende oder verstärkte lokale Aktivität eines R3 Neurons in einer radialen Einheit könnte über NO und cGMP und dann weiter über die CNG-Kanäle vermittelt werden. Die präzise und lokal begrenzte Expression von NOS in den axonalen Ausgängen der R3 Neurone unterstützt diese Hypothese. Die vermehrte Produktion von NO und cGMP im R3 Neuron durch die lokale Aktivierung könnte eine längere Öffnungswahrscheinlichkeit der CNG-Kanäle erzeugen und somit in einer anhaltenden Transmission resultieren. Gleichzeitig erscheint der Ablenkbalken im 90° Winkel der Fliege und es könnte entsprechend eines weltzentrierten Koordinatensystems eine andere radiale Einheit eines R3 Neurons angeregt werden, in der ebenfalls eine NO-Produktion initiiert wird

(Abb. 65B). Dieser Ablenkbalken wird jedoch nach 1 s wieder ausgeblendet, so dass die zeitliche Integration sehr viel geringer ausfällt als in der Situation des ursprünglichen Balkens, welcher über mehrere Sekunden fixiert und angelaufen wurde. Anschließend gibt es keine weiteren visuellen Stimuli für die Fliege in der Arena. Die neuronale Aktivität über die Position der beiden verschwundenen Landmarken könnte über ein weiteres Projektionssystem in die Brücke kopiert werden. Die längere Anlaufzeit auf die Position des ursprünglichen Anlaufbalkens hätte eine höhere NO-Produktion zur Folge als in der entsprechenden radialen Einheit welche den Ablenkbalken kodiert, und Erstere könnte somit auch ein stärkeres Signal an die Protocerebralbrücke weiterleiten. Dieses Signal in der Brücke hätte die Erhöhung der Schrittlänge auf einer Seite zur Folge und würde somit in der Drehung auf das zuerst angelaufene Objekt resultieren. Die Modulation der Schrittlänge durch die Protocerebralbrücke wurde bereits beschrieben (Triphan et al., 2010). Erscheint ein Objekt auf der rechten Seite des Tieres, so wird dieses Objekt auch auf der rechten Seite der Protocerebralbrücke repräsentiert und über das horizontale Fasersystem werden die Ventralkörper (*ventral bodies*) auf der kontralateralen Seite aktiviert. Die kontralaterale Projektion erhöht die Schrittlänge auf der anderen Seite des Tieres (im Vergleich zum Objekt) und führt somit zu einer Hinwendung auf das Objekt. Im *Detour*-Paradigma würde dies in einer Hinwendung auf das ursprüngliche Objekt resultieren.

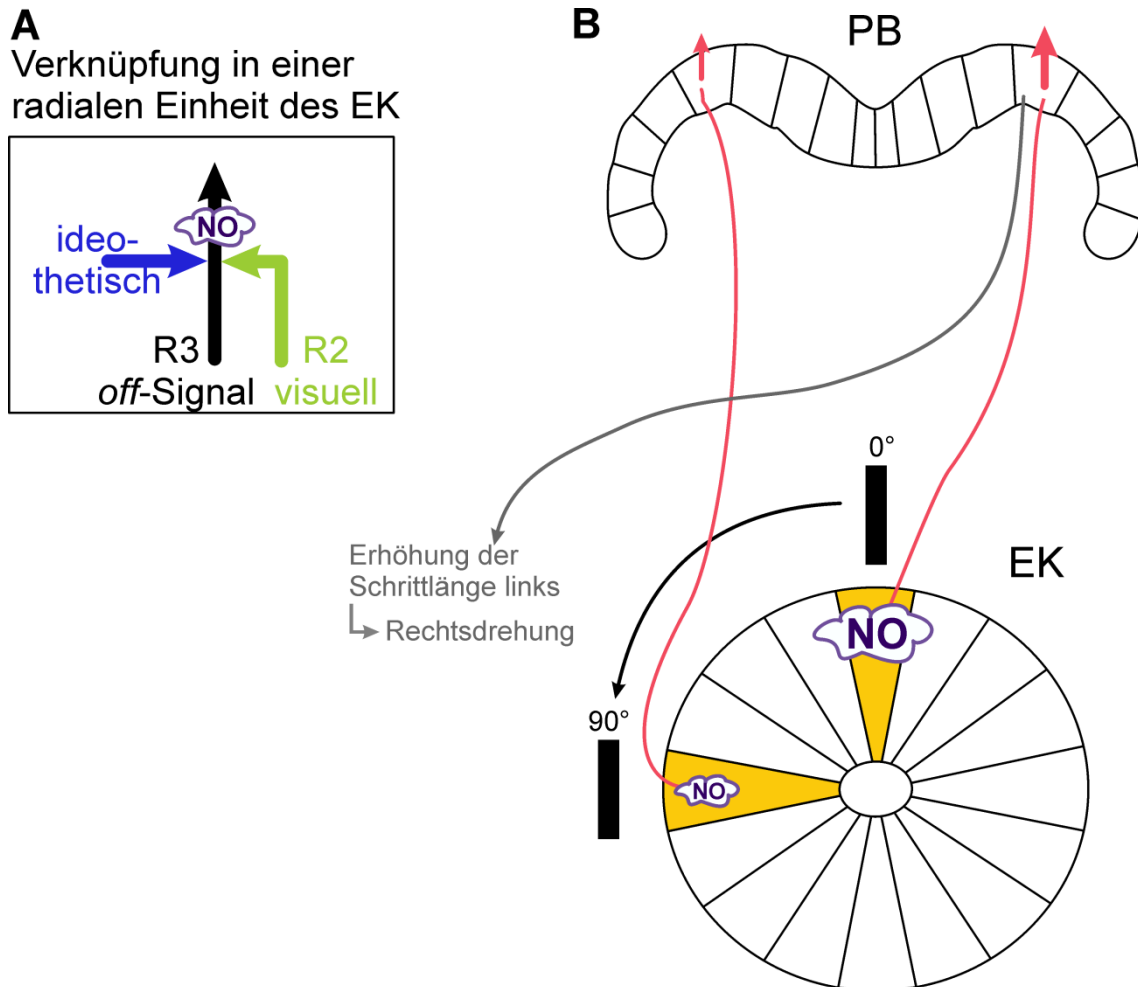


Abb. 65: Modell eines neuronalen Netzwerkes zur Informationsübertragung in einem visuellen Orientierungsgedächtnis von *Drosophila*. (A) Die R3 Neurone (schwarz) integrieren die visuelle Information der R2 Neurone (hellgrün) und die ideothetische Information, welche über ein unbekanntes Neuron (blau) vermittelt wird. Der Synergismus von visueller und ideothetischer Stimulation führt zur lokalen NO-Produktion. Diese initiale Aktivierung führt zu einem weiteren, anhaltenden Signal in den R3 Neuronen, wenn diese durch das Verschwinden eines zuvor fixierten Objekts aktiviert werden. (B) Die lokale Aktivierung durch das Anlaufen und Verschwinden eines Objekts hinterlässt eine lokale NO-Produktion im Ellipsoidkörper (EK), welche über die Anlauf- und Fixationsdauer integriert wird und somit größer für das zuerst angelaufene Objekt ist. Dieses Aktivitätsmuster wird an die Protocerebralbrücke (PB) weitergeleitet. Das stärkere Signal auf einer Seite der PB löst die Erhöhung der Schrittlänge auf der kontralateralen Seite aus, so dass eine Drehung erfolgt. Weitere Abkürzung: NO (Stickstoffmonoxid).

Die Verknüpfung des Kompassneurons und des R3 Neurons ist auch hypothetisch kaum darstellbar, da zu wenige Daten vorliegen. Die genaue Lage der prä- und postsynaptischen Strukturen dieser Kompassneurone ist nicht eindeutig beschrieben. Während Wolff et al., (2015) diesen Neuronen ausschließlich Dendriten im Ellipsoidkörper zuordnen, wurden in einer anderen Anatomiestudie jedoch auch präsynaptische Markerproteine in diesen Kompassneuronen im Bereich des Ellipsoidkörpers detektiert (Lin et al., 2013). Die Ausbildung von Prä- und/oder Postsynapsen im Ellipsoidkörper ist entscheidend für die Modellierung der Funktionalität dieses Neurons und hätte

maßgebliche Konsequenzen für seine Rolle in einem hypothetischen Modell. Die genaue Verschaltung der visuellen und ideothetischen Information auf diese Kompassneurone ist ebenfalls nicht geklärt. Eine einfache Annahme wäre die synaptische Verknüpfung des ideothetischen Neurons auf ein visuelles Ringneuron und anschließend die Projektion auf die Kompassneurone, welche die relative Positionsinformation an nachgeschaltete Systeme weiterleitet.

Dem System der Orientierung aufgrund von gespeicherter visueller Information und relativer Positionsänderung muss ein System der direkten visuellen Informationsverarbeitung übergeordnet sein. Steht akute visuelle Information zur Verfügung, so wird diese vorrangig zur Orientierung benutzt. Nur im Falle von nicht vorhandener visueller Information wird auf die gespeicherten Daten und Eigenbewegungen zurückgegriffen, um so eine Orientierung an verschwundenen Objekten zu ermöglichen. Zur Vereinfachung wurde dies im Modell nicht berücksichtigt.

Folgende direkte Fragestellungen müssten als nächste Schritte bearbeitet werden, um den Übergang des topographischen Systems in ein relatives System zu erklären und das vorgeschlagene Modell zu überprüfen:

- 1) Physiologischer Nachweis (*Calcium Imaging*; Diegelmann et al., 2002) der postulierten anhaltenden Aktivität des R3 Neurons nach Ausschalten des akuten visuellen Eingangs (Landmarke). Physiologischer Nachweis eines postulierten *off*-Signals der R3 Neurone bei Verschwinden eines visuellen Objektes.
- 2) Wird das visuelle Orientierungsgedächtnis zerstört, wenn die synaptische Aktivität der Kompassneurone durch die Expression von *Tetanus Toxin* stillgelegt wird?
- 3) Identifizierung der synaptischen Verschaltung der Neurone im Ellipsoidkörper: Gibt es eine direkte synaptische Verbindung der R3 Neurone zu den Kompassneuronen? Gibt es synaptische Verbindungen der Ringneuronsysteme untereinander? Histologische Analysen unter Verwendung der *GRASP*-Methode (Rekonstruktion eines GFP-Signals über den synaptischen Kontakt zweier Neurone; *GFP reconstitution across synaptic partners*; Gordon und Scott, 2009).
- 4) Analyse der prä- und postsynaptischen Strukturen der Kompassneurone.
- 5) Wirkt NO ausschließlich intrazellulär in den R3 Neuronen, oder auch interzellulär in den Kompassneuronen (oder in einem anderen Projektionssystem

zwischen Protocerebralbrücke und Ellipsoidkörper)? Wird die Funktionsfähigkeit des Orientierungsgedächtnisses durch die Expression eines RNAi-Konstrukts gegen die sGC in den Kompassneuronen (oder in einem anderen Projektions-system zwischen Protocerebralbrücke und Ellipsoidkörper) gestört?

- 6) Identifizierung des neuronalen Netzwerks der ideothetischen Information. Welche Neurone führen Informationen über Lauf- und Drehbewegungen in den Ellipsoidkörper ein, wenn keine Landmarke visuell sichtbar ist? Physiologischer Nachweis (*Calcium Imaging*) der ideothetischen Neurone auf dem *Buchner-Ball* (Seelig et al., 2010).
- 7) Welcher Neuronentyp integriert die visuelle und ideothetische Information – die R3 Neurone und/oder die Kompassneurone? Identifikation der synaptischen Verbindungen der visuellen Informationsträger (Ringneurone) und der ideothetischen Informationsträger auf das Kompassneuron.
- 8) Identifizierung der beteiligten Neurone der Koinzidenzsynapse (siehe Einleitung Kapitel 1.2.1; Martín-Peña et al., 2014) durch eine sehr aufwendige Elektronenmikroskopie. Einordnung der Koinzidenzsynapse in das vorgeschlagene Modell.

Die Experimente zur Beantwortung dieser Fragestellungen könnten dieses Basismodell essentiell weiterentwickeln und gegebenenfalls zu neuen Modifikationen oder Korrekturen führen, um das neuronale Netzwerk, welches dem visuellen Orientierungsgedächtnis zu Grunde liegen, zu entschlüsseln.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Identifizierung der benötigten Signalwege für ein visuelles Orientierungsgedächtnis bei *Drosophila* geleistet. Dieses Gedächtnis hat eine Dauer von etwa 4 Sekunden und dient der ununterbrochenen Navigation auf eine spezifische Landmarke, auch wenn diese kurzzeitig nicht mehr sichtbar ist. Das Gedächtnis benötigt die Struktur des Zentralkomplexes, vor allem die R3 Ringneurone des Ellipsoidkörpers. Für die Ausbildung dieses Gedächtnisses sind zwei Gasotransmitter, Stickstoffmonoxid (NO) und Schwefelwasserstoff (H₂S), erforderlich. Erstmals wurde hier eine Funktion von endogenem H₂S für die Ausbildung eines Gedächtnisses nachgewiesen. NO aktiviert die lösliche Guanylylzyklase, welche für die vermehrte Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) verantwortlich ist. H₂S hat dagegen eine inhibitorische Wirkung auf die cGMP-Phosphodiesterase, welche für den Abbau von cGMP verantwortlich ist und deren Inhibition somit ebenfalls zu einer Erhöhung des cGMP-Niveaus in der Zelle führt. Die gemeinsame Regulation von cGMP hat die Aktivierung der *foraging* Proteinkinase G (PKG) und der *ignorant* Ribosomalen S6 Kinase II (RSKII) zur Folge. Die resultierende dCREB-Phosphorylierung durch RSKII ist essentiell für diese Gedächtnisleistung. dCREB-Aktivität gewährleistet die stetige Expression von sogenannten *Kompetenzfaktoren*, welche die R3 Ringneurone des Ellipsoidkörpers mit der Fähigkeit ausstatten, dieses visuelle Arbeitsgedächtnis auszubilden. Ein tonisches NO- und H₂S-Signal wird also für die Expression dieser Kompetenzfaktoren benötigt. Die pharmakologische Inhibition der NO-Synthase beschreibt die zusätzliche Bedeutung eines phasischen NO-Signals für die Funktionsfähigkeit dieses Gedächtnisses. Dieses phasische NO-Signal könnte zur kurzfristigen Modulation von Ionenkanälen durch cGMP/PKG führen und die Öffnungsdauer dieser um 4 Sekunden verlängern. Des Weiteren wurde eine Rolle des cAMP/PKA (zyklisches Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A)-Signalwegs für das Orientierungsgedächtnis mit einer Mutantanalyse und pharmakologischen Experimenten gefunden. Möglicherweise reguliert der cAMP/PKA-Signalweg weitere kurzzeitige synaptische Modulationen, die für das Orientierungsgedächtnis benötigt werden. Die Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass PKA nicht für die Phosphorylierung von dCREB verantwortlich ist, sondern für die Phosphorylierung von Synapsin und damit eine schnelle und anhaltende Verfügbarkeit von Neurotransmittervesikeln sicherstellt.

6. Summary

The present study contributes to the identification of signalling pathways required for the visual orientation memory of *Drosophila*. This kind of memory lasts about 4 seconds and enables the animals' uninterrupted navigation to a defined landmark even though the landmark gets out of sight. This memory is localized in the central complex, specifically in the R3 ring neurons of the ellipsoid body. This short-term memory requires two kinds of gaseous transmitters: nitric oxide (NO) and hydrogen sulfide (H₂S) revealing for the first time a functional role of endogenously produced H₂S in memory formation. NO and H₂S are produced by Nitric Oxide Synthase (NOS) and Cystathionin- β -Synthase/Cystathionine- γ -Lyase, respectively. NO activates the soluble Guanylylcyclase which produces cyclic guanosine monophosphate (cGMP). On the other hand, the cGMP-dependent Phosphodiesterase which metabolises cGMP, is inhibited by H₂S resulting in elevated cGMP levels in these cells. The concerted regulation of cGMP abundance leads up to the activation of the *foraging* Protein Kinase G (PKG) and subsequently the activation of the *ignorant* Ribosomal S6 Kinase II (RSKII). The resulting dCREB phosphorylation by RSKII is essential for this memory task. dCREB activity ensures a persistent expression of so-called *competence factors* which endow the R3 ring neurons of the ellipsoid body to establish the visual working memory. Thus, a tonic NO and H₂S signal is required for the expression of these competence factors. Furthermore, a pharmacological inhibition of NOS revealed an additional requirement of phasic NO signalling to enable this visual memory. This phasic NO signalling might be necessary to modulate ion channels in a cGMP/PKG-dependent manner. This short-termed modulation of ion channels might prolong ion channel activity to encode a memory of 4 seconds. Furthermore, mutant analysis and pharmacological experiments elucidated a role of the cAMP/PKA (cyclic adenosine monophosphate/Protein Kinase A)-signalling pathway in the R3 ring neurons for the visual orientation memory. cAMP/PKA-signalling might regulate additional short-termed synaptic modulations required for this memory. It is hypothesized, that PKA is not involved in dCREB phosphorylation, but instead is needed for the phosphorylation of Synapsin and whereby it ensures the availability of vesicles for fast and continuous synaptic release.

7. Verzeichnisse

7.1. Literaturverzeichnis

Abe, K. & Kimura, H. (1996), 'The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator', *The Journal of Neuroscience* 16(3), 1066-1071.

Adams, M. D.; Celniker, S. E.; Holt, R. A.; Evans, C. A.; Gocayne, J. D. et al. (2000), 'The genome sequence of *Drosophila melanogaster*', *Science* 287(5461), 2185--2195.

Akalal, D.-B. G.; Yu, D. & Davis, R. L. (2010), 'A late-phase, long-term memory trace forms in the gamma neurons of *Drosophila* mushroom bodies after olfactory classical conditioning', *The Journal of Neuroscience* 30(49), 16699--16708.

Akbergenova, Y. & Bykhovskaia, M. (2007), 'Synapsin maintains the reserve vesicle pool and spatial segregation of the recycling pool in *Drosophila* presynaptic boutons', *Brain Research* 1178, 52--64.

Akbergenova, Y. & Bykhovskaia, M. (2010), 'Synapsin regulates vesicle organization and activity-dependent recycling at *Drosophila* motor boutons', *Neuroscience* 170(2), 441--452.

Anholt, R. R. & Mackay, T. F. (2012), 'Genetics of aggression', *Annual Review of Genetics* 46(1), 145--164.

Anjum, R. & Blenis, J. (2008), 'The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(10), 747--758.

Arancio, O.; Antonova, I.; Gambaryan, S.; Lohmann, S. M.; Wood, J. S.; Lawrence, D. S. & Hawkins, R. D. (2001), 'Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation', *The Journal of Neuroscience* 21(1), 143--149.

Aso, Y.; Grübel, K.; Busch, S.; Friedrich, A. B.; Siwanowicz, I. & Tanimoto, H. (2009), 'The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers', *Journal of Neurogenetics* 23(1-2), 156--172.

Baddeley, A. (2012), 'Working memory: Theories, models, and controversies', *Annual Review of Psychology* 63(1), 1--29.

Baker, D. A.; Beckingham, K. M. & Armstrong, J. D. (2007), 'Functional dissection of the neural substrates for gravitaxic maze behavior in *Drosophila melanogaster*', *The Journal of Comparative Neurology* 501(5), 756--764.

Bannerman, D.; Chapman, P.; Kelly, P.; Butcher, S. & Morris, R. (1994), 'Inhibition of nitric oxide synthase does not impair spatial learning', *The Journal of Neuroscience* 14(12), 7404--7414.

Bausenwein, B.; Müller, N. R. & Heisenberg, M. (1994), 'Behavior-dependent activity labeling in the central complex of *Drosophila* during controlled visual stimulation', *The Journal of Comparative Neurology* 340(2), 255--268.

Belay, A. T.; Scheiner, R.; So, A. K.-C.; Douglas, S. J.; Chakaborty-Chatterjee, M.; Levine, J. D. & Sokolowski, M. B. (2007), 'The *foraging* gene of *Drosophila melanogaster*: spatial-expression analysis and sucrose responsiveness', *The Journal of Comparative Neurology* 504(5), 570--582.

de Belle, J.S. und Sokolowski, M. (1987), 'Heredity of rover-sitter alternative foraging strategies of *Drosophila melanogaster* larvae', *Heredity* 59, 73 - 84.

de Belle, J. S. & Heisenberg, M. (1996), 'Expression of *Drosophila* mushroom body mutations in alternative genetic backgrounds: a case study of the *mushroom body miniature* gene (*mbm*)', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(18), 9875--9880.

Bellen, H.; Levis, R.; Liao, G.; He, Y.; Carlson, J.; Tsang, G.; Evans-Holm, M.; Hiesinger, P.; Schulze, K.; Rubin, G.; Hoskins, R. & Spradling, A. (2004), 'The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes', *Genetics* 167(2), 761--781.

Benzer, S. (1967), 'Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58(3), 1112--1119.

Bibli, S.-I.; Yang, G.; Zhou, Z.; Wang, R.; Topouzis, S. & Papapetropoulos, A. (2015), 'Role of cGMP in hydrogen sulfide signaling', *Nitric Oxide* 46, 7--13.

Biel, M. (2009), 'Cyclic nucleotide-regulated cation channels', *Journal of Biological Chemistry* 284(14), 9017--9021.

Boehning, D. & Snyder, S. H. (2003), 'Novel neural modulators', *Annual Review of Neuroscience* 26(1), 105--131.

Borst, A. (2009), '*Drosophila*'s view on insect vision', *Current Biology* 19(1), R36--R47.

Brakeman, P. R.; Lanahan, A. A.; O'Brien, R.; Roche, K.; Barnes, C. A.; Haganir, R. L. & Worley, P. F. (1997), 'Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors', *Nature* 386(6622), 284--288.

Brand, A. & Perrimon, N. (1993), 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', *Development* 118(2), 401--415.

Bruintjes, J.; Henning, R.; Douwenga, W. & van der Zee, E. (2014), 'Hippocampal cystathionine beta synthase in young and aged mice', *Neuroscience Letters* 563, 135--139.

Bucci, M.; Papapetropoulos, A.; Vellecco, V.; Zhou, Z.; Pyriochou, A.; Roussos, C.; Roviezzo, F.; Brancaleone, V. & Cirino, G. (2010), 'Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30(10), 1998--2004.

Bülthoff, H.; Götz, K. G. & Herre, M. (1982), 'Recurrent inversion of visual orientation in the walking fly, *Drosophila melanogaster*', *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 148, 471-481.

Carriere, A.; Ray, H.; Blenis, J. & Roux, P. P. (2008), 'The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade', *Frontiers in Bioscience* 13(10), 4258--75.

Cesca, F.; Baldelli, P.; Valtorta, F. & Benfenati, F. (2010), 'The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity', *Progress in Neurobiology* 91(4), 313--348.

Champlin, D. & Truman, J. (2000), 'Ecdysteroid coordinates optic lobe neurogenesis via a nitric oxide signaling pathway', *Development* 127(16), 3543--3551.

Chen, T.-W.; Wardill, T. J.; Sun, Y.; Pulver, S. R.; Renninger, S. L.; Baohan, A.; Schreiter, E. R.; Kerr, R. A.; Orger, M. B.; Jayaraman, V.; Looger, L. L.; Svoboda, K. & Kim, D. S. (2013), 'Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity', *Nature* 499(7458), 295--300.

Chiang, A.-S.; Lin, C.-Y.; Chuang, C.-C.; Chang, H.-M.; Hsieh, C.-H.; Yeh, C.-W.; Shih, C.-T.; Wu, J.-J.; Wang, G.-T.; Chen, Y.-C.; Wu, C.-C.; Chen, G.-Y.; Ching, Y.-T.; Lee, P.-C.; Lin, C.-Y.; Lin, H.-H.; Wu, C.-C.; Hsu, H.-W.; Huang, Y.-A.; Chen, J.-Y.; Chiang, H.-J.; Lu, C.-F.; Ni, R.-F.; Yeh, C.-Y. & Hwang, J.-K. (2011), 'Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in *Drosophila* at single-cell resolution', *Current Biology* 21(1), 1--11.

