

Netzwerk- und epigenetische Analyse eines
Ultralangzeitgedächtnisses bei *Drosophila melanogaster*

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Laura Spindler

geboren am 16.04.1988 in Idar-Oberstein

Mainz, August 2019

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Tag der mündlichen Prüfung 29. November 2019

Diese Dissertation wurde im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Eine Einführung in die Gedächtnisforschung	1
1.2	Synaptische Plastizität	2
1.3	<i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus der Neurobiologie	10
1.3.1	Werkzeuge der <i>Drosophila</i> -Forschung	10
1.4	Der Zentralkomplex	14
1.5	Langzeitgedächtnisse	17
1.5.1	Das Körpergrößengedächtnis	18
1.6	Mechanismen der Gedächtnisaufrechterhaltung	23
1.7	Zielsetzung	28
2	Material und Methoden	30
2.1	Zucht	30
2.1.1	Fliegenstämme	30
2.1.2	Fliegenhaltung	34
2.1.3	Kreuzungen	35
2.2	Das Lückenüberwindungsparadigma	35
2.3	Training naiver Fliegen	38
2.4	Spatio-temporale Versuchsreihen unter Verwendung von R55G08- <i>Tub>GAL80^{ts}</i>	39
2.5	Pharmakologische Behandlung mit Cycloheximid	41
2.6	Polymerase-Kettenreaktion	42
2.7	Immunhistochemie	44
2.7.1	Methodik	44
2.7.2	Antikörper	46
2.7.3	Standard-Protokoll AG Strauß	46
2.7.4	Protokoll nach Wilson und Laurent, 2005:	47
2.7.5	Protokoll nach Pech et al., 2013: GRASP	48
2.7.6	Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung	48
2.8	Chemikalien/ Lösungen	49
2.9	Statistik und Graphikbearbeitung	49

3	Ergebnisse	51
3.1	Δ 7-Neurone	51
3.2	Die Konnektivität der Δ 7-Neurone	53
3.2.1	Visualisierung postsynaptischer Partner der Δ 7-Neurone	53
3.2.2	Detektion synaptischer Kontakte zwischen Δ 7- und PFN-Neuronen ...	56
3.2.3	Identifizierung alternativer PFN-Treiber	62
3.3	Phasen der Gedächtnisbildung.....	66
3.3.1	Das Erlernen der Körpergröße bedarf keiner sensiblen Lebensphase	66
3.3.2	Der Abruf der Körpergröße ist 12 Stunden nach dem Lernen möglich	68
3.3.3	Die Konsolidierung und Aufrechterhaltung der Körpergröße ist Proteinbiosynthese-abhängig	69
3.4	Die Konsolidierung und Gedächtnisaufrechterhaltung der Körpergröße bedarf dCREB2	71
3.5	Die Analyse der dCREB2 Co-Aktivatoren dCBP und CRTC.....	74
3.6	Epigenetische Mechanismen der Gedächtnisaufrechterhaltung.....	83
3.6.1	Screen epigenetischer Faktoren.....	83
3.6.2	PcG Proteine	92
3.6.3	MSL-Komplex.....	96
4	Diskussion	102
4.1	„Lebenslange“ Gedächtnisse bei Insekten	102
4.2	Körpergrößengedächtnisse bei Insekten	104
4.3	Regulation der Transkription.....	105
4.4	Epigenetische Regulation.....	109
4.5	Funktionelle und strukturelle Plastizität	113
5	Zusammenfassung	118
6	Summary	119
7	Literatur	120
8	Verzeichnisse	137
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	137

8.2	Tabellenverzeichnis.....	138
8.3	Abkürzungsverzeichnis.....	142
9	Anhang.....	147
9.1	$\Delta 7$ -Neurone.....	147
9.2	Identifizierung alternativer PFN-Treiber.....	147
9.3	Phasen der Gedächtnisbildung.....	151
9.3.1	Das Erlernen der Körpergröße bedarf keiner sensiblen Lebensphase	151
9.3.2	Der Abruf der Körpergröße ist 12 Stunden nach dem Lernen möglich	151
9.3.3	Die Konsolidierung und Aufrechterhaltung der Körpergröße ist Proteinsynthese-abhängig.....	152
9.4	Die Gedächtnisaufrechterhaltung der Körpergröße bedarf dCREB2 ..	152
9.4.1	Die Validierung des rekombinanten dritten Chromosoms über PCR ..	153
9.5	Die Analyse der dCREB2 Co-Aktivatoren dCBP und CRTC.....	154
9.6	Screen epigenetischer Faktoren.....	158
9.6.1	Erfolgreiche Überkletterungen an einer 5,0 mm breiten Lücke, Tabelle 7	158
9.6.2	Erfolgreiche Überkletterungen an einer 3,5 mm breiten Lücke.....	178
9.6.3	Beinlängen.....	185
9.6.4	Analyse von Entwicklungsdefekten nach RNA-Interferenz.....	191
9.6.5	MSL-Komplex.....	193
10	Publikationen.....	196
11	Danksagung.....	198
12	Lebenslauf.....	199