Coletta, C.; Papapetropoulos, A.; Erdelyi, K.; Olah, G.; Módis, K.; Panopoulos, P.; Asimakopoulou, A.; Gerö, D.; Sharina, I.; Martin, E. & Szabo, C. (2012), 'Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(23), 9161--9166.

Collett, M. (2009), 'Spatial memories in insects', *Current Biology* 19(24), R1103--R1108.

Collett, M.; Chittka, L. & Collett, T. (2013), 'Spatial memory in insect navigation', *Current Biology* 23(17), R789--R800.

Cook, R. K.; Christensen, S.; Deal, J.; Coburn, R.; Deal, M.; Gresens, J.; Kaufman, T. & Cook, K. (2012), 'The generation of chromosomal deletions to provide extensive coverage and subdivision of the *Drosophila melanogaster* genome', *Genome Biology* 13(3), R21.

Cossenza, M.; Socodato, R.; Portugal, C. C.; Domith, I. C.; Gladulich, L. F.; Encarnação, T. G.; Calaza, K. C.; Mendonça, H. R.; Campello-Costa, P. & Paes-de-Carvalho, R. (2014), 'Chapter Five - Nitric oxide in the nervous system: Biochemical, developmental, and neurobiological aspects', *Vitamins and Hormones* Volume 96, 79--125.

Cowan, N. (2008), 'What are the differences between long-term, short-term, and working memory?', *Progress in Brain Research* Volume 169, 323--338.

Dash, P. K.; Hochner, B. & Kandel, E. R. (1990), 'Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation', *Nature* 345(6277), 718--721.

Davies, S.-A. (2006), 'Signalling via cGMP: Lessons from *Drosophila*', *Cellular Signalling* 18(4), 409--421.

Davis, R. L. & Kiger, J. A. (1981), '*Dunce* mutants of *Drosophila melanogaster*: mutants defective in the cyclic AMP phosphodiesterase enzyme system', *The Journal of Cell Biology* 90(1), 101--107.

Davis, R. L. (2005), 'Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience.', *Annual Review of Neuroscience* 28, 275--302.

Davis, R. L. (2011), 'Traces of *Drosophila* memory', *Neuron* 70(1), 8--19.

Day, J. (2005), 'Cyclic nucleotide phosphodiesterases in *Drosophila melanogaster*', *The Biochemical Journal* 388, 333--342.

De Cesare, D.; Jacquot, S.; Hanauer, A. & Sassone-Corsi, P. (1998), 'Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(21), 12202--12207.

Devineni, A. V. & Heberlein, U. (2013), 'The evolution of *Drosophila melanogaster* as a model for alcohol research', *Annual Review of Neuroscience* 36(1), 121--138.

Diagana, T. T.; Thomas, U.; Prokopenko, S. N.; Xiao, B.; Worley, P. F. & Thomas, J. B. (2002), 'Mutation of *Drosophila homer* disrupts control of locomotor activity and behavioral plasticity', *The Journal of Neuroscience* 22(2), 428--436.

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(1-2), 95--98.

Dietzl, G.; Chen, D.; Schnorrer, F.; Su, K.-C.; Barinova, Y.; Fellner, M.; Gasser, B.; Kinsey, K.; Oettel, S.; Scheiblauer, S.; Couto, A.; Marra, V.; Keleman, K. & Dickson, B. J. (2007), 'A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*', *Nature* 448(7150), 151--156.

Donlea, J. M.; Ramanan, N. & Shaw, P. J. (2009), 'Use-dependent plasticity in clock neurons regulates sleep need in *Drosophila*', *Science* 324(5923), 105--108.

Donlea, J.; Pimentel, D. & Miesenböck, G. (2014), 'Neuronal machinery of sleep homeostasis in *Drosophila*', *Neuron* 81(4), 860--872.

Dopie, J.; Skarp, K.-P.; Kaisa Rajakylä, E.; Tanhuanpää, K. & Vartiainen, M. K. (2012), 'Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(9), E544--E552.

Dudai, Y.; Jan, Y.; Byers, D.; Quinn, W. & Benzer, S. (1976), '*Dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1684--1688.

Dudai, Y. (2002), 'Molecular bases of long-term memories: A question of persistence', *Current Opinion in Neurobiology* 12(2), 211--216.

el Jundi, B.; Pfeiffer, K.; Heinze, S. & Homberg, U. (2014), 'Integration of polarization and chromatic cues in the insect sky compass', *Journal of Comparative Physiology. A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 200(6), 575--589.

Edwards, A. S. & Scott, J. D. (2000), 'A-kinase anchoring proteins: Protein kinase A and beyond', *Current Opinion in Cell Biology* 12(2), 217--221.

Fahrbach, S. E. (2006), 'Structure of the mushroom bodies of the insect brain', *Annual Review of Entomology* 51(1), 209--232.

Foucaud, J.; Burns, J. G. & Mery, F. (2010), 'Use of spatial information and search strategies in a water maze analog in *Drosophila melanogaster*', *PLoS ONE* 5(12), e15231.

Fropf, R.; Tubon Jr., T. C. & Yin, J. C. (2013), 'Nuclear gating of a *Drosophila* dCREB2 activator is involved in memory formation', *Neurobiology of Learning and Memory* 106(0), 258--267.

Fuse, M. & Truman, J. W. (2002), 'Modulation of ecdysis in the moth *Manduca sexta*: the roles of the suboesophageal and thoracic ganglia', *The Journal of Experimental Biology* 205(8), 1047--1058.

Gage, S. L.; Daly, K. C. & Nighorn, A. (2013), 'Nitric oxide affects short-term olfactory memory in the antennal lobe of *Manduca sexta*', *The Journal of Experimental Biology* 216(17), 3294--3300.

Gallo, E. F. & Iadecola, C. (2011), 'Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase', *The Journal of Neuroscience* 31(19), 6947--6955.

Ganguly, A. & Lee, D. (2013), 'Suppression of inhibitory GABAergic transmission by cAMP signaling pathway: Alterations in learning and memory mutants', *The European Journal of Neuroscience* 37(9), 1383--1393.

Garthwaite, J. (2005), 'Dynamics of cellular NO-cGMP signaling', *Frontiers in Bioscience* 10, 1868--1880.

Garthwaite, J. (2008), 'Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission', *The European Journal of Neuroscience* 27(11), 2783--2802.

Gibbs, S. M. & Truman, J. W. (1998), 'Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*', *Neuron* 20(1), 83--93.

Gibbs, S. M.; Becker, A.; Hardy, R. W. & Truman, J. W. (2001), 'Soluble guanylate cyclase is required during development for visual system function in *Drosophila*', *The Journal of Neuroscience* 21(19), 7705--7714.

Gioia, A. & Zars, T. (2009), 'Thermotolerance and place memory in adult *Drosophila* are independent of natural variation at the *foraging* locus.', *Journal of Comparative Physiology. A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 195(8), 777--782.

Godenschwege, T. A.; Reisch, D.; Diegelmann, S.; Eberle, K.; Funk, N.; Heisenberg, M.; Hoppe, V.; Hoppe, J.; Klagges, B. R. E.; Martin, J.-R.; Nikitina, E. A.; Putz, G.; Reifegerste, R.; Reisch, N.; Rister, J.; Schaupp, M.; Scholz, H.; Schwärzel, M.; Werner, U.; Zars, T. D.; Buchner, S. & Buchner, E. (2004), 'Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour', *The European Journal of Neuroscience* 20(3), 611--622.

Gordon, M. D. & Scott, K. (2009), 'Motor control in a *Drosophila* taste circuit', *Neuron* 61(3), 373--384.

Götz, K. G. (1980), 'Optomotorische Untersuchung des visuellen Systems einiger Augenmutanten der Fruchtfliege *Drosophila*', *Biological Cybernetics* 2(2), 77--92.

Greengard, P.; Valtorta, F.; Czernik, A. J. & Benfenati, F. (1993), 'Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function', *Science* 259(5), 780-785.

Güven-Ozkan, T. & Davis, R. L. (2014), 'Functional neuroanatomy of *Drosophila* olfactory memory formation', *Learning & Memory* 21(10), 519--526.

Häcker, U.; Nystedt, S.; Barmchi, M. P.; Horn, C. & Wimmer, E. A. (2003), 'piggyBac-based insertional mutagenesis in the presence of stably integrated P elements in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(13), 7720--7725.

Han, Z.; Li, X.; Wu, J. & Olson, E. N. (2004), 'A myocardin-related transcription factor regulates activity of serum response factor in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(34), 12567--12572.

Hanesch, U. (1986), 'Der Zentralkomplex von *Drosophila melanogaster*', Dissertation, Universität Würzburg.

Hanesch, U.; Fischbach, K. F. & Heisenberg, M. (1989), 'Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*', *Cell and Tissue Research* 257(2), 343--366.

- Hardingham, N.; Dachtler, J. & Fox, K. (2013), 'The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis', *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7.
- Hartmann, G. & Wehner, R. (1995), 'The ant's path integration system: A neural architecture', *Biological Cybernetics* 73(6), 483-497.
- Heinze, S. & Homberg, U. (2007), 'Maplike representation of celestial E-vector orientations in the brain of an insect', *Science* 315(5814), 995--997.
- Heinze, S. & Reppert, S. M. (2011), 'Sun compass integration of skylight cues in migratory monarch butterflies', *Neuron* 69(2), 345--358.
- Heisenberg, M.; Borst, A.; Wagner, S. & Byers, D. (1985), '*Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning', *Journal of Neurogenetics* 2(1), 1--30.
- Hilfiker, S.; Pieribone, V. A.; Czernik, A. J.; Kao, H. T.; Augustine, G. J. & Greengard, P. (1999), 'Synapsins as regulators of neurotransmitter release', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 354(1381), 269--279.
- Hölscher, C.; McGlinchey, L.; Anwyl, R. & Rowan, M. J. (1996), '7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat', *Learning & Memory* 2(6), 267--278.
- 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*', *Journal of Comparative Neurology* 462(4), 415--430.
- Hopper, R. A. & Garthwaite, J. (2006), 'Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation', *The Journal of Neuroscience* 26(45), 11513--11521.
- Horiuchi, J.; Yamazaki, D.; Naganos, S.; Aigaki, T. & Saitoe, M. (2008), 'Protein kinase A inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(52), 20976--20981.
- Hosaka, M.; Hammer, R. E. & Südhof, T. C. (1999), 'A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles', *Neuron* 24(2), 377--387.
- Hou, Q.; Jiang, H.; Zhang, X.; Guo, C.; Huang, B.; Wang, P.; Wang, T.; Wu, K.; Li, J.; Gong, Z.; Du, L.; Liu, Y.; Liu, L. & Chen, C. (2011), 'Nitric oxide metabolism controlled by *formaldehyde dehydrogenase (fdh*, homolog of mammalian GSNOR) plays a crucial role in visual pattern memory in *Drosophila*', *Nitric Oxide* 24(1), 17--24.
- Huang, C.-C.; Chan, S. H. H. & Hsu, K.-S. (2003), 'cGMP/protein kinase G-dependent potentiation of glutamatergic transmission induced by nitric oxide in immature rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro', *Molecular Pharmacology* 64(2), 521--532.
- Huang, E. P. (1997), 'Synaptic plasticity: A role for nitric oxide in LTP', *Current Biology* 7(3), R141--R143.

Humeau, Y.; Doussau, F.; Vitiello, F.; Greengard, P.; Benfenati, F. & Poulain, B. (2001), 'Synapsin controls both reserve and releasable synaptic vesicle pools during neuronal activity and short-term plasticity in *Aplysia*', *The Journal of Neuroscience* 21(12), 4195--4206.

Iijima-Ando, K.; Wu, P.; Drier, E. A.; Iijima, K. & Yin, J. C. P. (2005), 'cAMP-response element-binding protein and heat-shock protein 70 additively suppress polyglutamine-mediated toxicity in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(29), 10261--10266.

Ito, K.; Awano, W.; Suzuki, K.; Hiromi, Y. & Yamamoto, D. (1997), 'The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells', *Development* 124(4), 761--771.

Ito, K.; Shinomiya, K.; Ito, M.; Armstrong, J.; Boyan, G.; Hartenstein, V.; Harzsch, S.; Heisenberg, M.; Homberg, U.; Jenett, A.; Keshishian, H.; Restifo, L.; Rössler, W.; Simpson, J.; Strausfeld, N.; Strauss, R. & Vosshall, L. (2014), 'A systematic nomenclature for the insect brain', *Neuron* 81(4), 755--765.

Jenett, A.; Rubin, G.; Ngo, T.-T.; Shepherd, D.; Murphy, C.; Dionne, H.; Pfeiffer, B.; Cavallaro, A.; Hall, D.; Jeter, J.; Iyer, N.; Fetter, D.; Hausenfluck, J.; Peng, H.; Trautman, E.; Svirskas, R.; Myers, E.; Iwinski, Z.; Aso, Y.; DePasquale, G.; Enos, A.; Hulamm, P.; Lam, S.; Li, H.-H.; Laverly, T.; Long, F.; Qu, L.; Murphy, S.; Rokicki, K.; Safford, T.; Shaw, K.; Simpson, J.; Sowell, A.; Tae, S.; Yu, Y. & Zugates, C. (2012), 'A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology', *Cell Reports* 2(4), 991--1001.

Johannessen, M.; Delghandi, M. P. & Moens, U. (2004), 'What turns CREB on?', *Cellular Signalling* 16(11), 1211--1227.

Joiner, W. J.; Crocker, A.; White, B. H. & Sehgal, A. (2006), 'Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies', *Nature* 441(7094), 757--760.

Kabil, H.; Kabil, O.; Banerjee, R.; Harshman, L. G. & Pletcher, S. D. (2011), 'Increased transsulfuration mediates longevity and dietary restriction in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(40), 16831--16836.

Kahsai, L. & Winther, A. M. (2011), 'Chemical neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: Distribution of multiple neuropeptides in relation to neurotransmitters', *Journal of Comparative Neurology* 519(2), 290--315.

Kahsai, L. & Zars, T. (2011), 'Learning and memory in *Drosophila*: Behavior, genetics, and neural systems', *International Review of Neurobiology* Volume 99, 139--167.

Kalderon, D. & Rubin, G. M. (1988), 'Isolation and characterization of *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase genes', *Genes & Development* 2(12a), 1539--1556.

Kandel, E. R. (2001), 'The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses', *Science* 294(5544), 1030--1038.

- Kandel, E.; Dudai, Y. & Mayford, M. (2014), 'The molecular and systems biology of memory', *Cell* 157(1), 163--186.
- Kaun, K. R.; Hendel, T.; Gerber, B. & Sokolowski, M. B. (2007), 'Natural variation in *Drosophila* larval reward learning and memory due to a cGMP-dependent protein kinase', *Learning & Memory* 14(5), 342--349.
- Kim, M.; Lee, J. H.; Koh, H.; Lee, S. Y.; Jang, C.; Chung, C. J.; Sung, J. H.; Blenis, J. & Chung, J. (2006), 'Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during *Drosophila* development', *The EMBO Journal* 25(13), 3056--3067.
- Kimura, H. (2010), 'Hydrogen sulfide: From brain to gut', *Antioxidants & Redox Signaling* 12(9), 1111--1123.
- Kimura, H. (2013), 'Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system', *Neurochemistry International* 63(5), 492--497.
- Kirchner, L.; Weitzdoerfer, R.; Hoeger, H.; Url, A.; Schmidt, P.; Engelmann, M.; Villar, S. R.; Fountoulakis, M.; Lubec, G. & Lubec, B. (2004), 'Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements', *Nitric Oxide* 11(4), 316--330.
- Kitamoto, T. (2001), 'Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive *shibire* allele in defined neurons', *Journal of Neurobiology* 47(2), 81--92.
- Klagges, B. R.; Heimbeck, G.; Godenschwege, T. A.; Hofbauer, A.; Pflugfelder, G. O.; Reifegerste, R.; Reisch, D.; Schaupp, M.; Buchner, S. & Buchner, E. (1996), 'Invertebrate synapsins: A single gene codes for several isoforms in *Drosophila*', *The Journal of Neuroscience* 16(10), 3154--3165.
- Klapoetke, N. C.; Murata, Y.; Kim, S. S.; Pulver, S. R.; Birdsey-Benson, A.; Cho, Y. K.; Morimoto, T. K.; Chuong, A. S.; Carpenter, E. J.; Tian, Z.; Wang, J.; Xie, Y.; Yan, Z.; Zhang, Y.; Chow, B. Y.; Surek, B.; Melkonian, M.; Jayaraman, V.; Constantine-Paton, M.; Wong, G. K.-S. & Boyden, E. S. (2014), 'Independent optical excitation of distinct neural populations', *Nature Methods* 11(3), 338--346.
- Klyachko, V. A.; Ahern, G. P. & Jackson, M. B. (2001), 'cGMP-mediated facilitation in nerve terminals by enhancement of the spike afterhyperpolarization', *Neuron* 31(6), 1015--1025.
- Knöll, B. (2010), 'Actin-mediated gene expression in neurons: The MRTF-SRF connection', *Biological Chemistry* 391, 591--597.
- Kombian, S. B.; Reiffenstein, R. J. & Colmers, W. F. (1993), 'The actions of hydrogen sulfide on dorsal raphe serotonergic neurons in vitro', *Journal of Neurophysiology* 70(1), 81--96.
- Kosakai, K.; Tsujiuchi, Y. & Yoshino, M. (2015), 'Nitric oxide augments single Ca²⁺ channel currents via cGMP-dependent protein kinase in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket brain', *Journal of Insect Physiology* 78, 26--32.

- Koutmos, M.; Kabil, O.; Smith, J. L. & Banerjee, R. (2010), 'Structural basis for substrate activation and regulation by cystathionine beta-synthase (CBS) domains in cystathionine β -synthase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(49), 20958--20963.
- Krause, T. (2015), 'Physiologie eines erlernten Körpermodells bei *Drosophila melanogaster*', Dissertation, Universität Mainz.
- Kropff, E.; Carmichael, J. E.; Moser, M.-B. & Moser, E. I. (2015), 'Speed cells in the medial entorhinal cortex', *Nature* 523(7561), 419--424.
- Kuntz, S. (2010), 'Proteinkinase G beeinflusst visuelles Orientierungsgedächtnis und motorisches Lernen bei *Drosophila melanogaster*', Diplomarbeit, Universität Mainz.
- Kuntz, S.; Poeck, B.; Sokolowski, M. B. & Strauss, R. (2012), 'The visual orientation memory of *Drosophila* requires Foraging (PKG) upstream of Ignorant (RSK2) in ring neurons of the central complex', *Learning & Memory* 19(8), 337--340.
- Kuromi, H. & Kidokoro, Y. (2000), 'Tetanic stimulation recruits vesicles from reserve pool via a cAMP-mediated process in *Drosophila* synapses', *Neuron* 27(1), 133--143.
- Lai, S.-L. & Lee, T. (2006), 'Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*', *Nature Neuroscience* 9(5), 703--709.
- Lalotra, D. (2014), 'Genetische Analyse des PKA Signalweges für ein Arbeitsgedächtnis von *Drosophila* mittels Enhancer/Suppressor Durchmusterung', Masterarbeit, Universität Mainz.
- Lane, M. & Kalderon, D. (1993), 'Genetic investigation of cAMP-dependent protein kinase function in *Drosophila* development', *Genes & Development* 7(7A), 1229--1243.
- Lee, T. & Luo, L. (1999), 'Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis', *Neuron* 22(3), 451--461.
- Lin, C.-Y.; Chuang, C.-C.; Hua, T.-E.; Chen, C.-C.; Dickson, B.; Greenspan, R. & Chiang, A.-S. (2013), 'A comprehensive wiring diagram of the protocerebral bridge for visual information processing in the *Drosophila* brain', *Cell Reports* 3(5), 1739--1753.
- Liu, L.; Wolf, R.; Ernst, R. & Heisenberg, M. (1999), 'Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies', *Nature* 400(6746), 753--756.
- 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(7076), 551--556.
- Livingstone, M. S.; Sziber, P. P. & Quinn, W. G. (1984), 'Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* learning mutant', *Cell* 37(1), 205--215.

Lominac, K. D.; Oleson, E. B.; Pava, M.; Klugmann, M.; Schwarz, M. K.; Seeburg, P. H.; During, M. J.; Worley, P. F.; Kalivas, P. W. & Szumlanski, K. K. (2005), 'Distinct roles for different Homer1 isoforms in behaviors and associated prefrontal cortex function', *The Journal of Neuroscience* 25(50), 11586--11594.

Luan, H.; Peabody, N. C.; Vinson, C. & White, B. H. (2006), 'Refined spatial manipulation of neuronal function by combinatorial restriction of transgene expression', *Neuron* 52(3), 425--436.

Ma, W. J.; Husain, M. & Bays, P. M. (2014), 'Changing concepts of working memory', *Nature Neuroscience* 17(3), 347--356.

Majlessi, N.; Choopani, S.; Bozorgmehr, T. & Azizi, Z. (2008), 'Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat', *Neurobiology of Learning and Memory* 90(2), 413--419.

Martin, J.-R.; Ernst, R. & Heisenberg, M. (1998), 'Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*', *Learning & Memory* 5(1), 179--191.

Martín-Peña, A.; Acebes, A.; Rodríguez, J.-R.; Chevalier, V.; Casas-Tinto, S.; Triphan, T.; Strauss, R. & Ferrús, A. (2014), 'Cell types and coincident synapses in the ellipsoid body of *Drosophila*', *The European Journal of Neuroscience* 39(10), 1586--1601.

Masse, N. Y.; Turner, G. C. & Jefferis, G. S. (2009), 'Olfactory information processing in *Drosophila*', *Current Biology* 19(16), R700--R713.

Matsumoto, Y.; Hirashima, D.; Terao, K. & Mizunami, M. (2013), 'Roles of NO signaling in long-term memory formation in visual learning in an insect', *PLoS ONE* 8(7), e68538.

McBride, S. M.; Giuliani, G.; Choi, C.; Krause, P.; Correale, D.; Watson, K.; Baker, G. & Siwicki, K. K. (1999), 'Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*', *Neuron* 24(4), 967--977.

McGuire, S. E.; Le, P. T.; Osborn, A. J.; Matsumoto, K. & Davis, R. L. (2003), 'Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*', *Science* 302(5651), 1765--1768.

McGuire, S. E.; Deshazer, M. & Davis, R. L. (2005), 'Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*', *Progress in Neurobiology* 76(5), 328--347.

Menzel, R.; De Marco, R. & Greggers, U. (2006), 'Spatial memory, navigation and dance behaviour in *Apis mellifera*', *Journal of Comparative Physiology. A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 192(9), 889--903.

Mery, F.; Belay, A. T.; So, A. K.-C.; Sokolowski, M. B. & Kawecki, T. J. (2007), 'Natural polymorphism affecting learning and memory in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(32), 13051--13055.

- Michels, B.; Diegelmann, S.; Tanimoto, H.; Schwenkert, I.; Buchner, E. & Gerber, B. (2005), 'A role for Synapsin in associative learning: The *Drosophila* larva as a study case', *Learning & Memory* 12(3), 224--231.
- Mir, S.; Sen, T. & Sen, N. (2014), 'Cytokine-induced GAPDH sulfhydration affects PSD95 degradation and memory', *Molecular Cell* (56), 1--10.
- Miyashita, T.; Oda, Y.; Horiuchi, J.; Yin, J.; Morimoto, T. & Saitoe, M. (2012), ' Mg^{2+} block of *Drosophila* NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression', *Neuron* 74(5), 887--898.
- Moore, M. S.; DeZazzo, J.; Luk, A. Y.; Tully, T.; Singh, C. M. & Heberlein, U. (1998), 'Ethanol intoxication in *Drosophila*: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway', *Cell* 93(6), 997--1007.
- Morris, R. (1984), 'Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat', *The Journal of Neuroscience Methods* 11(1), 47--60.
- Moser, E. I.; Roudi, Y.; Witter, M. P.; Kentros, C.; Bonhoeffer, T. & Moser, M.-B. (2014), 'Grid cells and cortical representation', *Nature Reviews Neuroscience* 15(7), 466--481.
- Mronz, M. (2004), 'Die visuell motivierte Objektwahl laufender Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) - Verhaltensphysiologie, Modellbildung und Implementierung in einem Roboter', Dissertation, Universität Würzburg.
- Müller, U. (1996), 'Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*', *Neuron* 16(3), 541--549.
- Müller, Werner A und Frings, S. u. M. F. (2015), *Tier- und Humanphysiologie: Eine Einführung*, Vol. 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Neuser, K.; Triphan, T.; Mronz, M.; Poeck, B. & Strauss, R. (2008), 'Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*', *Nature* 453(7199), 1244--1247.
- Neuser, K. (2012), 'Neuronale Netzwerke des Zentralkomplexes und ein räumliches Arbeitsgedächtnis von *Drosophila melanogaster*', Dissertation, Universität Mainz.
- Ni, J.-Q.; Markstein, M.; Binari, R.; Pfeiffer, B.; Liu, L.-P.; Villalta, C.; Booker, M.; Perkins, L. & Perrimon, N. (2008), 'Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*', *Nature Methods* 5(1), 49--51.
- Nitabach, M. N.; Wu, Y.; Sheeba, V.; Lemon, W. C.; Strumbos, J.; Zelensky, P. K.; White, B. H. & Holmes, T. C. (2006), 'Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods', *The Journal of Neuroscience* 26(2), 479--489.