1 Einleitung

1.1 Eine Einführung in die Gedächtnisforschung

... Zähne geputzt, Schuhe gebunden, los zur Arbeit. Fahrrad oder Auto - scheint die Sonne oder regnet es? Regen! Wo habe ich das Auto letztes Mal noch gleich geparkt? Gefunden und los: am Supermarkt rechts, weiter bis zum Bahnhof, an der Tankstelle vorbei, dann links zur Uni. Angekommen...

Ohne mein Gedächtnis hätte ich es wohl nicht einmal aus dem Bett geschafft. Denn die meisten Fähigkeiten, die wir besitzen und die uns ausmachen, sind nicht angeboren, sondern erlernen wir während unseres Lebens. Gespeichert werden diese in zwei zu unterscheidende Gedächtnissysteme: dem expliziten und dem impliziten Gedächtnis. Das explizite Gedächtnis unterteilt sich weiter in das episodische Gedächtnis (Ereignisse) und das semantische Gedächtnis (Fakten) und ist bewusst abrufbar (Wo steht das Auto? Wie ist der Weg zur Universität?). Das implizite Gedächtnis hingegen umfasst Wahrnehmungs- und motorische Fähigkeiten (Zähne putzen, Schuhe binden), die unbewusst eingesetzt werden (Kandel et al., 2014).

Vertebraten, als auch Invertebraten sind in der Lage ein implizites Gedächtnis auszubilden. Bei Säugern konnte dies mit der Angstkonditionierung gezeigt werden. Dabei wird ein neutraler Stimulus wie ein Ton wiederholt präsentiert mit einem aversiven Stimulus, oft einem elektrischen Fußschock (Klassische Konditionierung). Eine Reaktion auf den Fußschock erfolgt unbewusst und äußert sich mit dem Verfallen in eine Körperstarre und der Ausschüttung von Stresshormonen. Als Folge der Konditionierung verknüpft das Versuchstier den vormals harmlosen Ton mit dem negativen Stimulus und reagiert zukünftig mit einer Angstreaktion bei alleiniger Präsentation des Tons (LeDoux, 2003). Auch die Lidschlag-Konditionierung bei Kaninchen fällt unter die Kategorie des impliziten Gedächtnisses. Wird dem Versuchstier gezielt Luft in die Augen gepustet, so reagiert es mit einem Zwinkern. Wiederholungen dieses Vorgangs führen zu einer Abschwächung der Reaktion (Habituation, nicht-assoziatives Gedächtnis). Ein assoziatives Gedächtnis wiederum kann gebildet werden, sofern der Lufthauch gepaart wird mit einem Ton. In der Testphase sorgt der Ton dann alleine für ein Zwinkern (McCormick et al., 1982). Bei

Invertebraten wurde die klassische Konditionierung bei der Meeresschnecke *Aplysia californica* angewandt. So fällt der Kiemenrückzugreflex verstärkt aus, wenn eine Stimulation des Siphons einem Elektroschock am Schwanz vorausgeht (Kurzzeit-Sensitivierung). Die Aufrechterhaltung dieses Gedächtnisses korreliert mit der Anzahl an Wiederholungen der Stimulationen und kann in eine Langzeit-Sensitivierung übergehen (Abel und Kandel, 1998; Kandel, 2001). Ähnliches ist auch für die aversive Duftkonditionierung bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* bekannt. Nach vorangegangener olfaktorischer Konditionierung vermeiden Taufliegen einen Duft, der mit einem elektrischen Schock gepaart wurde. Dieses Gedächtnis kann bis zu mehreren Tagen anhalten, sofern die Paarung zwischen neutralem und aversivem Stimulus wiederholt stattfand (Quinn et al., 1974; Tully et al., 1994).