O'Dell, T. J.; Hawkins, R. D.; Kandel, E. R. & Arancio, O. (1991), 'Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(24), 11285--11289.

Ofstad, T. A.; Zuker, C. S. & Reiser, M. B. (2011), 'Visual place learning in *Drosophila melanogaster*', *Nature* 474(7350), 204--207.

Osborne, K. A.; Robichon, A.; Burgess, E.; Butland, S.; Shaw, R. A.; Coulthard, A.; Pereira, H. S.; Greenspan, R. J. & Sokolowski, M. B. (1997), 'Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*', *Science* 277(5327), 834--836.

Otsuna, H. & Ito, K. (2006), 'Systematic analysis of the visual projection neurons of *Drosophila melanogaster*. I. Lobula-specific pathways', *Journal of Comparative Neurology* 497(6), 928--958.

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', *Learning & Memory* 16(5), 289--295.

Paradis, S.; Sweeney, S. T. & Davis, G. W. (2001), 'Homeostatic control of presynaptic release is triggered by postsynaptic membrane depolarization', *Neuron* 30(3), 737--749.

Paul, B. D. & Snyder, S. H. (2012), 'H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(8), 499--507.

Paul, B. D.; Sbodio, J. I.; Xu, R.; Vandiver, M. S.; Cha, J. Y.; Snowman, A. M. & Snyder, S. H. (2014), 'Cystathionine γ -lyase deficiency mediates neurodegeneration in Huntington's disease', *Nature* 509(7498), 96--100.

Perazzona, B.; Isabel, G.; Preat, T. & Davis, R. L. (2004), 'The role of cAMP response element-binding protein in *Drosophila* long-term memory', *The Journal of Neuroscience* 24(40), 8823--8828.

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', *Journal of Comparative Neurology* 519(4), 661--689.

Pereira, P. M.; Schneider, A.; Pannetier, S.; Heron, D. & Hanauer, A. (2009), 'Coffin-Lowry syndrome', *European Journal of Human Genetics* 18(6), 627--633.

Perisse, E.; Yin, Y.; Lin, A.; Lin, S.; Huetteroth, W. & Waddell, S. (2013), 'Different kenyon cell populations drive learned approach and avoidance in *Drosophila*', *Neuron* 79(5), 945--956.

Pfeiffer, B. D.; Ngo, T.-T. B.; Hibbard, K. L.; Murphy, C.; Jenett, A.; Truman, J. W. & Rubin, G. M. (2010), 'Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*', *Genetics* 186(2), 735--755.

- Pitman, J. L.; McGill, J. J.; Keegan, K. P. & Allada, R. (2006), 'A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*', *Nature* 441(7094), 753--756.
- Poeck, B.; Triphan, T.; Neuser, K. & Strauss, R. (2008), 'Locomotor control by the central complex in *Drosophila* - An analysis of the *tay bridge* mutant', *Developmental Neurobiology* 68(8), 1046--1058.
- Poirier, R.; Jacquot, S.; Vaillend, C.; Southiphong, A.; Libbey, M.; Davis, S.; Laroche, S.; Hanauer, A.; Welzl, H.; Lipp, H.-P. & Wolfer, D. (2007), 'Deletion of the Coffin - Lowry syndrome gene *Rsk2* in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior', *Behavior Genetics* 37(1), 31--50.
- Power, M. E. (1943), 'The brain of *Drosophila melanogaster*', *Journal of Morphology* 72(3), 517--559.
- Putz, G. & Heisenberg, M. (2002), 'Memories in *Drosophila* heat-box learning', *Learning & Memory* 9(5), 349--359.
- Putz, G.; Bertolucci, F.; Raabe, T.; Zars, T. & Heisenberg, M. (2004), 'The *S6KII* (*rsk*) gene of *Drosophila melanogaster* differentially affects an operant and a classical learning task', *The Journal of Neuroscience* 24(44), 9745--9751.
- Regulski, M. & Tully, T. (1995), 'Molecular and biochemical characterization of dNOS: a *Drosophila* Ca^{2+} calmodulin-dependent nitric oxide synthase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(20), 9072--9076.
- Renn, S. C. P.; Armstrong, J. D.; Yang, M.; Wang, Z.; An, X.; Kaiser, K. & Taghert, P. H. (1999), 'Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: Organization and development of the central complex', *Journal of Neurobiology* 41(2), 189--207.
- Rintelen, F.; Stocker, H.; Thomas, G. & Hafen, E. (2001), 'PDK1 regulates growth through Akt and S6K in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(26), 15020--15025.
- Rolls, M. M.; Satoh, D.; Clyne, P. J.; Henner, A. L.; Uemura, T. & Doe, C. Q. (2007), 'Polarity and intracellular compartmentalization of *Drosophila* neurons', *Neural Development* 2, 7--7.
- Rosenzweig, M.; Brennan, K. M.; Tayler, T. D.; Phelps, P. O.; Patapoutian, A. & Garrity, P. A. (2005), 'The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis', *Genes & Development* 19(4), 419--424.
- Ryder, E.; Blows, F.; Ashburner, M.; Bautista-Llacer, R.; Coulson, D. et al. (2004), 'The DrosDel collection: A set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*', *Genetics* 167(2), 797--813.
- Sadanandappa, M. K.; Redondo, B. B.; Michels, B.; Rodrigues, V.; Gerber, B.; VijayRaghavan, K.; Buchner, E. & Ramaswami, M. (2013), 'Synapsin function in GABA-ergic interneurons is required for short-term olfactory habituation', *The Journal of Neuroscience* 33(42), 16576--16585.

- Sagi, Y.; Heiman, M.; Peterson, J. D.; Musatov, S.; Scarduzio, M.; Logan, S. M.; Kaplitt, M. G.; Surmeier, D. J.; Heintz, N. & Greengard, P. (2014), 'Nitric oxide regulates synaptic transmission between spiny projection neurons', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(49), 17636--17641.
- Salvany, L.; Muller, J.; Guccione, E. & Rørth, P. (2014), 'The core and conserved role of MAL is homeostatic regulation of actin levels', *Genes & Development* 28(10), 1048--1053.
- dos Santos, G.; Schroeder, A. J.; Goodman, J. L.; Strelets, V. B.; Crosby, M. A.; Thurmond, J.; Emmert, D. B.; Gelbart, W. M. & the FlyBase Consortium (2014), 'FlyBase: Introduction of the *Drosophila melanogaster* Release 6 reference genome assembly and large-scale migration of genome annotations', *Nucleic Acids Research* 43(Database issue), D690--D697.
- Schiff, M. & Blom, H. J. (2012), 'Treatment of inherited homocystinurias', *Neuropediatrics* 43(06), 295-304.
- Schneider, S. (2015), 'Genetische Analyse zur Rolle von Kationenkanälen beim Arbeitsgedächtnis von *Drosophila melanogaster*', Diplomarbeit, Universität Mainz.
- Schuman, E. & Madison, D. (1991), 'A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation', *Science* 254(5037), 1503--1506.
- Schuster, S.; Strauss, R. & Götz, K. G. (2002), 'Virtual-reality techniques resolve the visual cues used by fruit flies to evaluate object distances', *Current Biology* 12(18), 1591--1594.
- Seelig, J. D.; Chiappe, M. E.; Lott, G. K.; Dutta, A.; Osborne, J. E.; Reiser, M. B. & Jayaraman, V. (2010), 'Two-photon calcium imaging from head-fixed *Drosophila* during optomotor walking behavior', *Nature Methods* 7(7), 535--540.
- Seelig, J. D. & Jayaraman, V. (2013), 'Feature detection and orientation tuning in the *Drosophila* central complex', *Nature* 503(7475), 262--266.
- Seelig, J. D. & Jayaraman, V. (2015), 'Neural dynamics for landmark orientation and angular path integration', *Nature* 521(7551), 186--191.
- Seyffert, W. (2003), *Lehrbuch der Genetik*, Spektrum-Verlag, Heidelberg Berlin.
- Shorter, J.; Couch, C.; Huang, W.; Carbone, M. A.; Peiffer, J.; Anholt, R. R. H. & Mackay, T. F. C. (2015), 'Genetic architecture of natural variation in *Drosophila melanogaster* aggressive behavior', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(27), E3555--E3563.
- Silva, A. J.; Giese, K. P.; Fedorov, N. B.; Frankland, P. W. & Kogan, J. H. (1998), 'Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning', *Neurobiology of Learning and Memory* 70(1-2), 44--61.

Sivanantharajah, L. & Zhang, B. (2015), 'Current techniques for high-resolution mapping of behavioral circuits in *Drosophila*', *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 201(9), 895--909.

Somogyi, K. & Rørth, P. (2004), 'Evidence for tension-based regulation of *Drosophila* MAL and SRF during invasive cell migration', *Developmental Cell* 7(1), 85--93.

Strauss, R. & Heisenberg, M. (1993), 'A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain', *The Journal of Neuroscience* 13(5), 1852--1861.

Strauss, R.; Schuster, S. & Gotz, K. (1997), 'Processing of artificial visual feedback in the walking fruit fly *Drosophila melanogaster*', *The Journal of Experimental Biology* 200(9), 1281--1296.

Strauss, R. & Pichler, J. (1998), 'Persistence of orientation toward a temporarily invisible landmark in *Drosophila melanogaster*', *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 182(4), Springer Berlin/Heidelberg, 411--423.

Strauss, R. (2002), 'The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour', *Current Opinion in Neurobiology* 12(6), 633--638.

Stüven, T.; Hartmann, E. & Görlich, D. (2003), 'Exportin 6: A novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes', *The EMBO Journal* 22(21), 5928--5940.

Sun, Q.; Collins, R.; Huang, S.; Holmberg-Schiavone, L.; Anand, G. S.; Tan, C.-H.; van-den Berg, S.; Deng, L.-W.; Moore, P. K.; Karlberg, T. & Sivaraman, J. (2009), 'Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine γ -lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S', *Journal of Biological Chemistry* 284(5), 3076--3085.

Suzuki, A.; Fukushima, H.; Mukawa, T.; Toyoda, H.; Wu, L.-J.; Zhao, M.-G.; Xu, H.; Shang, Y.; Endoh, K.; Iwamoto, T.; Mamiya, N.; Okano, E.; Hasegawa, S.; Mercaldo, V.; Zhang, Y.; Maeda, R.; Ohta, M.; Josselyn, S. A.; Zhuo, M. & Kida, S. (2011), 'Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory', *The Journal of Neuroscience* 31(24), 8786--8802.

Sweatt, J. D. (2001), 'The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory', *Journal of Neurochemistry* 76(1), 1--10.

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(2), 341--351.

Sykiotis, G. P.; Habeos, I. G.; Samuelson, A. V. & Bohmann, D. (2011), 'The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation', *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 14(1), 41--48.

- Tang, S. & Guo, A. (2001), 'Choice behavior of *Drosophila* facing contradictory visual cues', *Science* 294(5546), 1543--1547.
- Tempel, B. L.; Bonini, N.; Dawson, D. R. & Quinn, W. G. (1983), 'Reward learning in normal and mutant *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(5), 1482--1486.
- Thomas, G. M. & Huganir, R. L. (2004), 'MAPK cascade signalling and synaptic plasticity', *Nature Reviews Neuroscience* 5(3), 173--183.
- Thran, J. (2013), 'Ein räumliches Orientierungsgedächtnis im Zentralkomplex von *Drosophila melanogaster* und die spezifische Rolle von *ellipsoid-body-open*', Dissertation, Universität Mainz.
- Thran, J.; Poeck, B. & Strauss, R. (2013), 'Serum response factor-mediated gene regulation in a *Drosophila* visual working memory', *Current Biology* 23(18), 1756--1763.
- Torroja, L.; Chu, H.; Kotovsky, I. & White, K. (1999), 'Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport', *Current Biology* 9(9), 489--493.
- Trinh, K.; Moore, K.; Wes, P. D.; Muchowski, P. J.; Dey, J.; Andrews, L. & Pallanck, L. J. (2008), 'Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in *Drosophila* models of parkinson's disease', *The Journal of Neuroscience* 28(2), 465--472.
- Triphan, T.; Poeck, B.; Neuser, K. & Strauss, R. (2010), 'Visual targeting of motor actions in climbing *Drosophila*', *Current Biology* 20(7), 663--668.
- Tu, J. C.; Xiao, B.; Yuan, J. P.; Lanahan, A. A.; Leoffert, K.; Li, M.; Linden, D. J. & Worley, P. F. (1998), 'Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors', *Neuron* 21(4), 717--726.
- Tully, T. & Quinn, W. (1985), 'Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*', *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 157(2), 263--277.
- Urizar, N. L.; Yang, Z.; Edenberg, H. J. & Davis, R. L. (2007), '*Drosophila* Homer is required in a small set of neurons including the ellipsoid body for normal ethanol sensitivity and tolerance', *The Journal of Neuroscience* 27(17), 4541--4551.
- Vartiainen, M. K.; Guettler, S.; Larijani, B. & Treisman, R. (2007), 'Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL', *Science* 316(5832), 1749--1752.
- Venken, K. J. & Bellen, H. J. (2014), 'Chemical mutagens, transposons, and transgenes to interrogate gene function in *Drosophila melanogaster*', *Methods* 68(1), 15--28.

Volders, K.; Scholz, S.; Slabbaert, J. R.; Nagel, A. C.; Verstreken, P.; Creemers, J. W. M.; Callaerts, P. & Schwärzel, M. (2012), '*Drosophila rugose* is a functional homolog of mammalian neurobeachin and affects synaptic architecture, brain morphology, and associative learning', *The Journal of Neuroscience* 32(43), 15193--15204.

von Holst, E. & Mittelstaedt, H. (1950), 'Das Reafferenzprinzip', *Naturwissenschaften* 37(20), 464--476.

Waddell, S. & Quinn, W. G. (2001), 'Flies, genes, and learning.', *Annual Review of Neuroscience* 24, 1283--1309.

Waddell, S. (2013), 'Reinforcement signalling in *Drosophila*; dopamine does it all after all', *Current Opinion in Neurobiology* 23(3), 324--329.

Walkinshaw, E.; Gai, Y.; Farkas, C.; Richter, D.; Nicholas, E.; Keleman, K. & Davis, R. L. (2015), 'Identification of genes that promote or inhibit olfactory memory formation in *Drosophila*', *Genetics* 199(4), 1173--28SI.

Wang, X. & Robinson, P. J. (1997), 'Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system', *Journal of Neurochemistry* 68(2), 443--456.

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*', *Learning & Memory* 15(3), 133--142.

Warencycia, M.; Smith, K.; Blashko, C.; Kombian, S. & Reiffenstein, R. (1989), 'Monoamine oxidase inhibition as a sequel of hydrogen sulfide intoxication: Increases in brain catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels', *Archives Toxicology* 63(2), 131--136.

Wassarman, D. A.; Solomon, N. M. & Rubin, G. M. (1994), 'The *Drosophila melanogaster* ribosomal S6 kinase II-encoding sequence', *Gene* 144(2), 309--310.

Weiß, C. H. (2005), '*Statistica - Eine Einführung*', Regionales Rechenzentrum für Niedersachsen/Universität Hannover und Lehrstuhl für Statistik der Universität Würzburg.

Weitzdoerfer, R.; Hoeger, H.; Engidawork, E.; Engelmann, M.; Singewald, N.; Lubec, G. & Lubec, B. (2004), 'Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance', *Nitric Oxide* 10(3), 130--140.

Wernet, M.; Velez, M.; Clark, D.; Baumann-Klausener, F.; Brown, J.; Klovstad, M.; Labhart, T. & Clandinin, T. (2012), 'Genetic dissection reveals two separate retinal substrates for polarization vision in *Drosophila*', *Current Biology* 22(1), 12--20.

Wolff, T.; Iyer, N. A. & Rubin, G. M. (2015), 'Neuroarchitecture and neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: A GAL4-based dissection of protocerebral bridge neurons and circuits', *Journal of Comparative Neurology* 523(7), 997--1037.

Wu, C.-L.; Xia, S.; Fu, T.-F.; Wang, H.; Chen, Y.-H.; Leong, D.; Chiang, A.-S. & Tully, T. (2007), 'Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body', *Nature Neuroscience* 10(12), 1578--1586.

Wustmann, G.; Rein, K.; Wolf, R. & Heisenberg, M. (1996), 'A new paradigm for operant conditioning of *Drosophila melanogaster*', *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 179(3), 429--436.

Wustmann, G. & Heisenberg, M. (1997), 'Behavioral manipulation of retrieval in a spatial memory task for *Drosophila melanogaster*', *Learning & Memory* 4(4), 328--336.

Xing, J.; Ginty, D. D. & Greenberg, M. E. (1996), 'Coupling of the RAS-MAPK Pathway to Gene Activation by RSK2, a Growth Factor-Regulated CREB Kinase', *Science* 273(5277), 959--963.

Xu, J.; Ren, X.; Sun, J.; Wang, X.; Qiao, H.-H.; Xu, B.-W.; Liu, L.-P. & Ni, J.-Q. (2015), 'A toolkit of CRISPR-based genome editing systems in *Drosophila*', *Journal of Genetics and Genomics* 42(4), 141--149.

Xu, S.; Wilf, R.; Menon, T.; Panikker, P.; Sarthi, J. & Elefant, F. (2014), 'Epigenetic control of learning and memory in *Drosophila* by Tip60 HAT action', *Genetics* 198(4), 1571--1586.

Yakubovich, N.; Silva, E. A. & O'Farrell, P. H. (2010), 'Nitric oxide synthase is not essential for *Drosophila* development', *Current Biology* 20(4), R141--R142.

Yamamoto, D. & Koganezawa, M. (2013), 'Genes and circuits of courtship behaviour in *Drosophila* males', *Nature Reviews Neuroscience* 14(10), 681--692.

Yang, G.; Zhao, K.; Ju, Y.; Mani, S.; Cao, Q.; Puukila, S.; Khaper, N.; Wu, L. & Wang, R. (2012), 'Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulphydration of Keap1 and activation of Nrf2', *Antioxidants & Redox Signaling* 18(15), 1906--1919.

Yin, J. C. & Tully, T. (1996), 'CREB and the formation of long-term memory', *Current Opinion in Neurobiology* 6(2), 264--268.

Young, J. & Armstrong, J. (2010), 'Structure of the adult central complex in *Drosophila*: Organization of distinct neuronal subsets', *Journal of Comparative Neurology* 518(9), 1500--1524.

Yu, D.; Akalal, D.-B. G. & Davis, R. L. (2006), '*Drosophila* α/β mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning', *Neuron* 52(5), 845--855.

Zars, T. (2000), 'Behavioral functions of the insect mushroom bodies', *Current Opinion in Neurobiology* 10(6), 790--795.

Zars, T. (2010), 'Short-term memories in *Drosophila* are governed by general and specific genetic systems', *Learning & Memory* 17(5), 246--251.

Zeyen, L. (2015), 'Genetische Interaktionsanalyse des PKA-Signalweges beim Orientierungsgedächtnis von *Drosophila melanogaster*', Masterarbeit, Universität Mainz.

Zhang, Z.; Li, X.; Guo, J.; Li, Y. & Guo, A. (2013), 'Two clusters of GABAergic ellipsoid body neurons modulate olfactory labile memory in *Drosophila*', *The Journal of Neuroscience* 33(12), 5175--5181.

Zhao, J.; Lu, Y.; Zhao, X.; Yao, X.; Shuai, Y.; Huang, C.; Wang, L.; Jeong, S. & Zhong, Y. (2013), 'Dissociation of *rugose*-dependent short-term memory component from memory consolidation in *Drosophila*', *Genes, Brain, and Behavior* 12(6), 626--632.

Zhu, Y. (2013), 'The *Drosophila* visual system: From neural circuits to behavior', *Celladhesion* 7(1933-6918), 333--344.

Zhuo, M.; Hu, Y.; Schultz, C.; Kandel, E. R. & Hawkins, R. D. (1994), 'Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation', *Nature* 368(6472), 635--639.

Zordan, M. A. & Sandrelli, F. (2015), 'Circadian clock dysfunction and psychiatric disease: Could fruit flies have a say?', *Frontiers in Neurology* 6(80), 1--16.

www.flycircuit.tw

<http://www.fly-trap.org>

stockcenter.vdrc.at

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Repräsentation der prominenten Neuropile im <i>Drosophila</i> Gehirn.....	3
Abb. 2: Aufbau des Zentralkomplexes und des Ellipsoidkörpers.....	5
Abb. 3: Synapsentypen im Ellipsoidkörper.	7
Abb. 4: Modell der klassischen Duftkonditionierung bei <i>Drosophila</i>	10
Abb. 5: <i>ebo</i> vermittelter Transport von Aktin.	16
Abb. 6: Das UAS/GAL4 System.	19
Abb. 7: Aufbau des <i>Detour</i> -Paradigmas.....	28
Abb. 8: Schematischer Versuchsaufbau des <i>Buridan</i> -Paradigmas.....	31
Abb. 9: Orientierungsgedächtnis verschiedener <i>for</i> Allele.....	46
Abb. 10: Die Defizienzlinie Df(2L)ED243 betrifft große Teile des <i>for</i> Locus.	47
Abb. 11: <i>for</i> wird in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers für das Orientierungsgedächtnis benötigt.....	49

Abb. 12: <i>Knock-down</i> des <i>for</i> Genprodukts in den R3 Neuronen.	50
Abb. 13: NOS-Expression im adulten Gehirn von <i>Drosophila</i> und Kolokalisation mit den Ringneuronen.	52
Abb. 14: Vergleich des NOS-Expressionsmusters und einer Population von Kleinfeldneuronen (007Y-GAL4).	53
Abb. 15: Vergleich des NOS-Expressionsmusters und einer Population von Kleinfeldneuronen (VT62856-GAL4).	54
Abb. 16: Histologische Quantifizierung des <i>Nos knock-down</i> Experiments.	55
Abb. 17: Orientierungsgedächtnis der <i>Nos</i> Mutante und <i>knock-down</i> der <i>Nos</i> mRNA.	57
Abb. 18: Vergleich des Expressionsmusters der GAL4-Linie VT202672 (grün) und der beobachteten NOS-Expression (magenta) mit dem Antiserum.	58
Abb. 19: Rettungsexperiment der <i>Nos</i> Mutante.	59
Abb. 20: Pharmakologische Applikation des NOS-Inhibitors L-NNA.	61
Abb. 21: H ₂ S wird für das Orientierungsgedächtnis benötigt.	63
Abb. 22: Schematische Darstellung des zu untersuchenden Signalwegs.	63
Abb. 23: Defizienzlinien für CBS und CSE.	64
Abb. 24: Genetische Interaktion zwischen <i>ebo</i> ⁶⁷⁸ und den Defizienzlinien für CBS und CSE.	65
Abb. 25: Expression der <i>Cbs</i> cDNA in einem <i>ebo</i> mutanten Hintergrund.	66
Abb. 26: Verfütterung der Aminosäure Cystein an die <i>ebo</i> Mutante.	67
Abb. 27: Genetische Interaktion zwischen <i>ebo</i> und <i>Nos</i>	68
Abb. 28: Expression der <i>Nos</i> cDNA in einem <i>ebo</i> mutanten Hintergrund.	69
Abb. 29: Analyse der NOS-Expression in <i>ebo</i> ⁶⁷⁸ Mutanten und heterozygoten <i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X Kontrolltieren.	70
Abb. 30: Ektopische Überexpression von NOS in R2 Neuronen.	72
Abb. 31: <i>Western-Blot</i> Analyse der panneuralen Überexpression von dSRF.	73
Abb. 32: Panneurale Überexpression des Transkriptionskomplexes dSRF/dMRTF führt zu keiner erhöhten NOS-Expression.	74
Abb. 33: Enzymaktivität von CBS und CSE im nativen Gel (8 %).	75
Abb. 34: Analyse der RT-qPCR-Daten nach Überexpression von dSRF/dMRTF (<i>elav</i> GFP > <i>dSrf</i> + <i>dMrtf</i>) im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle (<i>elav</i> GFP).	77
Abb. 35: <i>Western Blot</i> -Analyse nach panneuraler Überexpression von dSRF/dMRTF (<i>elav</i> GFP > <i>dSrf</i> + <i>dMrtf</i>) und der entsprechenden Kontrolle (<i>elav</i> GFP).	78

Abb. 36: Die PDE6 wird in den R3 Neuronen für das Orientierungsgedächtnis benötigt. 80

Abb. 37: Pharmakologische Applikation des PDE6-Inhibitors Zaprinast an *ebo*⁶⁷⁸ und *Nos*⁴¹⁵ Mutanten. 81

Abb. 38: Schematische Darstellung des postulierten Signalweges. 82

Abb. 39: Die sGC wird in den R3 Neuronen für das Orientierungsgedächtnis benötigt. 83

Abb. 40: Die Defizienzlinie Df(3R)BSC547 umfasst den Genlocus für *GCa99B* 84

Abb. 41: Genetische Interaktion zwischen *Nos* und *sGC*, sowie *Nos* und *for*. 85

Abb. 42: Expression der *ign* cDNA in den R3 Neuronen rettet das Orientierungsgedächtnis der *ign*^{58/1} Mutante. 86

Abb. 43: Genetische Interaktion zwischen *for* und *ign*. 87

Abb. 44: Epigenetische Interaktionsstudie zwischen *for* und *ign*. 88

Abb. 45: dCREB ist essentiell für ein funktionsfähiges Orientierungsgedächtnis. 90

Abb. 46: Rettungsexperiment der heterozygoten *CrebB*^{S162} Mutante. 91

Abb. 47: Die Überexpression der *dCrebB* cDNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) rettet den Gedächtnisdefekt der *ign*^{58/1} Mutante. 92

Abb. 48: Rettung des *ebo*⁶⁷⁸ Gedächtnisphänotyps mit Überexpression von IGN und dCREB. 93

Abb. 49: P~CREB-Expressionslevel in CS und *ign*^{58/1} Fliegen. 94

Abb. 50: Schematische Zusammenfassung des postulierten Signalweges. 96

Abb. 51: *homer* als möglicher Kompetenzfaktor. 98

Abb. 52: *homer* wird in den R3 Neuronen für das visuelle Arbeitsgedächtnis benötigt. 99

Abb. 53: Expression der *homer* cDNA in R3 Neuronen (189Y-GAL4) rettet den defekten Gedächtnisphänotyp der transheterozygoten *homer*^{R102}/*homer*^{EP2141} Tiere auf wildtypisches Niveau. 100

Abb. 54: Die *rut* AC wird in den R3 Neuronen für das Orientierungsgedächtnis benötigt. 101

Abb. 55: Die Beteiligung der PKA-Untereinheiten. 102

Abb. 56: Die Ergebnisse der RNAi-Experimente zur Beteiligung der PKA-Untereinheiten kann mit den Mutanten *Pka-C1*^{H2} und *Pka-C3*^{BRL} bestätigt werden. 103

Abb. 57: Genetische Interaktion zwischen *Pka-C1* und *CrebB*^{S162} 104

Abb. 58: *Synapsin* wird für ein funktionsfähiges Orientierungsgedächtnis in R3 Neuronen benötigt. 105

Abb. 59: Genetische Interaktion zwischen *Syn* und *Pka-C1*. 105

Abb. 60: Pharmakologische Applikation des PKA-Inhibitors Rp-cAMPS. 109

Abb. 61: Schematische Darstellung der konzertierten Wirkung von NO und H₂S auf die Aufrechterhaltung eines erhöhten cGMP-Levels in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers. 111

Abb. 62: Modell für den cAMP/PKA-Signalweg im visuellen Orientierungsgedächtnis im Gegensatz zum olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis von *Drosophila*. ... 135

Abb. 63: Übersichtsmodell zur Verarbeitung von visueller Information im Zentral-komplex bei einer laufenden Fliege. 137

Abb. 64: Modell eines Kompassneurons zur Informationsübertragung in einem relativen Positionssystem von *Drosophila*. 141

Abb. 65: Modell eines neuronalen Netzwerkes zur Informationsübertragung in einem visuellen Orientierungsgedächtnis von *Drosophila*. 144

Abb. 66: Validierung der Rekombinante UAS-*dSrf+dMrtf* mit Hilfe einer iPCR. 198

Abb. 67: Validierung der Rekombinaten UAS-*ign ign^{58/1}/FM7a (#24)* mit Hilfe einer PCR. 198

Abb. 68: Validierung der Rekombination von 189Y-GAL4 und *homer^{EP2141}*. 199

Abb. 69: Validierung des *Drosophila*-spezifischen NOS-Antikörpers. 200

Abb. 70: Validierung des Antikörperserums gegen humanes CBS in einer *Western Blot*-Analyse. 201

Abb. 71: Der *Knock-down* der *dCreb* mRNA mit 189Y-GAL4 (R3 Neuronen) führt zu einem Orientierungsgedächtnis von 70 %. 201

Abb. 72: Die Kontrollen der GAL4-Linie EB1 im *ebo⁶⁷⁸* mutanten Hintergrund. 203

Abb. 73: Die Kontrollen der GAL4-Linie 189Y im *ebo⁶⁷⁸* mutanten Hintergrund. 204

Abb. 74: Genetische Interaktion zwischen *Creb^{S162}* und *Nos^{A15}*. 206

Abb. 75: Genetische Interaktion zwischen *Creb^{S162}* und *ebo⁶⁷⁸*. 207

Abb. 76: Genetische Interaktion zwischen *Creb^{S162}* und *tws*, sowie *Pka-C1^{H2}* und *tws*. 208

Abb. 77: Genetische Interaktion zwischen *Nos* und *Mrtf* im *Buridan*-Paradigma. 210

Abb. 78: Genetische Interaktion zwischen *Nos* und *ign* im *Buridan*-Paradigma. 212

7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme mit Angabe der betroffenen Chromosomen, der Bezugsquelle und gegebenenfalls einer Referenz. 23

Tab. 2: Chemikalienliste für die pharmakologische Behandlung..... 29

Tab. 3: Auflistung der primären und sekundären Antikörper, die für die histologischen Präparate verwendet wurden. 32

Tab. 4: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele..... 34

Tab. 5: Auflistung der primären und sekundären Antikörper, die für die immunchemischen Färbungen der *Western Blots* verwendet wurden. 35

Tab. 6: Zusammensetzung der nativen Gele..... 36

Tab. 7: Chemikalienliste für die Durchführung der Aktivitätsbestimmung der Enzyme CBS und CSE. 37

Tab. 8: PCR-Programm für den Nachweis der *ign*^{58/1} Deletion..... 38

Tab. 9: PCR-Programme für die iPCR. 40

Tab. 10: Zusammensetzung der PCR-Reaktionen für die RT-qPCR. 41

Tab. 11: PCR-Programm für die RT-qPCR..... 41

Tab. 12: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer. 41

Tab. 13: Statistische Analyse für Abb. 70 202

Tab. 14: Statistische Analyse für Abb. 71A 203

Tab. 15: Statistische Analyse für Abb. 71B 203

Tab. 16: Statistische Analyse für Abb. 72A 204

Tab. 17: Statistische Analyse für Abb. 72B 205

Tab. 18: Statistische Analyse für Abb. 73 206

Tab. 19: Statistische Analyse für Abb. 74 207

Tab. 20: Statistische Analyse für Abb. 75 208

Tab. 21: Statistische Analyse für Abb. 76A 211

Tab. 22: Statistische Analyse für Abb. 76C 211

Tab. 23: Statistische Analyse für Abb. 77 212

Tab. 24: Statistische Analyse für Abb. 9 213

Tab. 25: Statistische Analyse für Abb. 11A 214

Tab. 26: Statistische Analyse für Abb. 12 215

Tab. 27: Statistische Analyse für Abb. 16B 216

Tab. 28: Statistische Analyse für Abb. 17A 216

Tab. 29: Statistische Analyse für Abb. 17B 217

Tab. 30: Statistische Analyse für Abb. 19 217

Tab. 31: Statistische Analyse für die Abb. 20A. 217

Tab. 32: Statistische Analyse für die Abb. 20B..... 218

Tab. 33: Statistische Analyse für die Abb. 20C..... 218

Tab. 34: Statistische Analyse für die Abb. 20D. 219

Tab. 35: Statistische Analyse für Abb. 21A 219

Tab. 36: Statistische Analyse für Abb. 21B 219

Tab. 37: Statistische Analyse für Abb. 24A 220

Tab. 38: Statistische Analyse für Abb. 24B 220

Tab. 39: Statistische Analyse für Abb. 25 221

Tab. 40: Statistische Analyse für die Abb. 26.. 221

Tab. 41: Statistische Analyse für Abb. 27 222

Tab. 42: Statistische Analyse für Abb. 28 222

Tab. 43: Statistische Analyse für Abb. 29B 223

Tab. 44: Statistische Analyse für Abb. 30; Quantifizierung von R2 Neuronen 223

Tab. 45: Statistische Analyse für Abb. 30; Quantifizierung von $(R2+R3)/R3$ 223

Tab. 46: Statistische Analyse für Abb. 31 223

Tab. 47: Statistische Analyse für Abb. 32 224

Tab. 48: Statistische Analyse für Abb. 33 224

Tab. 49: Statistische Analyse für Abb. 35 224

Tab. 50: Statistische Analyse für Abb. 34. 225

Tab. 51: Statistische Analyse für Abb. 36A 225

Tab. 52: Statistische Analyse für Abb. 36B 225

Tab. 53: Statistische Analyse für Abb. 36C 226

Tab. 54: Statistische Analyse für die Abb. 37A 226

Tab. 55: Statistische Analyse für die Abb. 37B..... 227

Tab. 56: Statistische Analyse für Abb. 39 227

Tab. 57: Statistische Analyse für Abb. 41A 227

Tab. 58: Statistische Analyse für Abb. 41B 228

Tab. 59: Statistische Analyse Abb. 42..... 229

Tab. 60: Statistische Analyse für Abb. 43 230

Tab. 61: Statistische Analyse für Abb. 44A. 230

Tab. 62: Statistische Analyse für Abb. 44B 231

Tab. 63: Statistische Analyse für Abb. 45A 231

Tab. 64: Statistische Analyse für die Abb. 45B.....	232
Tab. 65: Statistische Analyse für Abb. 46	233
Tab. 66: Statistische Analyse für Abb. 47	234
Tab. 67: Statistische Analyse für Abb. 48A	234
Tab. 68: Statistische Analyse für die Abb. 48B.....	234
Tab. 69: Statistische Analyse für Abb. 49B	235
Tab. 70: Statistische Analyse für Abb. 51	235
Tab. 71: Statistische Analyse für Abb. 52A	236
Tab. 72: Statistische Analyse für die Abb. 52B.....	237
Tab. 73: Statistische Analyse für Abb. 53	237
Tab. 74: Statistische Analyse für die Abb. 54..	238
Tab. 75: Statistische Analyse für die Abb. 55A.	238
Tab. 76: Statistische Analyse für die Abb. 55B.....	239
Tab. 77: Statistische Analyse für die Abb. 55C.....	239
Tab. 78: Statistische Analyse für Abb. 56	239
Tab. 79: Statistische Analyse für Abb. 56B	240
Tab. 80: Statistische Analyse für Abb. 57	240
Tab. 81: Statistische Analyse für Abb. 58	241
Tab. 82: Statistische Analyse für Abb. 59	241
Tab. 83: Statistische Analyse für die Abb. 60A.	242
Tab. 84: Statistische Analyse für die Abb. 60B.....	242
Tab. 85: Statistische Analyse für die Abb. 60C.....	242
Tab. 86: Statistische Analyse für die Abb. 60D..	243
Tab. 87: Statistische Analyse für die Abb. 60E.....	243
Tab. 88: Statistische Analyse für die Abb. 60F.....	244

7.4. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
AKAP	<i>A-kinase anchoring protein</i>
ARM	Anästhesie-resistentes Gedächtnis
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BU	Bulb

Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBS	Cystathionin-β-Synthase
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cGMP-PDE	cGMP spezifische PDE
CNG-Kanal	<i>cyclic nucleotide-gated ion channel</i>
CRE	Crepine
CREB	Transkriptionsfaktor <i>cAMP response element-binding protein</i>
CS	Canton-Spezial
CSE	Cystathionin-γ-Lyase
d	<i>Drosophila</i> -spezifisch
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
EK	Ellipsoidkörper
eNOS	endotheliale NOS
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
FASII	Fasciilin II
FK	fächerförmiger Körper
GA	Gall
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAL4	Transkriptionsfaktor
GC	Guanylylzyklase
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRASP	<i>GFP reconstruction across synaptic partners</i>
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HCN-Kanal	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i>

iNOS	induzierbare NOS
iPCR	inverse PCR
K ⁺	Kalium
LAL	laterale akzessorische Loben
LED	<i>light emitting diode</i>
L-NNA	NOS-Inhibitor
LTR	laterale Triangel
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mg ²⁺	Magnesium
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRTF	<i>myocardin-related transcriptional factor</i>
n.s.	nicht signifikant
Na ⁺	Natrium
nNOS	neuronale NOS
No	Noduli
NO	Stickstoffmonoxid; <i>nitric oxide</i>
NOS	Nitritoxid-Synthase
OpTu	optische Tuberkel
P~dCREB	phosphoryliertes <i>Drosophila</i> CREB
PB	Protocerebralbrücke
PBS	Phosphatpuffer
PBTx	PBS mit Triton X100-Anteil
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PSD 95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
R1	Ringneurone des Subtyps 1
R2	Ringneurone des Subtyps 2
R3	Ringneurone des Subtyps 3
R4m/R4d	Ringneurone des Subtyps 4 medial/distal
RN	Ringneuron
RNA	Ribonukleinsäure

RNAi	RNA-Interferenz
Rp-cAMPS	PKA-Inhibitor
RSKII	Ribosomale S6 Kinase II
RT-qPCR	quantitative PCR auf Basis der reversen Transkription
RUB	Rubus
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sGC	lösliche (<i>soluble</i>) Guanylylzyklase
SoG	Suboesophagales Ganglion
SRF	<i>serum response factor</i>
SYN	Synapsin
Tab.	Tabelle
TBS	Puffer: <i>Tris-buffered Saline</i>
TBST	TBS mit Detergenz Tween-20
tdGFP	tandem-GFP
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
ZK	Zellkörper
α/β_c	$\alpha/\beta_{\text{core}}$ Kernschicht der Pilzkörperneurone
α/β_s	$\alpha/\beta_{\text{surface}}$ Oberflächenschicht der Pilzkörperneurone

8. Anhang

8.1. Validierung rekombinanter Chromosome mittels PCR

8.1.1. Rekombination von UAS-*dSrf* und UAS-*dMrtf*

Es wurde ein rekombinantes Chromosom der Transgene UAS-*dSrf* und UAS-*dMrtf* hergestellt, da beide Transgene auf dem dritten Chromosom liegen. Die möglichen Rekombinanten wurden per Augenfarbe vorselektiert (zwei Kopien *mini-white*) und die Rekombinante #2 wurde positiv für beide Transgene mit Hilfe einer iPCR bestätigt (Abb. 66). Die Bedingungen und Primer sind der Tab. 9 und der Tab. 12 im Methodenteil zu entnehmen.



Abb. 66: Validierung der Rekombinante UAS-*dSrf*+*dMrtf* mit Hilfe einer iPCR. Die Rekombinante #2 (R#2) wurde als positive Rekombinante identifiziert, da beide UAS-Konstrukte durch ein PCR-Produkt nachgewiesen werden konnten.

8.1.2. Rekombination von UAS-*ign* und *ign*^{58/1}

Es wurde eine Rekombinante des *ign*^{58/1} Allels und des UAS-*ign* (Rintelen et al., 2001) Transgens hergestellt. Einzeltiere wurden anhand des *mini-white* des Transgens identifiziert und in einer Einzelkreuzung als mögliche Rekombinanten etabliert. Der Nachweis der Mutation *ign*^{58/1} wurde anschließend mit Hilfe einer PCR erbracht (Abb. 67). Die PCR-Bedingungen und Primer sind der Tab. 8 und der Tab. 12 im Methodenteil zu entnehmen. Als positive Rekombinanten wurden #24, #45 und #55 identifiziert und es wurde mit der Rekombinante #24 weitergearbeitet.



Abb. 67: Validierung der Rekombinaten UAS-*ign* *ign*^{58/1}/FM7a (#24) mit Hilfe einer PCR. Der Nachweis der *ign*^{58/1} Mutation erfolgt über ein PCR-Produkt von 500 bp sowohl in der Rekombinanten #24 als auch in der Positivkontrolle.

8.1.3. Rekombination von 189Y-GAL4 und *homer*^{EP2141}

Da sowohl *homer* als auch 189Y-GAL4 (R3 Neurone) auf dem zweiten Chromosom liegen, wurde mit dem Allel *homer*^{EP2141} und dem Transgen 189Y-GAL4 eine Rekombination durchgeführt. Anhand der Augenfarbe wurden die Fliegen vorselektiert und mit Einzelkreuzungen verschiedene mögliche Rekombinanten etabliert. Mit Hilfe einer iPCR (Tab. 9, Tab. 12 im Methodenteil) wurden beide Transgene in der Rekombinanten #3 erfolgreich nachgewiesen (Abb. 68) und anschließend mit dieser Linie Rettungsexperimente durchgeführt.

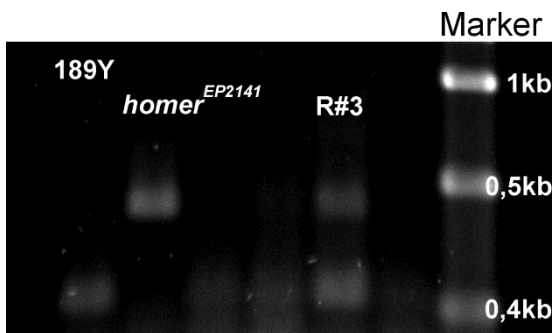


Abb. 68: Validierung der Rekombination von 189Y-GAL4 und *homer*^{EP2141}. In der Rekombinanten #3 (R#3) konnten beide transgenen Konstrukte durch ein PCR-Produkt nachgewiesen werden.

8.2. Validierung von Antikörpern

8.2.1. Antikörper gegen NOS

Zur Validierung des *Drosophila*-spezifischen Antikörpers gegen NOS wurden sowohl Ganzpräparate (*whole-mounts*) von wildtypischen Gehirnen (CS) als auch von Gehirnen der *Nos*^{A15} Nullmutante angefertigt (Abb. 69; NOS dargestellt in magenta). Parallel wurde eine Färbung gegen Fasciclin II (dargestellt in grün) durchgeführt, um Referenzstrukturen im Gehirn wiederzuerkennen. Während das wildtypische Gehirn eine breite NOS-Expression aufweist, sind in der Nullmutante *Nos*^{A15} keinerlei Strukturen angefärbt (linke Bildreihe). Der Antikörper zeigt also keine Kreuzreaktion zu weiteren Proteinen, sondern ist sehr spezifisch für NOS. Eine stärkere Expression von Fasciclin II ist in den $\alpha/\beta/\gamma$ -Loben der Pilzkörper (Xu et al., 2014) zu sehen und eine schwächere Färbung des Ellipsoidkörpers ist ebenfalls detektierbar (rechte Bildreihe). Fasciclin II-Expression ist im Gegensatz zur NOS-Expression in beiden Genotypen deutlich zu erkennen.

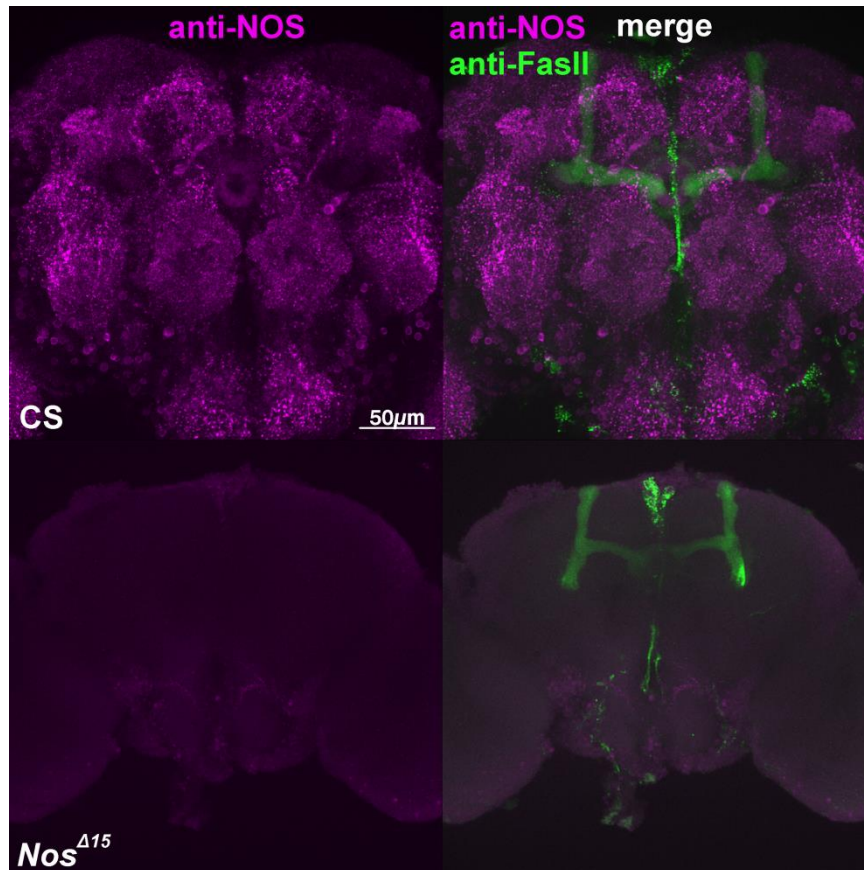


Abb. 69: Validierung des *Drosophila*-spezifischen NOS-Antikörpers. Totale z-Projektion eines adulten, wildtypischen Gehirns (obere Bildreihe) und eines Gehirns der *Nos*^{Δ15} Nullmutante (untere Bildreihe). NOS ist stark im wildtypischen Gehirn exprimiert, wohingegen in der Mutante keine Färbung zu erkennen ist (linke Bildreihe; NOS dargestellt in magenta). Die zusätzliche Färbung gegen Fasciclin II (dargestellt in grün) zeigt die Expression in den $\alpha/\beta/\gamma$ -Loben der Pilzkörper und eine schwache Expression im Ellipsoidkörper.

8.2.2. Antikörper gegen CBS

Da es leider keinen *Drosophila*-spezifischen Antikörper gegen CBS gibt, wurde die Eignung eines Serums gegen das humane CBS in einem *Western Blot*-Experiment überprüft (Abb. 70). *Drosophila* CBS läuft bei einer elektrophoretischen Auftrennung mit 522 Aminosäuren etwa auf der Höhe von 60 kDa. Im wildtypischen Proteinextrakt tritt eine deutliche Bande auf Höhe von etwa 60 kDa hervor. In Proteinextrakten mit einer panneuralen Überexpression von CBS (*elav*>UAS-*Cbs*) tritt diese Bande verstärkt auf, so dass sichergestellt werden konnte, dass es sich bei der Bande auf Höhe von etwa 60 kDa um *Drosophila* CBS handelt. Es sind jedoch ebenfalls viele Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen zu beobachten, weshalb der Einsatz des Antikörpers in der Histologie fragwürdig ist. Zusätzlich wurde eine Ladungskontrolle mit einer Färbung gegen Aktin durchgeführt (~43 kDa). Die Färbung fällt jedoch sehr schwach aus und die

Beleuchtungszeit wurde aufgrund der starken Färbung der Überexpression von CBS gering gehalten.