Die molekularen Grundlagen, auf die Vertebraten und Invertebraten zurückgreifen, um neue Assoziationen auszubilden und darüber ein Gedächtnis zu formen, wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte intensiv beschrieben (siehe 1.2). Ungewiss hingegen ist, wie die Taufliege die Information zu einem negativ bewerteten Duft über mehrere Tage hinweg aufrechterhalten kann. Oder wie es sein kann, dass ich die Information über den motorischen Ablauf des Fahrradfahrens nach zehnjähriger Fahr-Pause zum Start meiner Promotion direkt wieder abrufen konnte. Über die molekularen Mechanismen, die eine dauerhafte Aufrechterhaltung des Gedächtnisses ermöglichen, wird bislang weitestgehend spekuliert. Wie genau diese Aufrechterhaltung gewährleistet wird, soll zentrale Fragestellung dieser Arbeit sein.

1.2 Synaptische Plastizität

Unter Lernen versteht man den Erwerb neuer Informationen, welcher oft mit einer Anpassung des Verhaltens einhergeht (Kandel, 2001; Kandel et al., 2014). Die biologische Grundlage des Lernens stützt sich auf die Eigenschaft zweier Neurone, die Stärke ihrer synaptischen Verbindung bei Nutzung modulieren zu können. Dies wurde erstmals 1894 von Santiago Ramon y Cajal postuliert und 1949 von Hebb als synaptische Plastizität betitelt (Kandel et al., 2014).

Eine kurzzeitige Speicherung dieser neu gewonnenen Information unterliegt einer Modifikation bereits existierender synaptischer Proteine und der damit

einhergehenden Modifikation der bereits bestehenden Synapse. Zur längerfristigen Speicherung bedarf es hingegen aktiver Genexpression und Proteinbiosynthese zur Stärkung bestehender und/oder Bildung neuer Synapsen (Kandel, 2001). Die Überführung eines Kurzzeitgedächtnisses (*Short Term Memory*, STM) in ein stabiles Langzeitgedächtnis (*Long Term Memory*, LTM) wird dabei als Konsolidierung bezeichnet (Dudai, 2004).

Untersucht wurde das Lernen unter Nutzung klassischer Konditionierungsexperimente, einer assoziativen Form des Lernens (Glanzman, 2010). Zu benennen ist hierbei der unbedingte Stimulus (*Unconditioned Stimulus*, US), welcher bei Anwendung eine angeborene Reaktion (*Unconditioned Response*, UCR) hervorruft. Dieser unbedingte Stimulus wird in einer Trainingsphase gekoppelt an einen neutralen Stimulus. In einer sich anschließenden Testphase führt die Präsentation des ehemals neutralen Stimulus alleine zur Ausübung der angeborenen Reaktion. Der neutrale Stimulus wurde zum bedingten Stimulus (*Conditioned Stimulus*, CS) (Kandel, 2012). Bewährt ist die Nutzung eines elektrischen Schocks als unbedingter Stimulus. Nach erfolgter Konditionierung zeigt *Aplysia californica* einen verstärkten Kiemenrückzugreflex bei leichter Stimulation des Siphons (Abel und Kandel, 1998), *Drosophila melanogaster* vermeidet aktiv den vormals bestrafte Duft (Quinn et al., 1974; Tully et al., 1994) und *Mus musculus* verfällt in eine Angststarre bei Präsentation des bestrafte Tons (LeDoux, 2003).

In der olfaktorischen Konditionierung bei *Drosophila* wird der Duft vermittelt über exzitatorische cholinerge Projektionsneurone des olfaktorischen sensorischen Systems, den Antennalloben. Diese Projektionsneurone innervieren nachfolgend die Calices der Pilzkörper. Die Pilzkörper sind ein paarig angelegtes Neuropil, bestehend aus insgesamt 2000 Kenyonzellen und gliedern sich strukturell in ebenjene Calices, die Pedunculi und die Loben. Die Loben wiederum lassen sich funktional in α/β - (Gedächtnisabruf), α'/β' - (Konsolidierung), sowie γ -Neurone (Kurzzeitgedächtnis) unterteilen. Zudem ist bekannt, dass der Output der α/β_s -Neurone (α/β surface) das aversive Gedächtnis vermittelt, wohingegen α/β_s - und α/β_c -Neurone (α/β core) das appetitive Gedächtnis steuern (Perisse et al., 2013). Bei der appetitiven Konditionierung erfolgt die Kopplung des Duftes mit einer Belohnung, meist Zucker (Tempel et al., 1983). Generell wird der unbedingte Stimulus über modulatorische

dopaminerge Neurone vermittelt, welche abhängig von der Wertigkeit distinkte Bereiche der Loben ansteuern (Perisse et al., 2013). Postsynaptisch der Kenyonzellen liegen sogenannte Pilzkörper Ausgangsneurone (*Mushroom Body Output Neurons*; MBON). Diese können eine Weiterleitung an motorische Neurone vornehmen, aber auch über Pilzkörper-extrinsische Neurone wie den *dorsal anterior lateral* (DAL)-Neuronen, den *anterior paired lateral* (APL)-Neuronen und den *dorsal paired medial* (DPM)-Neuronen einen Feedback-Loop auf die Kenyonzellen schalten. Zudem werden MBON selbst bei der Konsolidierung und während des Gedächtnisabrufs benötigt (Aso et al., 2014; Wu et al., 2017; Horiuchi, 2019).

Bei Aktivierung des modulatorischen Neurons wird Dopamin ausgeschüttet, welches postsynaptisch an G-Protein-gekoppelte Dopaminrezeptoren der Kenyonzelle bindet. Durch die Rezeptoraktivierung dissoziiert die G_{α} -Untereinheit von den β/γ -Untereinheiten und bindet an die Adenylylzyklase (AC). Zur Aktivierung dieser muss jedoch neben G_{α} zusätzlich Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) gebunden werden. Eine Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Levels innerhalb des Pilzkörper-Neurons wird dabei erzielt über den Eingang des Duftes. Die Adenylylzyklase nimmt hier die Aufgabe eines Koinzidenzdetektors wahr und stellt die Grundlage des assoziativen Lernens, indem sie eine gemeinsame Verarbeitung beider Stimuli-Signalwege (bedingt und unbedingt) garantiert (Tang et al., 1991; Levin et al., 1992; Davis, 2005). Ihre biochemische Funktion ist die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zum zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP), einem sekundären Botenstoff. Wird vermehrt cAMP produziert, bindet dies die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) und induziert deren Dissoziation von den katalytischen Untereinheiten. Die Signalkaskade über cAMP/PKA sorgt nachfolgend für eine Verstärkung des Kalzium-Einstroms, sowie für die Rekrutierung synaptischer Vesikel aus dem Reservepool, wodurch die Transmitterausschüttung erhöht wird. Für *Aplysia* ist bekannt, dass dabei eine Schließung von Kalium-Hintegrundkanälen vorgenommen wird (Seino und Shibasaki, 2005). Für die Ausbildung eines LTM bedarf es der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors dCREB2 (*Drosophila cAMP response element-binding protein 2*) durch die katalytischen Untereinheiten der PKA (Abbildung 1A, *präsynaptische Zelle*). Dieser nimmt im Anschluss im

Nukleus durch gezielte Genexpression langfristige synaptische Veränderungen vor (Tully et al., 2003; Kandel, 2012).

Zur Gewährleistung von synaptischer Plastizität umfasst die cAMP-Kaskade neben den aktivierenden Komponenten auch regulatorische Mechanismen. Der cAMP-Spiegel wird kontrolliert durch den Abbau des sekundären Botenstoffs über die Phosphodiesterase (Lee, 2015). Die regulatorischen Untereinheiten der PKA inaktivieren durch Bindung der katalytischen Untereinheit deren Funktion (Goodwin et al., 1997). Vom Transkriptionsfaktor dCREB2 gibt es neben der Transkription-aktivierenden (dCREB2-a) auch eine repressive Isoform (dCREB2-b). Die gezielte Expression von dCREB2-b resultiert in einem defekten olfaktorischen LTM (Yin et al., 1994).

Studien zum Kiemenrückzugreflex zeigen, dass in *Aplysia* der US ebenfalls durch ein modulatorisches, hier serotonerges Neuron vermittelt wird. Bei Aktivierung projiziert dieses auf ein sensorisches Neuron des Siphons, wodurch der intrazelluläre cAMP-Spiegel ansteigt, die Proteinkinase A CREB phosphoryliert und damit durch Genexpression andauernde synaptische Veränderungen vorgenommen werden können (Kandel, 2012). Bei Mäusen konnte durch Manipulation der homologen Gene zur AC, der PKA und CREB ein Defekt im räumlichen LTM hervorgerufen werden (Davis, 2005).