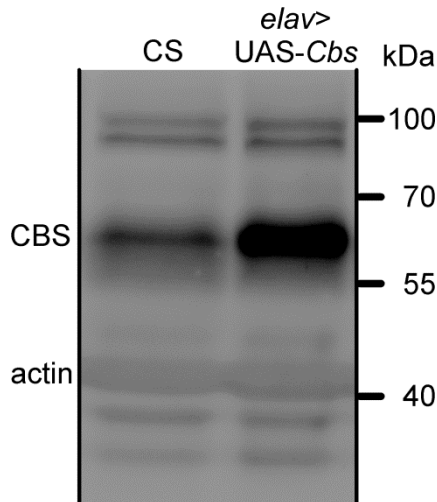


Abb. 70: Validierung des Antikörperserums gegen humanes CBS in einer Western Blot-Analyse. In einem 10 %igem Gel wurden Kopfextrakte von je 15 Fliegen pro Spur (CS und *elav>UAS-Cbs*) geladen. Immunochemische Färbungen wurden mit Antikörpern gegen CBS und Aktin durchgeführt. Es ist eine deutliche Bande von *Drosophila* CBS zu erkennen.

8.3. Detour-Paradigma

8.3.1. Knock-down von *dCREB*

Die Reduktion der mRNA von *dCreb* in den R3 Neuronen des Ellipsoidkörpers mit 189Y-GAL4 hat keinen spezifischen Effekt auf das Orientierungsgedächtnis, da die Kontrolltiere (*UAS-dCrebRNAi* ohne Treiberlinie) ebenfalls ein Gedächtnis von 70 % aufweisen (Abb. 71; *UAS-dCrebRNAi*: Dietzl et al., 2007). Die Verschlechterung des Gedächtnisses ist daher auf eine Leckexpression des UAS-Konstruktes zurückzuführen und kann durch die Gewebe-spezifische Expression mit 189Y nicht verstärkt werden.

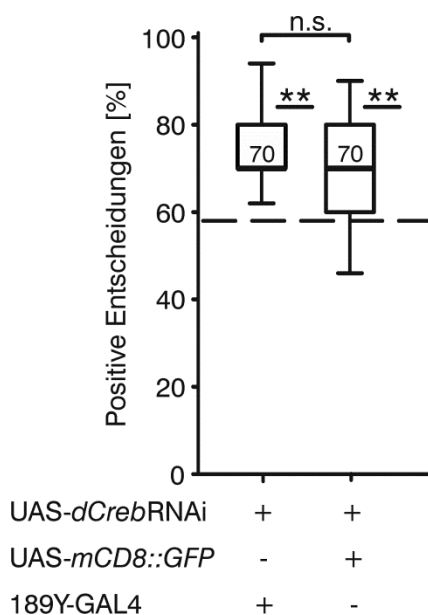


Abb. 71: Der Knock-down der *dCreb* mRNA mit 189Y-GAL4 (R3 Neuronen) führt zu einem Orientierungsgedächtnis von 70 %. Dies unterscheidet sich jedoch nicht zu den Kontrolltieren, die ebenfalls einen Median von 70 % aufweisen (alle Genotypen $n = 15$). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 13 zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9

Tab. 13a: Statistische Analyse für Abb. 71: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 95; Z = 0.725866.

N / n	Genotypen	UAS- <i>dCreb-B17ARNai</i> /189Y
150 / 15	UAS- <i>dCreb-B17ARNai</i> /189Y	
150 / 15	UAS- <i>dCreb-B17ARNai</i> /UAS- <i>mCD8::GFP</i>	p = 0.467921

Tab. 13b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 70). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	UAS- <i>dCreb-B17ARNai</i> /189Y	p = 0.03506	Sign-Test	p = 0.001946
150 / 15	UAS- <i>dCreb-B17ARNai</i> /UAS- <i>mCD8::GFP</i>	p = 0.17289	single-t-Test	p = 0.006749

8.3.2. GAL4-Kontrollen für das Rettungsexperiment von *ebo*⁶⁷⁸ durch die Überexpression von *Cbs* und *Nos*

Wie bereits in Kapitel 3.4 beschrieben, kann das defekte Orientierungsgedächtnis der *ebo*⁶⁷⁸ Mutante durch die Überexpression von *Nos* und *Cbs* (sowohl in R3 als auch in R2 Neuronen) gerettet werden (Abb. 25; Abb. 28). 189Y- und EB1-GAL4 wurden für diese Experimente in den *ebo*⁶⁷⁸ mutanten Hintergrund gekreuzt und sowohl histologisch als auch im Verhalten auf den *ebo*⁶⁷⁸ Phänotyp überprüft. Sowohl bei den Ausgangsstämmen, *ebo*⁶⁷⁸; 189Y-GAL4 und *ebo*⁶⁷⁸; EB1-GAL4, als auch bei den Rettungstieren konnte die *ebo* phänotypische Deformierung des Ellipsoidkörpers beobachtet werden. In der Verhaltensanalyse unterscheidet sich die GAL4-Kontrolle von EB1 (*ebo*⁶⁷⁸/Y;; EB1-GAL4/III) signifikant von den jeweiligen Rettungstieren (*ebo*⁶⁷⁸/Y; UAS-*Nos*/II; EB1-GAL4/UAS-*Nos*, Abb. 72A und *ebo*⁶⁷⁸/Y;; EB1-GAL4/UAS-*Cbs*, Abb. 72B.).

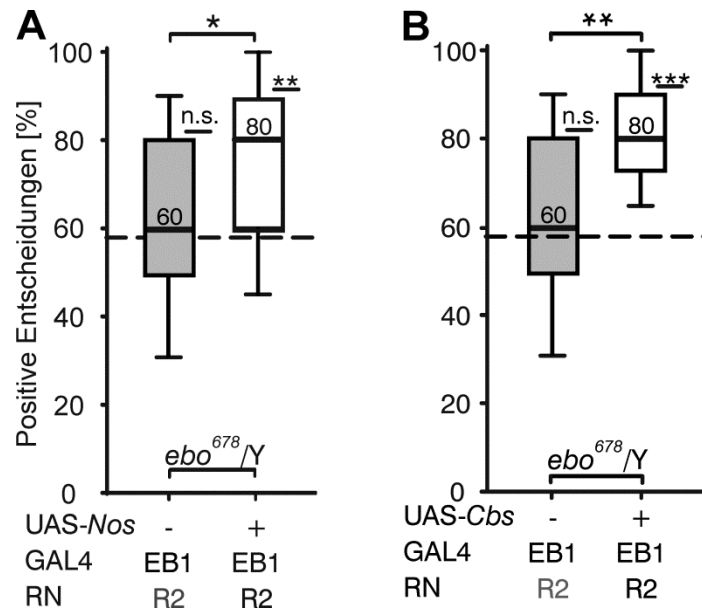


Abb. 72: Die Kontrollen der GAL4-Linie EB1 im *ebo*⁶⁷⁸ mutanten Hintergrund. Die GAL4-Kontrolle mit der hemizygoten *ebo*⁶⁷⁸ Mutation zeigt ein defektes Orientierungsgedächtnis von 60 % und unterscheidet sich zur Rettung mit *Nos* (*ebo*⁶⁷⁸/*Y*; UAS-*Nos*/II; EB1-GAL4/UAS-*Nos*) und zur Rettung mit *Cbs* (*ebo*⁶⁷⁸/*Y*; EB1-GAL4/UAS-*Cbs*) (alle Genotypen n = 24). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 14 und der Tab. 15 zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Tab. 14a: Statistische Analyse für Abb. 72A: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 185.5; Z = -2.11351.

N / n	Genotypen	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ / <i>Y</i> ;EB1/III
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ / <i>Y</i> ;EB1/III	
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ / <i>Y</i> ;UAS- <i>Nos</i> /II;EB1/UAS- <i>Nos</i>	p = 0.033683

Tab. 14b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 71A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ / <i>Y</i> ;EB1/III	p = 0.63506	single t-Test	p = 0.409897
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ / <i>Y</i> ;UAS- <i>Nos</i> /II;EB1/UAS- <i>Nos</i>	p = 0.03240	Sign-Test	p = 0.002200

Tab. 15a: Statistische Analyse für Abb. 72B: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 139.5; Z = -3.06202.

N / n	Genotypen	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ / <i>Y</i> ;EB1/III
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ / <i>Y</i> ;EB1/III	
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ / <i>Y</i> ;UAS- <i>Cbs</i> /EB1	0.001739

Tab. 15b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 71B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;;EB1/III	p = 0.63506	single-t-Test	p = 0.409897
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;;UAS- <i>Cbs</i> /EB1	p = 0.00122	Sign-Test	p = 0.000018

Auch die GAL4-Kontrollen für die Linie 189Y (*ebo*⁶⁷⁸/Y; 189Y/II) unterscheidet sich höchst signifikant von den jeweiligen Rettungstieren (*ebo*⁶⁷⁸/Y; UAS-*Nos*/189Y; UAS-*Nos*/III, Abb. 73A und *ebo*⁶⁷⁸/Y; 189Y/II; UAS-*Cbs*/III, Abb. 73B).

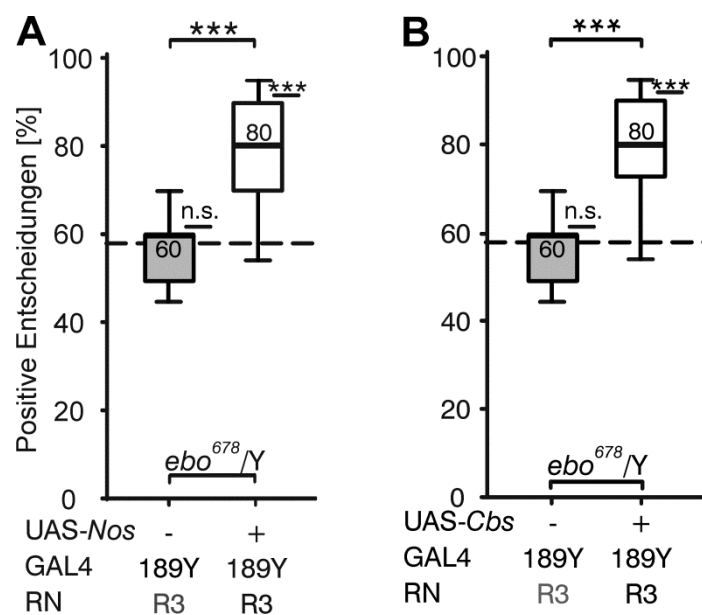


Abb. 73: Die Kontrollen der GAL4-Linie 189Y im *ebo*⁶⁷⁸ mutanten Hintergrund. Die GAL4-Kontrolle mit der hemizygoten *ebo*⁶⁷⁸ Mutation zeigt ein defektes Orientierungsgedächtnis von 60 % und unterscheidet sich zur Rettung mit *Nos* (*ebo*⁶⁷⁸/Y; UAS-*Nos*/189Y; UAS-*Nos*/III) und zur Rettung mit *Cbs* (*ebo*⁶⁷⁸/Y; 189Y/II; UAS-*Cbs*/III) (alle Genotypen n = 24). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 16 und der Tab. 17 zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Tab. 16a: Statistische Analyse für Abb. 73A: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 66 Z = -4.57756.

N / n	Genotypen	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II	
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /189Y;UAS- <i>Nos</i> /III	p = 0.000003

Tab. 16b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 72A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II	p = 0.00571	Sign-Test	p = 0.153042
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /189Y;UAS- <i>Nos</i> /III	p = 0.09998	single t-Test	p < 10 ⁻⁵

Tab. 17a: Statistische Analyse für Abb. 73B: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 66.5 Z = -4.56725.

N / n	Genotypen	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II	
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II;UAS- <i>Cbs</i>	p = 0.000003

Tab. 17b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 72B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II	p = 0.00571	Sign-Test	p = 0.153042
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II;UAS- <i>Cbs</i>	p = 0.03049	Sign-Test	p = 0.000105

8.3.3. Genetische Interaktionen von *dCREB*

Es kann keine genetische Interaktion zwischen *Creb*^{S162} und *Nos*^{A15} gemessen werden (Abb. 74). Einfach heterozygote *Creb*^{S162}/X Tiere zeigen einen intermediären Gedächtnisphänotyp von 70 %, während einfach heterozygote *Nos*^{A15}/II Tiere ein wildtypisches Gedächtnis von 80 % aufweisen. Doppelt heterozygote Tiere (*Creb*^{S162}/X; *Nos*^{A15}/II) zeigen ebenfalls ein Gedächtnislevel von 70 % und somit ist kein additiver Effekt gegenüber den einfach heterozygoten *Creb*^{S162}/X Tieren zu beobachten.

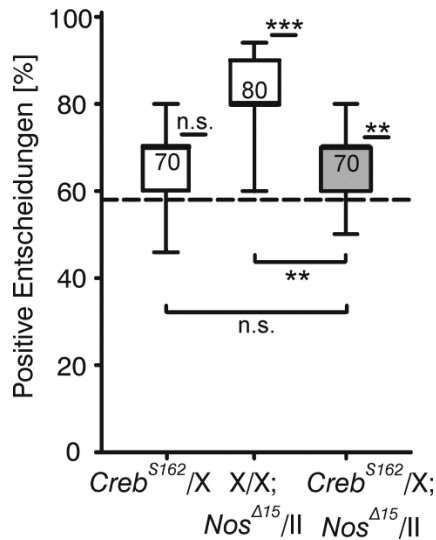


Abb. 74: Genetische Interaktion zwischen $Creb^{S162}$ und Nos^{A15} . Einfach heterozygote Tiere zeigen 70 % ($Creb^{S162}/X$) bzw. 80 % (Nos^{A15}/II) Orientierungsleistung. Das Gedächtnis der doppelt heterozygoten Tiere ($Creb^{S162}/X; Nos^{A15}/II$) zeigt hingegen keinen Unterschied zu dem der heterozygoten $Creb^{S162}/X$ Fliegen (alle Genotypen n = 15). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 18 zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Tab. 18a: Statistische Analyse für Abb. 74: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: One-way ANOVA: MS = 113,97; df = 42.

N / n	Genotypen	$Creb-B^{S162}/X$	Nos^{A15}/II
150 / 15	$Creb-B^{S162}/X$		
150 / 15	Nos^{A15}/II	0.000322	
150 / 15	$Creb-B^{S162}/X; Nos^{A15}/II$	≈1.0	0.0025651

Tab. 18b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 73). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	$Creb-B^{S162}/X$	p = 0.14337	single t-Test	p = 0.057158
150 / 15	Nos^{A15}/II	p = 0.05890	single t-Test	p = 0.000001
150 / 15	$Creb-B^{S162}/X; Nos^{A15}/II$	p = 0.06992	single t-Test	p = 0.003987

Es kann ebenfalls keine genetische Interaktion zwischen $Creb^{S162}$ und ebo^{678} gemessen werden (Abb. 75). Die einfach heterozygoten Tiere laufen zu 60 % ($Creb^{S162}/X$) bzw. zu 80 % (ebo^{678}/X) die ursprüngliche Landmarke an, während die doppelt heterozygoten Tiere einen intermediären Phänotyp von 70 % Orientierungsleistung zeigen. Die Genotypen zeigen keine signifikanten Unterschiede, so dass keine genetische Interaktion beobachtet werden konnte.

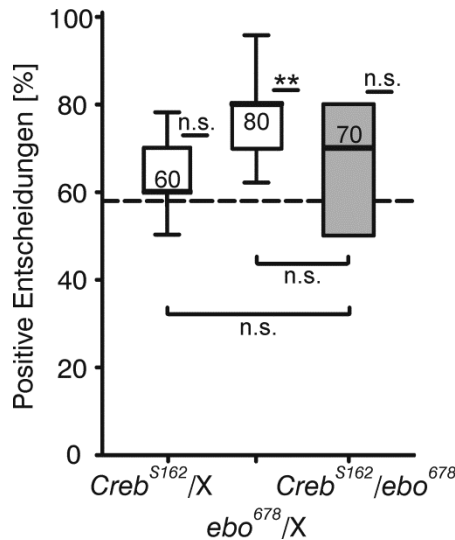


Abb. 75: Genetische Interaktion zwischen $Creb^{S162}$ und ebo^{678} . Einfach heterozygote Tiere zeigen 60 % ($Creb^{S162}/X$) bzw. 80 % (ebo^{678}/X) Orientierungsleistung. Das Gedächtnis der doppelt heterozygoten Tiere ($Creb^{S162}/ebo^{678}$) zeigt hingegen keinen signifikanten Unterschied zu dem der einfach heterozygoten Fliegen (alle Genotypen n = 11). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 19 zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Tab. 19a: Statistische Analyse für Abb. 75: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 33) = 7.782654$ $p = 0.0204$.

N / n	Genotypen	$Creb-B^{S162}/X$	ebo^{678}/X
110 / 11	$Creb-B^{S162}/X$		
110 / 11	ebo^{678}/X	0.027825 2.601746	
110 / 11	$Creb-B^{S162}/ebo^{678}$	≈1.0 0.705558	0.173806 1.896188

Tab. 19b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 74). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
110 / 11	$Creb-B^{S162}/X$	$p = 0.21719$	single t-Test	$p = 0.070718$
110 / 11	Nos^{A15}/II	$p = 0.04197$	Sign-Test	$p = 0.002569$
110 / 11	$Creb-B^{S162}/X; Nos^{A15}/II$	$p = 0.02437$	Sign-Test	$p = 0.227800$

8.3.4. Twins - eine mögliche Phosphatase für dCREB

Es wurde ein weiteres Experiment zu einer möglichen dCREB Phosphatase *twins* (*tws*) durchgeführt. Wie bereits oben gezeigt, haben die heterozygoten $Pka-CI^{H2}/II$ Fliegen und die heterozygoten $CrebB^{S162}/X$ Fliegen ein intermediäres Gedächtnis von 70 % (Abb. 76). Weder doppelt heterozygote Fliegen des Genotyps $CrebB^{S162}/X; tws/III$ noch $Pka-CI^{H2}/II; tws/III$ zeigen eine signifikante Verschlechterung des Gedächtnislevels, also keine genetische Interaktion. Falls *tws* eine relevante Phosphatase für dCREB wäre, dann wäre durch die reduzierte Kopienanzahl der Phosphatase zu erwarten gewesen, dass CREB länger in der aktiven Form bleibt und

somit den Gedächtnisdefizit der heterozygoten *CrebB^{S162}/X* oder *Pka-CI^{H2}/II* Fliegen verbessert. Dies konnte in beiden Fällen nicht beobachtet werden. Jedoch ist keine genetische Interaktion kein eindeutiges Ausschlagkriterium für diese Hypothese. Im Falle von *Pka-CI^{H2}/II; tws/III* könnte dies ein weiterer Hinweis sein, dass PKA und dCREB nicht in einem gemeinsamen Signalweg interagieren.

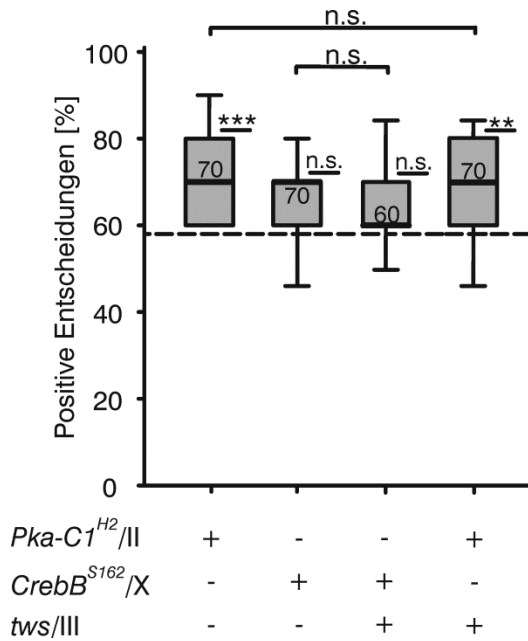


Abb. 76: Genetische Interaktion zwischen *Creb^{S162}* und *tws*, sowie *Pka-CI^{H2}* und *tws*. Einfach heterozygote *Pka-CI^{H2}/II* und *CrebB^{S162}/X* Tiere zeigen ein intermediäres Gedächtnis von 70 %, welches in beiden Fällen durch Einkreuzen von *tws* nicht signifikant verändert wird (alle Genotypen n = 15). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 20 zu entnehmen. Darstellungskonventionen wie in Abb. 9.

Tab. 20a: Statistische Analyse für Abb. 76: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(4, N = 75) = 24.33087$ $p = 0.0001$.

N / n	Genotypen	<i>Pka-CI^{H2}/II</i>	<i>Creb-B^{S162}/X</i>	<i>Creb-B^{S162}/X;tws/III</i>
150 / 15	<i>Pka-CI^{H2}/II</i>			
150 / 15	<i>Creb-B^{S162}/X</i>	0.672317 1.589033		
150 / 15	<i>Creb-B^{S162}/X;tws/III</i>	0.394668 1.839933	≈1.0 0.250900	
150 / 15	<i>Pka-CI^{H2}/II;tws/III</i>	≈1.0 0.376350	≈1.0 1.212683	0.859847 1.463583

Tab. 20b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 75). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	<i>Pka-CI^{H2}/II</i>	p = 0.03038	Sign-Test	p = 0.000301
150 / 15	<i>Creb-B^{S162}/X</i>	p = 0.14337	single t-Test	p = 0.057158
150 / 15	<i>Creb-B^{S162}/X;tws/III</i>	p = 0.07176	single t-Test	p = 0.057158
150 / 15	<i>Pka-CI^{H2}/II;tws/III</i>	p = 0.22351	single t-Test	p = 0.005378

8.4. *Buridan-Paradigma:*

8.4.1. Genetische Interaktion zwischen *Nos* und *dMrtf*

Zur Überprüfung der Hypothese, ob dSRF/dMRTF die Transkription von *Nos* reguliert, wurde ebenfalls eine genetische Interaktion mit einem der beiden Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Das Allel *Mrtf*^{A7} ist eine Deletionsmutation des ersten kodierenden Exons von *Mrtf* (Somogyi und Rørth, 2004) und ist ein hypomorphes Komplementationsallel zu einer Nullmutante (Han et al., 2004). Weder die doppelt heterozygoten Tiere mit dem *Nos*^{A15} Allel (*Nos*^{A15}/II; *Mrtf*^{A7}/III), noch mit dem Allel *Nos*^{e2671} (*Nos*^{e2671}/II; *Mrtf*^{A7}/III) zeigen ein gezieltes Anlaufverhalten auf die Landmarken. Da dies die Voraussetzung für das Abfragen des Orientierungsgedächtnisses ist, konnten die erwähnten Genotypen nicht auf ihr Arbeitsgedächtnis im *Detour-Paradigma* überprüft werden und wurden daher im *Buridan-Paradigma* auf ihr Anlaufverhalten auf eine Landmarke untersucht.

Heterozygote Fliegen für die Gene *Nos* und *Mrtf* (*Nos*^{A15}/II und *Mrtf*^{A7}/III) laufen die Landmarken mit einem Fehlerwinkel von 23,0° bzw. 20,8° an, wohingegen die doppelt heterozygoten Tiere (*Nos*^{A15}/II; *Mrtf*^{A7}/III) eine signifikante Verschlechterung des Fehlerwinkels auf 27,6° zeigen (Abb. 77A). In Abb. 77B sind die Verteilungen aufgetragen wie häufig die Genotypen die Landmarke unter dem jeweiligen Fehlerwinkel anlaufen. *Nos*^{A15}/II; *Mrtf*^{A7}/III Tiere fixieren die Landmarke direkt (0°) mit der geringsten Häufigkeit an und zeigen die breiteste Verteilung über alle Anlaufwinkel. Die Verschlechterung der doppelt heterozygoten Fliegen im Anlaufverhalten auf die Landmarke im Vergleich zu den einfach heterozygoten Kontrollen zeigt eine genetische Interaktion zwischen *Nos* und *Mrtf* an. Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden, dass mit dem Allel *Nos*^{e2671} durchgeführt wurde. Die Kontrollen *Nos*^{e2671}/II und *Mrtf*^{A7}/III laufen jeweils mit einem Fehlerwinkel von 20,3° bzw. 20,8° die Landmarke an, während sich die doppelt heterozygoten Tiere (*Nos*^{e2671}/II; *Mrtf*^{A7}/III) deutlich verschlechtern und einen Fehlerwinkel von 25,6° aufweisen (Abb. 77C). Dies zeigt sich auch, wenn man die Verteilung über die Fehlerwinkel des Anlaufverhaltens gemäß ihrer Häufigkeit anschaut (Abb. 77D). Die direkten Anläufe (0°) waren bei den *Nos*^{e2671}/II; *Mrtf*^{A7}/III Fliegen am seltensten, während die Kontrollen ein deutliches Maximum im Bereich der geringen Fehlerwinkel (-20° bis 20°) zeigen. Auch die genetische Interaktion mit dem Allel *Nos*^{e2671} bestätigt das Zusammenspiel von *Nos* und *dMrtf* in einem Signalweg.

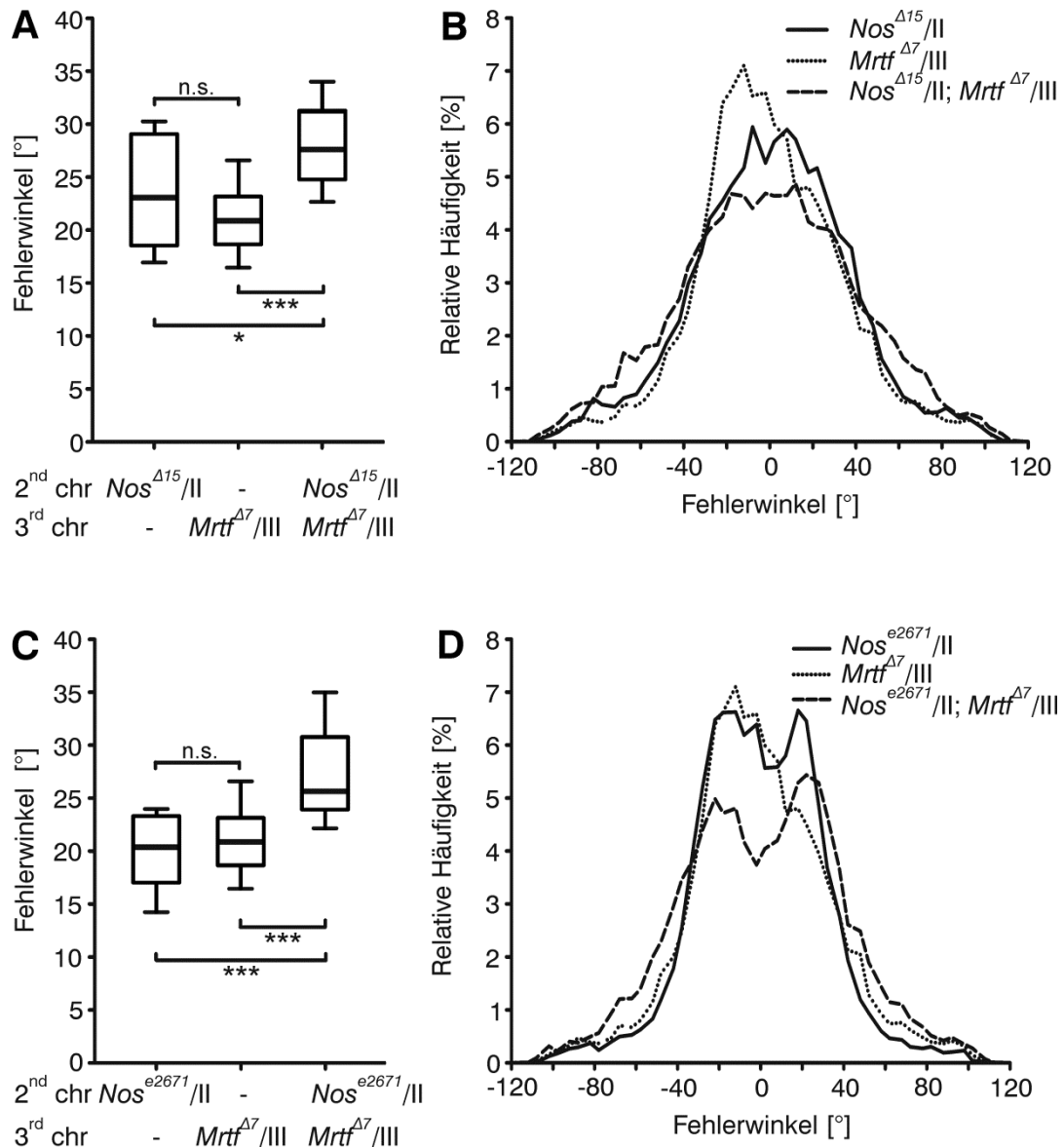


Abb. 77: Genetische Interaktion zwischen *Nos* und *Mrtf* im Buridan-Paradigma. (A) Fehlerwinkel im Anlaufverhalten auf eine Landmarke: Die doppelt heterozygoten Tiere ($Nos^{\Delta15}/II; Mrtf^{\Delta7}/III$) zeigen einen größeren Fehlerwinkel als die einfach heterozygoten Tiere. (B) Relative Häufigkeit der Fehlerwinkel, unter denen die Fliegen die Landmarken angelaufen sind. Grundlage der Berechnung für A. (C) Fehlerwinkel im Anlaufverhalten auf eine Landmarke: Auch die doppelt heterozygoten Tiere ($Nos^{e2671}/II; Mrtf^{\Delta7}/III$) zeigen einen größeren Fehlerwinkel als die einfach heterozygoten Tiere. (D) Relative Häufigkeit der Fehlerwinkel, unter denen die Fliegen die Landmarken angelaufen sind. Grundlage der Berechnung für C; (alle Genotypen n = 20). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 21 und der Tab. 22 zu entnehmen. Darstellungs konventionen für (A) und (C) wie in Abb. 9.

Tab. 21a: Statistische Analyse für Abb. 77A: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 60) = 18.48492$ $p = 0.0001$.

n	Genotypen	Nos^{A15}/II	$Mrtf^{A7}/III$
20	Nos^{A15}/II		
20	$Mrtf^{A7}/III$	0.292677 1.656804	
20	$Nos^{A15}/II;Mrtf^{A7}/III$	0.027367 2.607429	0.000060 4.264234

Tab. 21b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 76A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

n	Genotypen	Normalverteilung
20	Nos^{A15}/II	$p = 0.80323$
20	$Mrtf^{A7}/III$	$p = 0.00602$
20	$Nos^{A15}/II;Mrtf^{A7}/III$	$p = 0.36037$

Tab. 22a: Statistische Analyse für Abb. 77C: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 60) = 18.48492$ $p = 0.0001$.

n	Genotypen	Nos^{e2671}/II	$Mrtf^{A7}/III$
20	Nos^{e2671}/II		
20	$Mrtf^{A7}/III$	≈ 1.0 0.624697	
20	$Nos^{e2671}/II;Mrtf^{A7}/III$	0.000042 4.345716	0.000595 3.721019

Tab. 22b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 76C). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

n	Genotypen	Normalverteilung
20	Nos^{e2671}/II	$p = 0.75240$
20	$Mrtf^{A7}/III$	$p = 0.00602$
20	$Nos^{e2671}/II;Mrtf^{A7}/III$	$p = 0.38140$

8.4.2. Genetische Interaktion zwischen *Nos* und *ign*

Es wurde ebenfalls eine genetische Interaktionsstudie zwischen den Genen *Nos* und *ign* durchgeführt. Da Fliegen des Genotyps $ign^{58/1}/X; Nos^{A15}/II$ jedoch keine ausreichende Fixierung der Balken im *Detour*-Paradigma zeigen, wurde ihr Anlaufverhalten im Buridan-Paradigma untersucht. Heterozygote $ign^{58/1}/X$ und Nos^{A15}/II Tiere laufen die Landmarke mit einem Fehlerwinkel von $23,3^\circ$ bzw. $23,5^\circ$ an,

während die doppelt heterozygoten Tiere $ign^{58/1}/X; Nos^{A15}/II$ eine Verschlechterung des Fehlerwinkels auf $28,6^\circ$ zeigen (Abb. 78A). Dies lässt sich auch an der Verteilung über die Fehlerwinkel des Anlaufverhaltens gemäß ihrer Häufigkeit beobachten (Abb. 78B). Die doppelt heterozygoten Tiere zeigen die geringste Anlaufhäufigkeit im Bereich der kleinen Fehlerwinkel (-20° bis 20°) im Vergleich zu den Kontrollgenotypen. Die Ergebnisse dieses Experiments decken eine genetische Interaktion der beiden Gene *Nos* und *ign* auf.

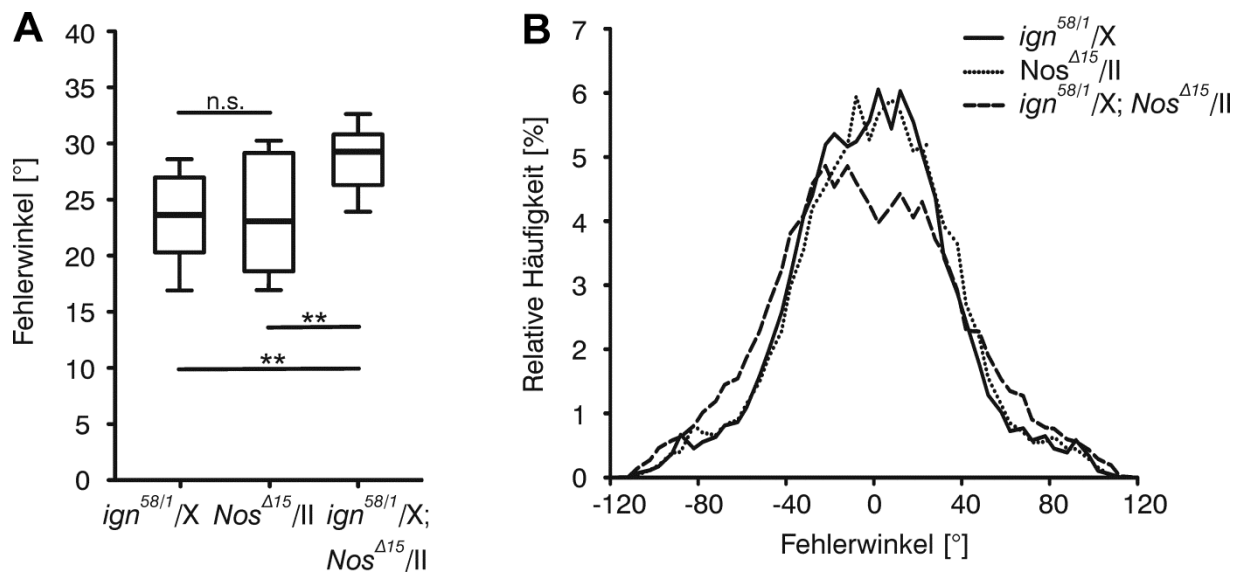


Abb. 78: Genetische Interaktion zwischen *Nos* und *ign* im Buridan-Paradigma. (A) Die doppelt heterozygoten Tiere ($ign^{58/1}/X; Nos^{A15}/II$) weisen einen deutlich größeren Fehlerwinkel als die heterozygoten Kontrollen auf. (B) Relative Häufigkeit der Fehlerwinkel, unter denen die Fliegen die Landmarken angelaufen sind. Grundlage der Berechnung für A; (alle Genotypen $n = 20$). Die statistischen Auswertungen sind der Tab. 23 zu entnehmen. Darstellungskonventionen für (A) sind wie in Abb. 9.

Tab. 23a: Statistische Analyse für Abb. 78: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: One-way ANOVA: MS = 20.740; df = 57.

n	Genotypen	$ign^{58/1}/X$	Nos^{A15}/II
20	$ign^{58/1}/X$		
20	Nos^{A15}/II	≈ 1.0	
20	$ign^{58/1}/X; Nos^{A15}/II$	0.001124	0.002531

Tab. 23b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 77). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

n	Genotypen	Normalverteilung
20	$ign^{58/1}/X$	$p = 0.22261$
20	Nos^{A15}/II	$p = 0.80323$
20	$ign^{58/1}/X;Nos^{A15}/II$	$p = 0.71267$

8.5. Statistik

Tab. 24a: Statistische Analyse für Abb. 9: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Test: $H(5, N = 144) = 52,95278$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	CS	for^R	for^S	for^R/for^{189Y}	for^S/for^{189Y}
240 / 24	CS					
240 / 24	for^R	$\approx 1,0$ 0,325261				
240 / 24	for^S	0,000002 5,264737	0,000012 4,939476			
240 / 24	for^R/for^{189Y}	$\approx 1,0$ 0,560557	$\approx 1,0$ 0,235296	0,000038 4,704180		
240 / 24	for^S/for^{189Y}	0,000814 4,036356	0,003095 3,711095	$\approx 1,0$ 1,228381	0,007640 3,475799	
240 / 24	$for^{189Y}/Df(2L)ED243$	0,014096 3,307978	0,042855 2,982717	0,755637 1,956759	0,090099 2,747421	$\approx 1,0$ 0,728378

Tab. 24b Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 9). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	CS	$p = 0,00043$	Sign-Test	$p < 10^{-5}$
240 / 24	for^R	$p = 0,00242$	Sign-Test	$p < 10^{-5}$
240 / 24	for^S	$p = 0,46531$	single t-Test	$p = 0,584387$
240 / 24	for^R/for^{189Y}	$p = 0,01354$	Sign-Test	$p < 10^{-5}$
240 / 24	for^S/for^{189Y}	$p = 0,12590$	single t-Test	$p = 0,004377$
240 / 24	$for^{189Y}/Df(2L)ED243$	$p = 0,00157$	Sign-Test	$p < 10^{-5}$

Tab. 25a: Statistische Analyse für Abb. 11A: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(8, N = 188) = 93,98333 p = 0,0000.

N / n	Genotypen	CS	<i>for^s/for^{189Y}</i>	<i>for^s;</i> UAS- <i>for</i> T1	<i>for^s/for^s201Y;</i> UAS- <i>for</i> T1/III	<i>for^s;</i> UAS- <i>for</i> T1/ c232	<i>for^s/189Y;</i> UAS- <i>for</i> T1/III	c105/Y; <i>for^s;</i> UAS- <i>for</i> T1/III	<i>for^s;</i> UAS- <i>for</i> T1/ c042
240 / 24	CS								
240 / 24	<i>for^s/for^{189Y}</i>	0,009894 3,637944							
200 / 20	<i>for^s;</i> UAS- <i>for</i> T1	0,000198 4,545276	≈1,0 1,076632						
200 / 20	<i>for^s/for^s201Y;</i> UAS- <i>for</i> T1/III	< 10 ⁻⁵ 6,015687	0,391103 2,547044	≈1,0 1,407812					
200 / 20	<i>for^s;</i> UAS- <i>for</i> T1/ c232	≈1,0 0,293374	0,053891 3,175269	0,001686 4,070886	0,000002 5,478698				
200 / 20	<i>for^s/189Y;</i> UAS- <i>for</i> T1/III	≈1,0 0,180071	0,009488 3,648714	0,000218 4,524175	< 10 ⁻⁵ 5,931987	≈1,0 0,453289			
200 / 20	c105/Y; <i>for^s;</i> UAS- <i>for</i> T1/III	0,001003 4,190192	≈1,0 0,721549	≈1,0 0,339967	≈1,0 1,747779	0,006868 3,730919	0,001030 4,184208		
200 / 20	<i>for^s;</i> UAS- <i>for</i> T1/ c042	0,000629 4,294896	≈1,0 0,826253	≈1,0 0,239720	≈1,0 1,647532	0,004591 3,831166	0,000659 4,284455	≈1,0 0,100247	
200 / 20	<i>for^s;</i> UAS- <i>for</i> T1/ ftz-ng	0,000002 5,467887	≈1,0 1,999244	≈1,0 0,883333	≈1,0 0,524479	0,000026 4,954219	0,000002 5,407508	≈1,0 1,223300	≈1,0 1,123053

Tab. 25b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 11A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	CS	p = 0,00043	Sign-Test	p < 10 ⁻⁵
240 / 24	<i>for^s/for^{189Y}</i>	p = 0,12590	single t-Test	p = 0,004377
200 / 20	<i>for^s;UAS-forT1</i>	p = 0,27690	single t-Test	p = 0,511089
200 / 20	<i>for^s/for^s201Y;UAS-forT1/III</i>	p = 0,00345	Sign-Test	p = 0,238
200 / 20	<i>for^s;UAS-forT1/c232</i>	p = 0,14741	single t-Test	p < 10 ⁻⁵
200 / 20	<i>for^s/189Y;UAS-forT1/III</i>	p = 0,00081	Sign-Test	p < 10 ⁻⁵
200 / 20	<i>c105/Y;for^s;UAS-forT1/III</i>	p = 0,01077	Sign-Test	p = 0,028
200 / 20	<i>for^s; UAS-forT1/c042</i>	p = 0,00398	Sign-Test	p = 0,002
200 / 20	<i>for^s; UAS-forT1/ftz-ng</i>	p = 0,05689	single t-Test	p = 0,707548

Tab. 25c: Statistische Analyse für die Abb. 11B. Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotyp	Z-Wert	p-Wert
180 / 18	189Y> <i>TubGAL80^{ts}/for^s;UAS-forT1/III</i> 18°C vs 30°C	Z = 2,698272	p = 0,006970

Tab. 25d: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 11B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet. Der Genotyp 189Y>*TubGAL80^{ts}/for^s;UAS-forT1/III* wurde bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet.

N / n	Genotyp Temperaturbedingung	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
180 / 18	18°	p = 0,00289	Sign-Test	p = 0,280
180 / 18	30°	p = 0,01551	Sign-Test	p = 0,001

Tab. 26a: Statistische Analyse für Abb. 12: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(3, N = 66) = 26,08882 p = 0,0000.

N / n	Genotypen	CS	UAS-mCD8:: <i>GFP/II</i> ; UAS- <i>forRNAi/III</i>	UAS-mCD8:: <i>GFP/189Y</i>
180 / 18	CS			
150 / 15	UAS-mCD8:: <i>GFP/II</i> ; UAS- <i>forRNAi/III</i>	≈1,0 1,370035		
180 / 18	UAS-mCD8:: <i>GFP/189Y</i>	≈1,0 1,302331	≈1,0 0,128311	
150 / 15	189Y/II;UAS- <i>forRNAi/III</i>	0,000009 4,807126	0,005995 3,290764	0,002180 3,565402

Tab. 26b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 12). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
180 / 18	CS	p = 0,00139	Sign-Test	p < 10 ⁻⁵
150 / 15	UAS-mCD8::GFP/II;UAS- <i>for</i> RNAi/III	p = 0,08152	single t-Test	p < 10 ⁻⁴
180 / 18	UAS-mCD8::GFP/189Y	p = 0,02519	Sign-Test	p < 10 ⁻⁵
150 / 15	189Y/II; UAS- <i>for</i> RNAi/III	p = 0,03350	Sign-Test	p = 0,773

Tab. 27a: Statistische Analyse für Abb. 16B: Vergleich zweier Gruppen mit dem t-Test: t = 5,281386.

n	Genotypen	p-Wert
5	UAS- <i>Nos</i> RNAi/II	p = 0,000745
5	UAS- <i>Nos</i> RNAi/189Y	

Tab. 27b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 16B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

n	Genotypen	Normalverteilung
5	UAS- <i>Nos</i> RNAi/II	p = 0,53682
5	UAS- <i>Nos</i> RNAi/189Y	p = 0,65114

Tab. 28a: Statistische Analyse für Abb. 17A: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(3, N = 71) = 25,27400 p = 0,0000.

N / n	Genotypen	CS	<i>Nos</i> ^{A15}	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^{e2671}
180 / 18	CS			
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15}	0,000059 4,421077		
170 / 17	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^{e2671}	0,005698 3,305022	≈1,0 1,052439	
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C	0,000059 4,053663	≈1,0 0,367414	≈1,0 0,690312

Tab. 28b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 17A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
180 / 18	CS	p = 0,02183	Sign-Test	p = 0,000062
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15}	p = 0,12410	single t-Test	p = 0,777509
170 / 17	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^{e2671}	p = 0,03172	Sign-Test	p = 0,003609
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C	p = 0,08465	single t-Test	p = 0,746093

Tab. 29a: Statistische Analyse für Abb. 17B: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 55) = 23,04675$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	UAS- <i>Nos</i> RNAi/II	UAS- <i>Nos</i> RNAi/189Y
200 / 20	UAS- <i>Nos</i> RNAi/II		
200 / 20	UAS- <i>Nos</i> RNAi/189Y	0,000185 4,006926	
150 / 15	UAS- <i>Nos</i> RNAi/II; VT202672/III	0,000191 3,999036	≈1,0 0,289344

Tab. 29b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 17B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
200 / 20	UAS- <i>Nos</i> RNAi/II	$p = 0,06453$	single t-Test	$p < 10^{-5}$
200 / 20	UAS- <i>Nos</i> RNAi/189Y	$p = 0,01095$	Sign-Test	$p = 0,000796$
150 / 15	UAS- <i>Nos</i> RNAi/II;VT202672/III	$p = 0,08553$	single t-Test	$p = 0,017975$

Tab. 30a: Statistische Analyse für Abb. 19: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 54) = 3,911374$ $p = 0,1415$.

N / n	Genotypen	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C ;UAS- <i>Nos</i> /III
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C		
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C ;UAS- <i>Nos</i> /III	0,791124 1,117670	
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C ;UAS- <i>Nos</i> /c232	0,165516 1,917519	≈1,0 0,799849

Tab. 30b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 19). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C	$p = 0,08465$	single t-Test	$p = 0,746093$
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C ;UAS- <i>Nos</i> /III	$p = 0,05845$	single t-Test	$p = 0,001974$
180 / 18	<i>Nos</i> ^{A15} / <i>Nos</i> ^C ;UAS- <i>Nos</i> /c232	$p = 0,01726$	Sign-Test	$p = 0,002183$

Tab. 31a: Statistische Analyse für die Abb. 20A: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
150 / 15	CS naiv	Z = 0,591608	p = 0,554114
150 / 15	CS + 2 h Saccharose		
150 / 15	CS naiv	Z = 3,407771	p = 0,000655
150 / 15	CS + 2 h L-NNA		

Tab. 31b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 20A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS naiv	$p = 0,00003$	Sign-Test	$p = 0,000301$
150 / 15	CS + 2 h Saccharose	$p = 0,12410$	single t-Test	$p = 0,000301$
150 / 15	CS naiv	$p = 0,00001$	Sign-Test	$p = 0,000301$
150 / 15	CS + 2 h L-NNA	$p = 0,04983$	Sign-Test	$p = 0,301700$

Tab. 32a: Statistische Analyse für die Abb. 20B: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
150 / 15	CS naiv	$Z = 0,943456$	$p = 0,345448$
150 / 15	CS + 30 Min Saccharose		
150 / 15	CS naiv	$Z = 3,407771$	$p = 0,000655$
150 / 15	CS + 30 Min L-NNA		

Tab. 32b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 20B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS naiv	$p < 10^{-5}$	Sign-Test	$p = 0,000301$
150 / 15	CS + 30 Min Saccharose	$p = 0,00020$	Sign-Test	$p = 0,000301$
150 / 15	CS naiv	$p = 0,00003$	Sign-Test	$p = 0,000301$
150 / 15	CS + 30 Min L-NNA	$p = 0,02992$	Sign-Test	$p = 0,121335$

Tab. 33a: Statistische Analyse für die Abb. 20C: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
160 / 16	CS naiv	$Z = 0,533114$	$p = 0,593955$
160 / 16	CS + 5 Min Saccharose		
160 / 16	CS naiv	$Z = 3,516196$	$p = 0,000438$
160 / 16	CS + 5 Min L-NNA (100 μ M)		

Tab. 33b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 20C). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
160 / 16	CS naiv	$p = 0,00001$	Sign-Test	$p = 0,000177$
160 / 16	CS + 5 Min Saccharose	$p = 0,03620$	Sign-Test	$p = 0,000177$
160 / 16	CS naiv	$p = 0,00001$	Sign-Test	$p = 0,000177$
160 / 16	CS + 5 Min L-NNA (100 μ M)	$p = 0,01643$	Sign-Test	$p = 0,001154$

Tab. 34a: Statistische Analyse für die Abb. 20D: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
160 / 16	CS naïv	Z = 2,201398	p = 0,027709
160 / 16	CS + 5 Min Saccharose		
160 / 16	CS naïv	Z = 3,059412	p = 0,002218
160 / 16	CS + 5 Min L-NNA (10 µM)		

Tab. 34b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 20D). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
160 / 16	CS naïv	p = 0,00003	Sign-Test	p = 0,000301
160 / 16	CS + 5 Min Saccharose	p = 0,00277	Sign-Test	p = 0,000301
160 / 16	CS naïv	p = 0,00018	Sign-Test	p = 0,000301
160 / 16	CS + 5 Min L-NNA (10 µM)	p = 0,00139	Sign-Test	p = 0,000301

Tab. 35a: Statistische Analyse für Abb. 21A: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 95; Z = 2,820509.