Interessanterweise liegt der Fokus der Invertebratenforscher bei der mechanistischen Analyse der synaptischen Plastizität auf dem präsynaptischen Neuron, der Schwerpunkt der Vertebratenforscher hingegen postsynaptisch (Glanzman, 2010). Durch präsynaptische Ausschüttung von Glutamat werden postsynaptisch lokalisierte α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)-Rezeptoren aktiviert. AMPA-Rezeptoren vermitteln den Einstrom von Natriumionen (Na^+) in die Zelle. Neben den AMPA-Rezeptoren sitzen N-methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-R) in der Postsynapse. Die für Kalziumionen (Ca^{2+}) permeablen Kanäle sind durch Magnesiumionen (Mg^{2+}) verschlossen und öffnen sich nur dann, wenn Glutamat an sie gebunden vorliegt und die postsynaptische Zelle depolarisiert wurde. Diese Kopplung prä- und postsynaptischer Aktivität qualifiziert sie zu Koinzidenzdetektoren der Postsynapse. Strömt nach Transmitterausschüttung

genug Na^+ in die Zelle ein, wird das postsynaptische Neuron über den Schwellenwert erregt. Es kommt zum intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration, woraufhin Proteinkinasen aktiviert werden. Diese steuern strukturelle und funktionelle Veränderungen zur Stärkung der Synapse. Sie sorgen für eine Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren, sodass deren Ionenleitfähigkeit erhöht wird. Zudem regulieren sie den Einbau weiterer AMPA-Kanäle in die Membran (Bear et al., 2018). Auch die Phosphorylierung von CREB geht mit der Aktivierung der Proteinkinasen einher (Abbildung 1B, *postsynaptische Zelle*). CREB selbst steuert daraufhin die Genexpression, Proteinbiosynthese und die Konstruktion neuer synaptischer Verbindungen (Kandel, 2001).

Untersucht wurde dieser Signalweg im Hippocampus von Mäusen. Der Hippocampus wird für das räumliche Lernen benötigt, welches zum expliziten Gedächtnis zählt. Kandel beschreibt in einem Review von 2001, dass das implizite und explizite Langzeitgedächtnis evolutionär konservierte Mechanismen teilen, darunter den Signalweg über PKA und CREB (Kandel, 2001). Darüber hinaus wurde 2017 von Ueno und Kollegen der Mechanismus der olfaktorischen Konditionierung bei *Drosophila* erweitert. Sie beschreiben ein Modell, indem der aversive Stimulus mutmaßlich über aufsteigende Neuronenbündel des ventralen Nervensystems an die Pilzkörper übermittelt wird. Die Transmission des Schocks ist glutamaterg und bedarf postsynaptisch der Aktivierung von NMDA-R. Erfolgt parallel dazu ein cholinerg Dufteingang, führt dies zur koinzidenten Aktivierung der Adenylzyklase in den Kenyonzellen. Erst durch diesen Zwischenschritt wird die lokale Aktivierung und Transmitterausschüttung dopaminerg Neurone ermöglicht (Xia et al., 2005; Ueno et al., 2017). Des Weiteren deckte die Arbeitsgruppe um Saitoe auf, dass die Assoziation zwischen Duft und elektrischen Fußschock während des Lernens nicht stattfinden kann, sofern der NMDA-R hypomorph mutiert vorliegt. Das Lernen und die Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses ist jedoch möglich, wenn der Kalzium-Einstrom durch den NDMA-R in die Zelle gewährleistet wird, der Mg^{2+} -Block jedoch fehlt. Erst die Ausbildung eines LTMs wird durch fehlenden Mg^{2+} -Block verhindert und geht einher mit einem erhöhten Level der repressiven dCREB2-b-Isoform. Folglich soll der Mg^{2+} -Block der NMDA-R die basale Expression der repressiven

dCREB2-b-Isoform reduzieren, sodass zum Zeitpunkt der LTM-Bildung eine dCREB2-abhängige Genexpression stattfinden kann (Miyashita et al., 2012).

Mit Abbildung 1 sollen die prä- und postsynaptischen Mechanismen zusammengefasst werden, die artenübergreifend beschrieben sind.