N / n	Genotypen	p-Wert
150 / 15	w/Y;;UAS-mCD8::GFP/EB1	p = 0,003674
150 / 15	<i>Cbs</i> ^{EY04457} /Y;;EB1/III	

Tab. 35b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 21A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	w/Y;;UAS-mCD8::GFP/EB1	p = 0,11201	single t-Test	p = 0,000012
150 / 15	<i>Cbs</i> ^{EY04457} /Y;;EB1/III	p = 0,03267	Sign-Test	p = 0,605577

Tab. 36a: Statistische Analyse für Abb. 21B: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 95; Z = 3,427030.

N / n	Genotypen	p-Wert
150 / 15	CS	p = 0,000478
150 / 15	<i>Eip55E</i> ^{KGO2540}	

Tab. 36b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 21B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS	p = 0,21632	single t-Test	p < 10 ⁻⁵
150 / 15	<i>Eip55E</i> ^{KGO2540}	p = 0,02144	Sign-Test	p = 0,301700

Tab. 37a: Statistische Analyse für Abb. 24A: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 72) = 20,74925$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	ebo^{678}/X	Df(X)BSC708/X
240 / 24	ebo^{678}/X		
240 / 24	Df(X)BSC708/X	$\approx 1,0$ 0,762087	
240 / 24	$ebo^{678}/Df(X)BSC708$	0,001873 3,420771	0,000086 4,813536

Tab. 37b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %;Abb. 24A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	ebo^{678}/X	$p = 0,02214$	Sign-Test	$p = 0,000003$
240 / 24	Df(X)BSC708/X	$p = 0,00772$	Sign-Test	$p = 0,000018$
240 / 24	$ebo^{678}/Df(X)BSC708$	$p = 0,03003$	Sign-Test	$p = 0,066193$

Tab. 38a: Statistische Analyse für Abb. 24B: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 60) = 12,86436$ $p = 0,0016$.

N / n	Genotypen	ebo^{678}/X	X/X;Df(2R)Exel7157/II
200 / 20	ebo^{678}/X		
200 / 20	X/X;Df(2R)Exel7157/II	$\approx 1,0$ 0,285188	
200 / 20	ebo^{678}/X ;Df(2R)Exel7157/II	0,013607 2,838296	0,005362 3,126483

Tab. 38b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %;Abb. 24B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
200 / 20	ebo^{678}/X	$p = 0,00767$	Sign-Test	$p = 0,000022$
200 / 20	X/X; Df(2R)Exel7157/II	$p = 0,00230$	Sign-Test	$p = 0,000144$
200 / 20	ebo^{678}/X ; Df(2R)Exel7157/II	$p = 0,18267$	single t-Test	$p = 0,012993$

Tab. 39a: Statistische Analyse für Abb. 25: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(3, N = 96) = 27,82890$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	CS	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;; UAS- <i>Cbs</i> /III	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II; UAS- <i>Cbs</i> /III
240 / 24	CS			
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;; UAS- <i>Cbs</i> /III	0,001323 3,694350		
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II; UAS- <i>Cbs</i> /III	≈1,0 0,246117	0,003386 3,448233	
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;; UAS- <i>Cbs</i> /EB1	≈1,0 0,251299	0,000478 3,945649	≈1,0 0,497416

Tab. 39b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 25). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	CS	$p = 0,00293$	Sign-Test	$p = 0,000003$
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;;UAS- <i>Cbs</i> /III	$p = 0,02412$	Sign-Test	$p = 0,024745$
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II; UAS- <i>Cbs</i> /III	$p = 0,03049$	Sign-Test	$p = 0,000105$
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;;UAS- <i>Cbs</i> /EB1	$p = 0,00122$	Sign-Test	$p = 0,000018$

Tab. 40a: Statistische Analyse für die Abb. 26. Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y naiv	$Z = 1,260252$	$p = 0,207579$
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y + 24 h Saccharose		
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y naiv	$Z = 2,896605$	$p = 0,003772$
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y + 24 h Cystein		

Tab. 40b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 26). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y (Kontrolle, naiv)	$p = 0,00022$	Sign-Test	$p = 0,038867$
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y (24h Saccharose)	$p = 0,00689$	Sign-Test	$p = 0,121335$
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y (Experiment, naiv)	$p = 0,02338$	Sign-Test	≈1,0
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y (24h Cystein)	$p = 0,06436$	single t-Test	$p = 0,000019$

Tab. 41a: Statistische Analyse für Abb. 27: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 54) = 19,63765$ $p = 0,0001$.

N / n	Genotypen	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X	<i>Nos</i> ^{Δ15} /II
180 / 18	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X		
180 / 18	<i>Nos</i> ^{Δ15} /II	≈1,0 0,715097	
180 / 18	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X; <i>Nos</i> ^{Δ15} /II	0,002846 3,305337	0,000174 4,020434

Tab. 41b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 27). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
180 / 18	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X	$p = 0,02626$	Sign-Test	$p = 0,000062$
180 / 18	<i>Nos</i> ^{Δ15} /II	$p = 0,08407$	single t-Test	$p < 10^{-5}$
180 / 18	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X; <i>Nos</i> ^{Δ15} /II	$p = 0,10652$	single t-Test	$p = 0,432706$

Tab. 42a: Statistische Analyse für Abb. 28: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(3, N = 96) = 26,48007$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	CS	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /II;UAS- <i>Nos</i> /III	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /189Y;UAS- <i>Nos</i> /III
240 / 24	CS			
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /II; UAS- <i>Nos</i> /III	0,001170 3,725439		
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /189Y;UAS- <i>Nos</i> /III	≈1,0 0,520732	0,008112 3,204706	
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /II; UAS- <i>Nos</i> /EB1	≈1,0 0,862706	0,025200 2,862733	≈1,0 0,341974

Tab. 42b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 28). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	CS	$p = 0,00293$	Sign-Test	$p = 0,000003$
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /II; UAS- <i>Nos</i> /III	$p = 0,05468$	single t-Test	$p = 0,020801$
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /189Y; UAS- <i>Nos</i> /III	$p = 0,09998$	single t-Test	$p < 10^{-5}$
240 / 24	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;UAS- <i>Nos</i> /II; UAS- <i>Nos</i> /EB1	$p = 0,03240$	Sign-Test	$p = 0,002200$

Tab. 43a: Statistische Analyse für Abb. 29B: Vergleich zweier Gruppen mit dem t-Test: $t = 2,427662$.

n	Genotypen	p-Wert
4	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;189Y/UAS-mCD8::GFP	p = 0,051325
4	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/UAS-mCD8::GFP	

Tab. 43b: Statistische Analyse auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test (Abb. 29B).

n	Genotypen	Normalverteilung
4	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;189Y/UAS-mCD8::GFP	p = 0,95975
4	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/UAS-mCD8::GFP	p = 0,61922

Tab. 44a: Statistische Analyse für Abb. 30; Quantifizierung von R2 Neuronen: Vergleich zweier Gruppen mit dem tTest: $t = -0,102189$.

n	Genotypen	p-Wert
4	EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/III	p = 0,921936
4	EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/UAS- <i>dSrf</i>	

Tab. 44b: Statistische Analyse auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test (Abb. 30).

n	Genotypen	Normalverteilung
4	EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/III	p = 0,27955
4	EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/UAS- <i>dSrf</i>	p = 0,93260

Tab. 45a: Statistische Analyse für Abb. 30; Quantifizierung von (R2+R3)/R3: Vergleich zweier Gruppen mit dem tTest: $t = 0,491344$.

n	Genotypen	p-Wert
4	EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/III	p = 0,640638
4	EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/UAS- <i>dSrf</i>	

Tab. 45b: Statistische Analyse auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test (Abb. 30).

n	Genotypen	Normalverteilung
4	EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/III	p = 0,23334
4	EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/UAS- <i>dSrf</i>	p = 0,86610

Tab. 46a: Statistische Analyse für Abb. 31: Vergleich zweier Gruppen mit dem t-Test.

n	Genotypen	p-Wert
5	<i>elavAppl</i> /TM3, <i>Sb</i>	p = 0,002270
5	<i>elavAppl</i> /UAS- <i>dSrf</i>	

Tab. 46b: Statistische Analyse auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test (Abb. 31).

n	Genotypen	Normalverteilung
5	<i>elavAppl/TM3, Sb</i>	p = 0,72883
5	<i>elavAppl/UAS-dSrf</i>	p = 0,32621

Tab. 47a: Statistische Analyse für Abb. 32; Quantifizierung der Relation NOS/GFP: Vergleich zweier Gruppen mit dem t-Test: t = 1,728603.

n	Genotypen	p-Wert
6	<i>elav UAS-mCD8::GFP;;UAS-/III</i>	p = 0,114573
6	<i>EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/UAS-dSrf + dMrjf</i>	

Tab. 47b: Statistische Analyse auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test (Abb. 32).

n	Genotypen	Normalverteilung
6	<i>elav UAS-mCD8::GFP;;UAS-/III</i>	p = 0,29703
6	<i>EB1-GAL4;UAS-mCD8::GFP/UAS-dSrf + dMrjf</i>	p = 0,12877

Tab. 48: Statistische Analyse für Abb. 33: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet. Vergleich zweier Gruppen mit dem t-Test: t = 2.956035. Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 0; Z = 1,992633.

n	Genotypen (CSE)	Normalverteilung	t-Test
3	CS	p = 0,69304	p = 0,041718
3	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸	p = 0,35155	
n	Genotypen (CBS)	Normalverteilung	Mann-Whitney-U-Test
3	CS	p = 0,28626	p = 0,049535
3	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸	p ≤ 0,00001	

Tab. 49a: Statistische Analyse für Abb. 35: Vergleich zweier Gruppen mit dem t-Test.

n	Genotypen	Protein	t-Wert	p-Wert
4	<i>c155</i>	actin	t = -3,69184	p = 0,010186
4	<i>c155>UAS-dSrf+dMrjf</i>			
4	<i>c155</i>	HSP90	t = -2,48901	p = 0,047225
4	<i>c155>UAS-dSrf+dMrjf</i>			
4	<i>c155</i>	CBS	t = -6,35787	p = 0,000710
4	<i>c155>UAS-dSrf+dMrjf</i>			
4	<i>c155</i>	NOS	t = -1,96970	p = 0,096391
4	<i>c155>UAS-dSrf+dMrjf</i>			

Tab. 49b: Statistische Analyse auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test (Abb. 35).

N / n	Genotypen	Protein	Normalverteilung
4	<i>c155</i>	actin	p = 0,21386
4	<i>c155>UAS-dSrf+dMrtf</i>	actin	p = 0,59727
4	<i>c155</i>	HSP90	p = 0,12822
4	<i>c155>UAS-dSrf+dMrtf</i>	HSP90	p = 0,92919
4	<i>c155</i>	CBS	p = 0,64327
4	<i>c155>UAS-dSrf+dMrtf</i>	CBS	p = 0,66758
4	<i>c155</i>	NOS	p = 0,54689
4	<i>c155>UAS-dSrf+dMrtf</i>	NOS	p = 0,80110

Tab. 50: Statistische Analyse auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test und anschließender einseitiger t-Test (Abb. 34). Die Expression des Kontrollgens *rp49* wurde auf 100% normalisiert. Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der anderen Expressionsstärken wurden gegen *rp49* gerechnet.

n	Genexpression ($\Delta\Delta\text{Ct}$)	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
3	CBS vs 1 (100 %)	p = 0,92507	single t-Test	p = 0,740905
3	CSE vs 1 (100 %)	p = 0,16344	single t-Test	p = 0,691430
3	NOS vs 1 (100 %)	p = 0,18913	single t-Test	p = 0,787503

Tab. 51a: Statistische Analyse für Abb. 36A: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 212,5; Z = -1,55678.

N / n	Genotypen	p-Wert
240 / 24	CS	p = 0,119523
240 / 24	<i>Pde6^{Mi04678}</i>	

Tab. 51b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 36A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	CS	p = 0,00293	Sign-Test	p = 0,000003
240 / 24	<i>Pde6^{Mi04678}</i>	p = 0,03940	Sign-Test	p = 0,000003

Tab. 52a: Statistische Analyse für Abb. 36B: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(2, N = 60) = 12,64977 p = 0,0018.

N / n	Genotypen	<i>ebo⁶⁷⁸/X</i>	<i>X/Y;Pde6^{Mi}/III</i>
200 / 20	<i>ebo⁶⁷⁸/Y</i>		
200 / 20	<i>X/Y;;Pde6^{Mi}/III</i>	0,004248 3,191385	
200 / 20	<i>ebo⁶⁷⁸/Y;;Pde6^{Mi}/III</i>	0,016797 2,770394	$\approx 1,0$ 0,420991

Tab. 52b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 36B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y	p = 0,16096	single t-Test	p = 0,167834
200 / 20	X/Y; <i>Pde6</i> ^{Mi} /III	p = 0,01689	Sign-Test	p = 0,000022
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;; <i>Pde6</i> ^{Mi} /III	p = 0,23812	single t-Test	p = 0,000003

Tab. 53a: Statistische Analyse für Abb. 36C: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 83,5; Z = -3,27254.

N / n	Genotypen	p-Wert
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II	p = 0,001160
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II;UAS- <i>Pde6</i> RNAi/III	

Tab. 53b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 36C). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II	p = 0,01182	Sign-Test	p = 0,502335
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y/II; UAS- <i>Pde6</i> RNAi/III	p = 0,08132	single t-Test	p = 0,000566

Tab. 54a: Statistische Analyse für die Abb. 37A. Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y naiv	Z = 0,444544	p = 0,656642
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y + 24 h Saccharose		
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y naiv	Z = 2,548236	p = 0,010827
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y + 24 h Zaprinast		

Tab. 54b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 37A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y naiv	p = 0,00107	Sign-Test	p = 0,605577
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y + 24 h Saccharose	p = 0,13371	single t-Test	p = 0,317696
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y naiv	p = 0,00729	Sign-Test	p = 0,121335
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y + 24 h Zaprinast	p = 0,02535	Sign-Test	p = 0,000301

Tab. 55a: Statistische Analyse für die Abb. 37B. Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
140 / 14	<i>Nos^{Δ15}/Y</i> naiv	Z = 0,800198	p = 0,423597
140 / 14	<i>Nos^{Δ15}/Y</i> + 24 h Saccharose		
140 / 14	<i>Nos^{Δ15}/Y</i> naiv	Z = 3,138824	p = 0,001696
140 / 14	<i>Nos^{Δ15}/Y</i> + 24 h Zaprinast		

Tab. 55b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 37B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotyp Temperaturbedingung	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
140 / 14	<i>Nos^{Δ15}/Y</i> (Kontrolle, naiv)	p = 0,00279	Sign-Test	p = 0,016157
140 / 14	<i>Nos^{Δ15}/Y</i> (24h Saccharose)	p = 0,05501	single t-Test	p = 0,046548
140 / 14	<i>Nos^{Δ15}/Y</i> (Experiment, naiv)	p = 0,01481	Sign-Test	p = 0,422678
140 / 14	<i>Nos^{Δ15}/Y</i> (24h Cystein)	p = 0,00134	Sign-Test	p = 0,003283

Tab. 56a: Statistische Analyse für Abb. 39: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 100; Z = 2,012757.

N / n	Genotypen	p-Wert
180 / 18	UAS- <i>Gyca</i> RNAi/III	p = 0,044141
180 / 18	189Y/II;UAS- <i>Gyca</i> RNAi/III	

Tab. 56b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 39). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
180 / 18	UAS- <i>Gyca</i> RNAi/III	p = 0,01257	Sign-Test	p = 0,000407
180 / 18	189Y/II;UAS- <i>Gyca</i> RNAi/III	p = 0,23010	single t-Test	p = 0,002677

Tab. 57a: Statistische Analyse für Abb. 41A: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(2, N = 45) = 28,94256 p = 0,0000.

N / n	Genotypen	Df(3R)BSC ⁵⁴⁷ /III	<i>Nos^C/II</i>
150 / 15	Df(3R)BSC ⁵⁴⁷ /III		
150 / 15	<i>Nos^C/II</i>	0,334383 1,591660	
150 / 15	<i>Nos^C/II</i> ;Df(3R)BSC ⁵⁴⁷ /III	0,001243 3,530844	0,000001 5,122504

Tab. 57b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 41A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	Df(3R)BSC ⁵⁴⁷ /III	p = 0,00433	Sign-Test	p = 0,000301
150 / 15	Nos ^{c4} /II	p = 0,03425	Sign-Test	p = 0,000301
150 / 15	Nos ^{c4} /II;Df(3R)BSC ⁵⁴⁷ /III	p = 0,01256	Sign-Test	p = 0,301700

Tab. 58a: Statistische Analyse für Abb. 41B: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(2, N = 45) = 19,55176 p = 0,0001.

N / n	Genotypen	Nos ^C /II	for ⁰² /II
150 / 15	Nos ^C /II		
150 / 15	for ⁰² /II	≈1,0 0,069505	
150 / 15	Nos ^C /for ⁰²	0,000653 3,697656	0,000495 3,767160

Tab. 58b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 41B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	Nos ^C /II	p = 0,03425	Sign-Test	p = 0,000301
150 / 15	for ⁰² /II	p = 0,02875	Sign-Test	p = 0,000301
150 / 15	Nos ^C /for ⁰²	p = 0,58731	single t-Test	p = 0,365430

Tab. 59a: Statistische Analyse Abb. 42: Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(4, N = 125) = 54,90819$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	CS	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y;189Y/II	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y;c42/III	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y;R28D01/III
250 / 25	CS				
250 / 25	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y;189Y/II	≈1,0 0,634335			
250 / 25	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y;c42/III	0,000006 4,986849	0,000135 4,352514		
250 / 25	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y;R28D01/III	0,000004 5,068825	0,000092 4,434490	≈1,0 0,081976	
250 / 25	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y;ftz-ng/III	0,000008 4,934151	0,000171 4,299816	≈1,0 0,052699	≈1,0 0,134674

Tab. 59b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 42). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
250 / 25	CS	p = 0,04348	Sign-Test	p = 0,000002
250 / 25	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y; 189Y/II	p = 0,02517	Sign-Test	p = 0,000011
250 / 25	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y; c42/III	p = 0,04927	Sign-Test	p = 0,230139
250 / 25	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y; R28D01/III	p = 0,00364	Sign-Test	p = 0,423711
250 / 25	UAS- <i>ign</i> ²⁻¹ <i>ign</i> ^{58/1} /Y; ftz-ng/III	p = 0,08692	single t-Test	p = 0,202827

Tab. 60a: Statistische Analyse für Abb. 43: Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 81) = 30,38261$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	$ign^{58/1}/X;for^R/for^{189Y}$	$X/X;for^s/for^{189Y}$
270 / 27	$ign^{58/1}/X;for^R/for^{189Y}$		
270 / 27	$X/X;for^s/for^{189Y}$	0,018336 2,741717	
270 / 27	$ign^{58/1}/X;for^s/for^{189Y}$	$< 10^{-5}$ 5,370642	0,025697 2,628925

Tab. 60b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 43). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
270 / 27	$ign^{58/1}/X;for^R/for^{189Y}$	$p = 0,01818$	Sign-Test	$p = 0,000004$
270 / 27	$X/X;for^s/for^{189Y}$	$p = 0,00078$	Sign-Test	$p = 0,000004$
270 / 27	$ign^{58/1}/X;for^s/for^{189Y}$	$p = 0,01829$	Sign-Test	$p = 0,123658$

Tab. 61a: Statistische Analyse für Abb. 44A: Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 72) = 21,32828$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	for^s/for^{189Y}	$for^s;UAS-ign/III$
240 / 24	for^s/for^{189Y}		
240 / 24	$for^s;UAS-ign/III$	0,333385 1,593141	
240 / 24	$for^s/for^{189Y};UAS-ign/III$	0,012901 2,855240	0,000026 4,448382

Tab. 61b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 44A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	for^s/for^{189Y}	$p = 0,12590$	single t-Test	$p = 0,002200$
240 / 24	$for^s;UAS-ign/III$	$p = 0,00342$	Sign-Test	$p = 0,066193$
240 / 24	$for^s/for^{189Y};UAS-ign/III$	$p = 0,00913$	Sign-Test	$p = 0,000018$

Tab. 62a: Statistische Analyse für Abb. 44B: Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(3, N = 90) = 33,64177$ $p = 0,000$.

N / n	Genotypen	CS	<i>ign</i> ^{58/1} / <i>Y</i> :: UAS- <i>for</i> /III	<i>ign</i> ^{58/1} / <i>Y</i> :: <i>for</i> ^{189Y} /II; UAS- <i>for</i> /III
240 / 24	CS			
210 / 21	<i>ign</i> ^{58/1} / <i>Y</i> ::UAS- <i>for</i> /III	0,000010 4,792407		
240 / 24	<i>ign</i> ^{58/1} / <i>Y</i> :: <i>for</i> ^{189Y} /II; UAS- <i>for</i> /III	0,002387 3,541491	≈1,0 1,371002	
210 / 21	<i>ign</i> ^{58/1} / <i>Y</i> ::UAS- <i>for</i> /c232	0,000006 4,908309	≈1,0 0,112222	0,822241 1,486904

Tab. 62b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 44B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
240 / 24	CS	$p = 0,00043$	Sign-Test	$p < 10^{-5}$
210 / 21	<i>ign</i> ^{58/1} / <i>Y</i> ::UAS- <i>for</i> /III	$p = 0,00341$	Sign-Test	$p = 0,029096$
240 / 24	<i>ign</i> ^{58/1} / <i>Y</i> :: <i>for</i> ^{189Y} /II;UAS- <i>for</i> /III	$p = 0,07542$	single t-Test	$p = 0,000520$
210 / 21	<i>ign</i> ^{58/1} / <i>Y</i> ::UAS- <i>for</i> /c232	$p = 0,05215$	single t-Test	$p \approx 1,0$

Tab. 63a: Statistische Analyse für Abb. 45A: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(4, N = 75) = 5,161951$ $p = 0,2711$.