Daneben soll ergänzt werden, dass Vertebraten im Rahmen der LTM-Ausbildung zudem einen retrograden Mechanismus besitzen, durch welchen eine Kommunikation zwischen post- und präsynaptischer Zelle während des Lernens gesichert ist. Dieser NO-cGMP-PKG-Signalweg beginnt damit, dass nach koinzidenter Aktivierung der Postsynapse Kalzium über die NMDA-R einströmt. Dieses aktiviert die Kalzium-abhängige *Nitric Oxide Synthase* (NOS), die durch Umwandlung des L-Arginin zu L-Citrullin Stickstoffmonoxid (NO) bildet. NO kann retrograd zur Präsynapse diffundieren und durch Bindung an die lösliche Guanylylzyklase (sGC) die Bildung von zyklischem GMP (*cyclic Guanosine Monophosphate*, cGMP) induzieren. cGMP aktiviert nachfolgend die Proteinkinase G (PKG), welche über Mobilisation der synaptischen Vesikel die Ausschüttung der Transmitter erhöht (Ota et al., 2008). Kürzlich konnte auch für Heuschrecken gezeigt werden, dass diese bei der Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses auf die Aktivität des NO/cGMP-Signalwegs zurückgreifen. Es wird postuliert, dass dieser Signalweg zu einer Aktivierung der CNG-Kanäle (*cyclic Nucleotid-Gated Channels*) führt und der nachfolgende Kalzium-Einstrom die Aktivität von CaM und der CaMKII anregt, um final die Aktivierung des cAMP/PKA/CREB-Signalwegs zu induzieren (Matsumoto et al., 2018). Darüber hinaus konnte über einen pharmakologischen Ansatz gezeigt werden, dass bei der Honigbiene die Ausbildung eines Transkriptions-abhängigen Langzeitgedächtnisses (Verknüpfung eines Duftes mit einer Zuckerbelohnung) der Aktivität des No/cGMP-, als auch des cAMP/PKA-Signalwegs bedarf (Matsumoto et al., 2014). Der Signalweg über NO und cGMP wird in Abbildung 1 nicht aufgegriffen, da die vor- und nachgeschalteten Signalwege bei Vertebraten und Invertebraten stark voneinander abweichen.

Für die Erarbeitung der zentralen Fragenstellung der Doktorarbeit, wie die Aufrechterhaltung eines LTMs mechanistisch garantiert wird, wurde sich für den

Modellorganismus *Drosophila melanogaster* entschieden. Die Vorzüge der Taufliege werden nachfolgend erläutert.