N / n	Genotypen	CS	c105 > <i>dCreb2-b</i>	c42 > <i>dCreb2-b</i>	189Y > <i>dCreb2-b</i>
150 / 15	CS				
150 / 15	c105 > <i>dCreb2-b</i>	≈1,0 0,330895			
150 / 15	c42 > <i>dCreb2-b</i>	≈1,0 0,917290	≈1,0 0,586395		
150 / 15	189Y > <i>dCreb2-b</i>	0,561366 1,909974	≈1,0 1,579079	≈1,0 0,992684	
150 / 15	ftz-ng > <i>dCreb2-b</i>	≈1,0 0,129845	≈1,0 0,201050	≈1,0 0,787445	0,750548 1,780129

Tab. 63b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 45A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS	$p = 0,01204$	Sign-Test	$p = 0,000301$
150 / 15	c105 > <i>dCreb2-b</i>	$p = 0,00766$	Sign-Test	$p = 0,038867$
150 / 15	c42 > <i>dCreb2-b</i>	$p = 0,26431$	single t-Test	$p = 0,000098$
150 / 15	189Y > <i>dCreb2-b</i>	$p = 0,33271$	single t-Test	$p = 0,005259$
150 / 15	ftz-ng > <i>dCreb2-b</i>	$p = 0,04088$	Sign-Test	$p = 0,001946$

Tab. 64a: Statistische Analyse für die Abb. 45B: Die abhängigen Daten wurden mit dem gepaarten t-Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotyp	t-Wert	p-Wert
150 / 15	189Y> <i>Tub</i> GAL80 ^{ts} > UAS- <i>dCreb2-b</i> 18°C vs 30°C	t = 4,490096	p = 0,000509

Tab. 64b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 45B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet. Der Genotyp 189Y>*Tub*GAL80^{ts} > UAS-*dCreb2-b* wurde bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet.

N / n	Genotyp Temperaturbedingung	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	18°	p = 0,13359	single t-Test	p = 0,000003
150 / 15	30°	p = 0,24607	single t-Test	p = 0,243425

Tab. 65a: Statistische Analyse für Abb. 46: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(5, N = 120) = 45,74372$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	CS	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i>	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>c105</i> :: UAS- <i>Creb17a</i> /III	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i> :: UAS- <i>Creb17a</i> /c42	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i> ;189Y/II; UAS- <i>Creb17a</i> /III
200 / 20	CS					
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i>	0,001097 3,965909				
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>c105</i> ::UAS- <i>Creb17a</i> /III	0,000632 4,095455	≈1,0 0,129545			
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i> ::UAS- <i>Creb17a</i> /c42	0,000791 4,043182	≈1,0 0,077273	≈1,0 0,052273		
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i> ;189Y/II;UAS- <i>Creb17a</i> /III	≈1,0 0,750000	0,019505 3,215909	0,012322 3,345455	0,014859 3,293182	
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i> ::UAS- <i>Creb17a</i> /ftz-ng	0,000003 5,200000	≈1,0 1,234091	≈1,0 1,104545	≈1,0 1,156818	0,000129 4,450000

Tab. 65b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 46). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
200 / 20	CS	p = 0,05323	single t-Test	p < 10 ⁻⁵
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i>	p = 0,37534	single t-Test	p = 0,034499
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>c105</i> ::UAS- <i>Creb17a</i> /III	p = 0,02186	Sign-Test	p = 0,117525
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i> ::UAS- <i>Creb17a</i> /c42	p = 0,17607	single t-Test	p = 0,020118
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i> ;189Y/II;UAS- <i>Creb17a</i> /III	p = 0,14741	single t-Test	p < 10 ⁻⁵
200 / 20	<i>Creb</i> ^{S162} / <i>X</i> ::UAS- <i>Creb17a</i> /ftz-ng	p = 0,03069	Sign-Test	p = 0,823063

Tab. 66a: Statistische Analyse für Abb. 47: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 45) = 16,16458$ $p = 0,0003$.

N / n	Genotypen	<i>ign</i> ^{58/1} /X;189Y/II; TM3, Sb/III	<i>ign</i> ^{58/1} /X;; UAS- <i>Creb17a</i> /III
150 / 15	<i>ign</i> ^{58/1} /X;189Y/II; TM3, Sb/III		
150 / 15	<i>ign</i> ^{58/1} /X;; UAS- <i>Creb17a</i> /III	≈1,0 0,208514	
150 / 15	<i>ign</i> ^{58/1} /X;189Y/II; UAS- <i>Creb17a</i> /III	0,002958 3,294528	0,001380 3,503042

Tab. 66b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 47). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	<i>ign</i> ^{58/1} /X;189Y/II; TM3, Sb/III	p = 0,06789	single t-Test	p = 0,405613
150 / 15	<i>ign</i> ^{58/1} /X;;UAS- <i>Creb17a</i> /III	p = 0,01480	Sign-Test	p = 0,605577
150 / 15	<i>ign</i> ^{58/1} /X;189Y/II; UAS- <i>Creb17a</i> /III	p = 0,15343	single t-Test	p = 0,000009

Tab. 67a: Statistische Analyse für Abb. 48A: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 60) = 18,70663$ $p = 0,0001$.

N / n	Genotypen	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;;UAS- <i>ign</i> /III	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;189Y/II
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;;UAS- <i>ign</i> /III		
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;189Y/II	≈1,0 0,737866	
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;189Y/II; UAS- <i>ign</i> /III	0,003628 3,236653	0,000212 3,974519

Tab. 67b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 48A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;;UAS- <i>ign</i> /III	p = 0,14465	single t-Test	p = 0,353452
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;189Y/II	p = 0,00970	Sign-Test	p = 0,177525
200 / 20	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /X;189Y/II;UAS- <i>ign</i> /III	p = 0,04393	Sign-Test	p = 0,000144

Tab. 68a: Statistische Analyse für die Abb. 48B: Die abhängigen Daten wurden mit dem gepaarten t-Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotyp	t-Wert	p-Wert
150 / 15	<i>ebo</i> ⁶⁷⁸ /Y;189Y> <i>TubGAL80</i> ^{ts} /II;UAS- <i>CrebB-17A</i> /III 18°C vs 25°C	t = -3,74166	p = 0,002813

Tab. 68b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 48B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet. Der Genotyp *ebo*⁶⁷⁸/*Y*;189*Y*>*Tub*GAL80^{ts}/*II*;UAS-*Crebb*-17A/*III* wurde bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet.

N / n	Genotyp Temperaturbedingung	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	18°	p = 0,12170	single t-Test	p = 0,713181
150 / 15	25°	p = 0,12170	single t-Test	p = 0,000198

Tab. 69a: Statistische Analyse für Abb. 49B: Vergleich zweier Gruppen mit dem t-Test: t = 2,192496.

n	Genotypen	p-Wert
9	CS	p = 0,043474
9	<i>ign</i> ^{58/1}	

Tab. 69b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 49B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

n	Genotypen	Normalverteilung
9	CS	p = 0,13283
9	<i>ign</i> ^{58/1}	p = 0,09733

Tab. 70a: Statistische Analyse für Abb. 51: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(2, N = 51) = 28,07779p = 0,0000.

N / n	Genotypen	CS	<i>homer</i> ^{R102}
180 / 18	CS		
180 / 18	<i>homer</i> ^{R102}	0,000001 5,162764	
150 / 15	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{EP2141}	0,003668 3,233565	0,273695 1,688937

Tab. 70b: Normalverteilung Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 51). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
180 / 18	CS	p = 0,04028	Sign-Test	p = 0,000062
180 / 18	<i>homer</i> ^{R102}	p = 0,08463	single t-Test	p = 0,087684
150 / 15	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{EP2141}	p = 0,26771	single t-Test	p = 0,167109

Tab. 71a: Statistische Analyse für Abb. 52A: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(6, N = 1263) = 53,91400 p = 0,0000.

N / n	Genotypen	CS	<i>homer</i> ^{R102}	UAS- <i>homer</i> RNAi/ UAS- <i>dsRed</i>	c105/Y;; /UAS- <i>homer</i> RNAi	EB1/UAS- <i>homer</i> RNAi	189Y/II; /UAS- <i>homer</i> RNAi/III
180/ 18	CS						
180/ 18	<i>homer</i> ^{R102}	0,000011 5,011348					
180/ 18	UAS- <i>homer</i> RNAi/UAS- <i>dsRed</i>	≈1,0 0,889994	0,000791 4,121355				
180/ 18	c105/Y;;UAS- <i>homer</i> RNAi/III	≈1,0 0,465535	0,000115 4,545813	≈1,0 0,424458			
180/ 18	EB1/UAS- <i>homer</i> RNAi	≈1,0 0,759918	0,000446 4,251431	≈1,0 0,130076	≈1,0 0,294382		
180/ 18	189Y/II; UAS- <i>homer</i> RNAi/III	0,000499 4,226328	≈1,0 0,785020	0,017827 3,336335	0,003557 3,760793	0,011077 3,466411	
180/ 18	ftz-ng/UAS- <i>homer</i> RNAi	≈1,0 0,116384	0,000021 4,894964	≈1,0 0,773610	≈1,0 0,349151	≈1,0 0,643534	0,000831 4,109944

Tab. 71b: Normalverteilung Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 52A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
180/ 18	CS	p = 0,04028	Sign-Test	p = 0,000062
180/ 18	<i>homer</i> ^{R102}	p = 0,08463	single t-Test	p = 0,087684
180/ 18	UAS- <i>homer</i> RNAi/UAS- <i>dsRed</i>	p = 0,03344	Sign-Test	p = 0,000062
180/ 18	c105/Y;; UAS- <i>homer</i> RNAi/III	p = 0,01053	Sign-Test	p = 0,000062
180/ 18	EB1/UAS- <i>homer</i> RNAi	p = 0,01928	Sign-Test	p = 0,000407
180/ 18	189Y/II; UAS- <i>homer</i> RNAi /III	p = 0,19883	single t-Test	p = 0,954521
180/ 18	ftz-ng/UAS- <i>homer</i> RNAi	p = 0,07106	single t-Test	p = 0,000001

Tab. 72a: Statistische Analyse für die Abb. 52B: Die abhängigen Daten wurden mit dem gepaarten t-Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotyp	t-Wert	p-Wert
140 / 14	189Y> <i>Tub</i> GAL80 ^{ts} /II;UAS- <i>homer</i> RNAi/III 18°C vs 30°C	t = 5,094945	p = 0,000206

Tab. 72b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 52). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet. Der Genotyp 189Y>*Tub*GAL80^{ts}/II; UAS-*homer*RNAi/III wurde bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet.

N / n	Genotyp Temperaturbedingung	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	18°	p = 0,21727	single t-Test	p = 0,000073
150 / 15	30°	p = 0,19034	single t-Test	p = 0,389649

Tab. 73a: Statistische Analyse für Abb. 53: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(3, N = 72) = 39,38438p = 0,0000.

N / n	Genotypen	CS	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{E2141P} ; UAS- <i>homer</i> /III	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{EP2141} 189Y
180 / 18	CS			
180 / 18	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{E2141P} ; UAS- <i>homer</i> /III	0,000094 4,320275		
180 / 18	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{EP2141} 189Y	p < 10 ⁻⁵ 5,534731	≈1,0 1,214455	
180 / 18	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{EP2141} 189Y, UAS- <i>homer</i> /III	0,600448 1,644492	0,044733 2,675784	0,000601 3,890239

Tab. 73b: Normalverteilung Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 53). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
180 / 18	CS	p = 0,04028	Sign-Test	p = 0,000062
180 / 18	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{E2141P} ; UAS- <i>homer</i> /III	p = 0,11746	single t-Test	p = 0,298748
180 / 18	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{EP2141} 189Y	p = 0,05478	single t-Test	p = 0,162649
180 / 18	<i>homer</i> ^{R102} / <i>homer</i> ^{EP2141} 189Y; UAS- <i>homer</i> /III	p = 0,01610	Sign-Test	p = 0,000407

Tab. 74a: Statistische Analyse für die Abb. 54: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotyp	Z-Wert	p-Wert
120 / 12	189Y> <i>TubGAL80</i> ^{ts} /II;UAS- <i>rut</i> RNAi/III 18°C vs 30°C	Z = 2,711781	p = 0,006693

Tab. 74b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 54). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet. Der Genotyp 189Y>*TubGAL80*^{ts}/II; UAS-*rut*RNAi/III wurde bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet.

N / n	Genotyp Temperaturbedingung	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
120 / 12	18°	p = 0,01099	Sign-Test	p = 0,043308
120 / 12	30°	p = 0,78683	single t-Test	p = 0,787196

Tab. 75a: Statistische Analyse für die Abb. 55A: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotyp	Z-Wert	p-Wert
120 / 12	189Y> <i>TubGAL80</i> ^{ts} /II; UAS- <i>Pka-CIR</i> NAi/III 18°C vs 30°C	Z = 2,000494	p = 0,045448

Tab. 75b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 55A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet. Der Genotyp 189Y>*TubGAL80*^{ts}/II; UAS-*Pka-CIR*NAi/III wurde bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet.

N / n	Genotyp Temperaturbedingung	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
120 / 12	18°	p = 0,01526	Sign-Test	p = 0,001496
120 / 12	30°	p = 0,05882	single t-Test	p = 0,048668

Tab. 76a: Statistische Analyse für die Abb. 55B: Die abhängigen Daten wurden mit dem gepaarten t-Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotyp	t-Wert	p-Wert
120 / 12	189Y> <i>Tub</i> GAL80 ^{ts} /II; UAS- <i>Pka</i> -C2RNAi/III 18°C vs 30°C	t = 1,483240	p = 0,166087

Tab. 76b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 55B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet. Der Genotyp 189Y>*Tub*GAL80^{ts}/II; UAS-*Pka*-C1RNAi/III wurde bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet.

N / n	Genotyp Temperaturbedingung	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
120 / 12	18°	p = 0,13432	single t-Test	p = 0,000023
120 / 12	30°	p = 0,35624	single t-Test	p = 0,006035

Tab. 77a: Statistische Analyse für die Abb. 55C: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotyp	Z-Wert	p-Wert
120 / 12	189Y> <i>Tub</i> GAL80 ^{ts} /II; UAS- <i>Pka</i> -C3RNAi/III 18°C vs 30°C	Z = 2,073221	p = 0,038153

Tab. 77b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 55C). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet. Der Genotyp 189Y>*Tub*GAL80^{ts}/II; UAS-*Pka*-C1RNAi/III wurde bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet.

N / n	Genotyp Temperaturbedingung	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
120 / 12	18°	p = 0,07350	single t-Test	p = 0,000123
120 / 12	30°	p = 0,01104	Sign-Test	p = 0,026500

Tab. 78a: Statistische Analyse für Abb. 56: Vergleich zweier Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test: U = 46; Z = 2,856579.

N / n	Genotypen	p-Wert
150 / 15	CS	p = 0,004283
150 / 15	<i>Pka</i> -C1 ^{H2} /II	

Tab. 78b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 56A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS	p = 0,05176	single t-Test	p < 10 ⁻⁵
150 / 15	<i>Pka</i> -C1 ^{H2} /II	p = 0,03038	Sign-Test	p = 0,000301

Tab. 79a: Statistische Analyse für Abb. 56B: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: One-way ANOVA: MS = 148,68; df = 39.

N / n	Genotypen	CS	<i>PKA-C3^{BRL10}</i>
150 / 15	CS		
150 / 15	<i>PKA-C3^{BRL10}</i>	0,000007	
120 / 12	<i>189Y/II;PKA-C3^{BRL10}/PKA-C3^{BRL10} UAS-Pka-C3</i>	0,001958	0,411555

Tab. 79b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 56B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS	p = 0,05163	single t-Test	p < 10 ⁻⁵
150 / 15	<i>PKA-C3^{BRL10}</i>	p = 0,05900	single t-Test	p = 0,838813
120 / 12	<i>189Y/II;PKA-C3^{BRL10}/PKA-C3^{BRL10} UAS-Pka-C3</i>	p = 0,81129	single t-Test	p = 0,074809

Tab. 80a: Statistische Analyse für Abb. 57: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: H(3, N = 60) = 23,08845 p = 0,0000.

N / n	Genotypen	CS	<i>Pka-C1^{H2}/II</i>	<i>CrebB^{S162}/X</i>
150 / 15	CS			
150 / 15	<i>Pka-C1^{H2}/II</i>	0,034140 2,765127		
150 / 15	<i>CrebB^{S162}/X</i>	0,000099 4,307117	0,738457 1,541990	
150 / 15	<i>CrebB^{S162}/X;Pka-C1^{H2}/II</i>	0,001551 3,653732	≈1,0 0,888604	≈1,0 0,653385

Tab. 80b: Normalverteilung Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 57). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS	p = 0,05176	single t-Test	p < 10 ⁻⁵
150 / 15	<i>Pka-C1^{H2}/II</i>	p = 0,03038	Sign-Test	p = 0,000301
150 / 15	<i>CrebB^{S162}/X</i>	p = 0,14337	single t-Test	p = 0,057158
150 / 15	<i>CrebB^{S162}/X;Pka-C1^{H2}/II</i>	p = 0,00024	Sign-Test	p = 0,001946

Tab. 81a: Statistische Analyse für Abb. 58: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(4, N = 90) = 45,60347$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	CS	<i>Syn</i> ⁹⁷	UAS- <i>Syn</i> /II; <i>Syn</i> ⁹⁷	189Y/II; <i>Syn</i> ⁹⁷
150 / 15	CS				
150 / 15	<i>Syn</i> ⁹⁷	0,022061 3,060992			
200 / 20	UAS- <i>Syn</i> /II; <i>Syn</i> ⁹⁷	0,005438 3,458181	≈1,0 0,185843		
200 / 20	189Y/II; <i>Syn</i> ⁹⁷	0,000004 5,077540	0,710430 1,805202	0,802724 1,749108	
200 / 20	UAS- <i>Syn</i> /189Y; <i>Syn</i> ⁹⁷	≈1,0 0,020525	0,011468 3,251792	0,002048 3,713071	< 10 ⁻⁵ 5,462178

Tab. 81b: Normalverteilung Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %;Abb. 58). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS	p = 0,21632	single t-Test	p = 0,000001
150 / 15	<i>Syn</i> ⁹⁷	p = 0,01356	Sign-Test	p = 0,009823
200 / 20	UAS- <i>Syn</i> /II; <i>Syn</i> ⁹⁷	p = 0,07511	single t-Test	p = 0,273142
200 / 20	189Y/II; <i>Syn</i> ⁹⁷	p = 0,24035	single t-Test	p = 0,080606
200 / 20	UAS- <i>Syn</i> /189Y; <i>Syn</i> ⁹⁷	p = 0,00959	Sign-Test	p = 0,000022

Tab. 82a: Statistische Analyse für Abb. 59: Multipler Vergleich mit Bonferroni-Korrektur: p-Werte (oberer Wert), z-Werte (unterer Wert). Kruskal-Wallis Analyse: $H(2, N = 75) = 31,37427$ $p = 0,0000$.

N / n	Genotypen	<i>Pka-CI</i> ^{H2} /II	<i>Syn</i> ⁹⁷ /III
250 / 25	<i>Pka-CI</i> ^{H2} /II		
250 / 25	<i>Syn</i> ⁹⁷ /III	0,014580 2,816164	
250 / 25	<i>Pka-CI</i> ^{H2} /II; <i>Syn</i> ⁹⁷ /III	0,024098 2,650698	< 10 ⁻⁵ 5,466862

Tab. 82b: Normalverteilung Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %;Abb. 59). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
250 / 25	<i>Pka-CI</i> ^{H2} /II	p = 0,00311	Sign-Test	p = 0,000002
250 / 25	<i>Syn</i> ⁹⁷ /III	p = 0,02715	Sign-Test	p = 0,000002
250 / 25	<i>Pka-CI</i> ^{H2} /II; <i>Syn</i> ⁹⁷ /III	p = 0,03869	Sign-Test	p = 0,109599

Tab. 83a: Statistische Analyse für die Abb. 60A: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
150 / 15	CS naiv	Z = 1,943855	p = 0,051914
150 / 15	CS + 2 h Saccharose		
160 / 16	CS naiv	Z = 3,407771	p = 0,000655
160 / 16	CS + 2 h Rp-cAMPS		

Tab. 83b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 60A). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS naiv	p = 0,00130	Sign-Test	p = 0,000301
150 / 15	CS + 2 h Saccharose	p = 0,01199	Sign-Test	p = 0,001946
160 / 16	CS naiv	p = 0,00003	Sign-Test	p = 0,000177
160 / 16	CS + 2 h Rp-cAMPS	p = 0,36269	single t-Test	p = 0,095905

Tab. 84a: Statistische Analyse für die Abb. 60B: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
160 / 16	CS naiv	Z = 2,222771	p = 0,02632
160 / 16	CS + 30 Min Saccharose		
180 / 18	CS naiv	Z = 3,337337	p = 0,000846
180 / 18	CS + 30 Min Rp-cAMPS		

Tab. 84b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 60B). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
160 / 16	CS naiv	p = 0,00358	Sign-Test	p = 0,000177
160 / 16	CS + 30 Min Saccharose	p = 0,02381	Sign-Test	p = 0,001154
180 / 18	CS naiv	p = 0,00069	Sign-Test	p = 0,000062
180 / 18	CS + 30 Min Rp-cAMPS	p = 0,00496	Sign-Test	p = 0,813664

Tab. 85a: Statistische Analyse für die Abb. 60C: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
160 / 16	CS naiv	Z = 2,366432	p = 0,017961
160 / 16	CS + 5 Min Saccharose		
160 / 16	CS naiv	Z = 3,464488	p = 0,000531
160 / 16	CS + 5 Min Rp-cAMPS (200 µM)		

Tab. 85b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 60C). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
160 / 16	CS naiv	p = 0,00009	Sign-Test	p = 0,000177
160 / 16	CS + 5 Min Saccharose	p = 0,01332	Sign-Test	p = 0,000177
160 / 16	CS naiv	p = 0,00001	Sign-Test	p = 0,000177
160 / 16	CS + 5 Min Rp-cAMPS (200 µM)	p = 0,01611	Sign-Test	p = 0,802587

Tab. 86a: Statistische Analyse für die Abb. 60D: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
100 / 10	CS naiv	Z = 2,022600	p = 0,043115
100 / 10	CS + 5 Min Saccharose		
100 / 10	CS naiv	Z = 2,803060	p = 0,005062
100 / 10	CS + 5 Min Rp-cAMPS (100 µM)		

Tab. 86b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 60D). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
100 / 10	CS naiv	p = 0,00005	Sign-Test	p = 0,004427
100 / 10	CS + 5 Min Saccharose	p < 10 ⁻⁵	Sign-Test	p = 0,004427
100 / 10	CS naiv	p = 0,00022	Sign-Test	p = 0,004427
100 / 10	CS + 5 Min Rp-cAMPS (100 µM)	p = 0,03586	Sign-Test	p = 0,004427

Tab. 87a: Statistische Analyse für die Abb. 60E: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
150 / 15	CS naiv	Z = 1,540308	p = 0,123486
150 / 15	CS + 5 Min Saccharose		
150 / 15	CS naiv	Z = 2,665570	p = 0,007686
150 / 15	CS + 5 Min Rp-cAMPS (50 µM)		

Tab. 87b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 60E). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
150 / 15	CS naiv	p = 0,00002	Sign-Test	p = 0,000301
150 / 15	CS + 5 Min Saccharose	p = 0,17073	single t-Test	p = 0,000003
150 / 15	CS naiv	p = 0,00001	Sign-Test	p = 0,000301
150 / 15	CS + 5 Min Rp-cAMPS (50 µM)	p = 0,08240	single t-Test	p = 0,000020

Tab. 88a: Statistische Analyse für die Abb. 60F: Die abhängigen Daten wurden mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test gegeneinander getestet.

N / n	Genotypen	Z-Wert	p-Wert
100 / 10	CS naiv	Z = 1,690309	p = 0,090970
100 / 10	CS + 5 Min Saccharose		
100 / 10	CS naiv	Z = 1,213560	p = 0,224917
100 / 10	CS + 5 Min Rp-cAMPS (10 μ M)		

Tab. 88b: Statistischer Vergleich zum Zufallsniveau (58 %; Abb. 60F). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung getestet.

N / n	Genotypen	Normalverteilung	Statistischer Test	p-Wert
100 / 10	CS naiv	p = 0,00022	Sign-Test	p = 0,004427
100 / 10	CS + 5 Min Saccharose	p = 0,01669	Sign-Test	p = 0,004427
100 / 10	CS naiv	p < 10 ⁻⁵	Sign-Test	p = 0,004427
100 / 10	CS + 5 Min Rp-cAMPS (10 μ M)	p = 0,03586	Sign-Test	p = 0,004427