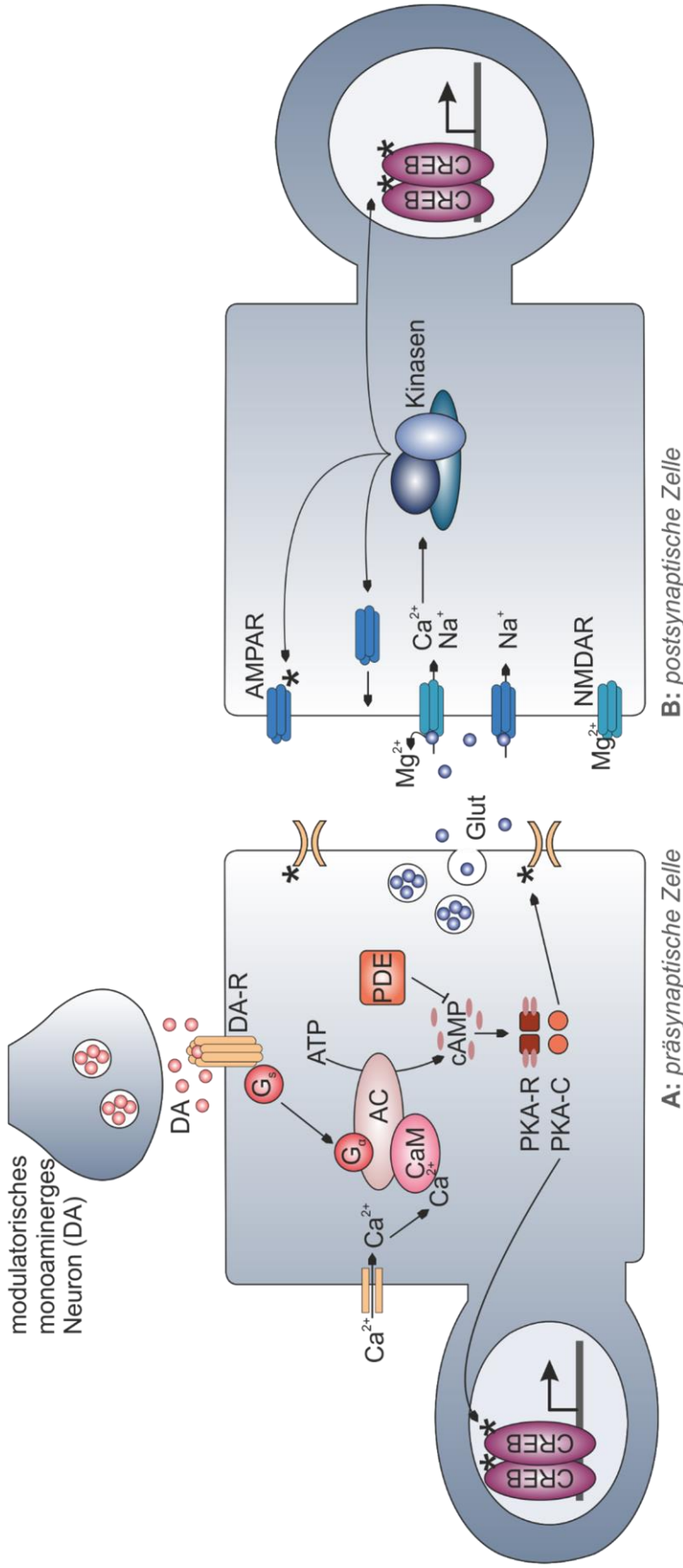


Abbildung 1: Prä- und postsynaptische Mechanismen der klassischen Konditionierung.

(A) Präsynaptische Zelle: Bei der olfaktorischen Konditionierung wird das Duftsignal übermittel von Projektionsneuronen der Antennalloben. Diese innervieren ausgewählte Kenyonzellen der Pilzkörper, wodurch deren intrazelluläre Kalziumkonzentration steigt. Parallel dazu vermitteln dopaminerge Neurone den aversiven Stimulus. Die Bindung von Dopamin an seinen Rezeptor bewirkt die Freisetzung der α -Untereinheit des G-Proteins, welche an die Adenylzyklase (AC) bindet. Erst wenn diese zusätzlich Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) gebunden hat, wird die Umwandlung von ATP zu cAMP vermittelt. Eine synergistische Erhöhung des cAMP-Niveaus tritt demnach erst dann ein, wenn der unbedingte und der bedingte Stimulus gemeinsam verarbeitet werden; die Adenylzyklase arbeitet hier als Koinzidenzdetektor. cAMP bindet an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA), wodurch deren katalytische Untereinheiten aktiviert werden. Durch Phosphorylierung von Ionenkanälen können diese kurzweilige Veränderungen in der Zelle induzieren. Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors cCREB2 hingegen bewirkt die Synthese neuer Proteine, welche langfristige Veränderungen in der Zelle steuern. Über die Phosphodiesterase (PDE) wird das cAMP-Level wieder reduziert. (B) Postsynaptische Zelle: Die Koinzidenzdetektion bei Vertebraten verläuft über die N-methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR), welche nur dann aktiviert werden, wenn Prä- und Postsynapse gleichzeitig aktiv sind. Die präsynaptische Freisetzung von Glutamat aktiviert α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)-Rezeptoren, sodass Natrium in die Zelle strömt. Wird diese über den Schwellenwert erregt und bindet gleichzeitig Glutamat an die NMDA-Rezeptoren, strömt Ca^{2+} in die Zelle ein. Daraufhin werden Kinasen aktiviert, welche den Einbau und die Phosphorylierung von AMPAR steuern, sowie die Aktivierung von CREB (Glanzman, 2010). DA: Dopamin, DA-R: Dopaminrezeptor, Glut: Glutamat.

1.3 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus der Neurobiologie

Als Modellorganismus der Genetik ist *Drosophila melanogaster* seit über 100 Jahren bekannt. Eingeführt wurde die Taufliege von T.H. Morgan, welcher sie zur Analyse geschlechtsgekoppelter Vererbung verwendete (Rubin, 2000). Anwendung in der Neurogenetik fand sie zum ersten Mal 1967 im Labor von S. Benzer. Benzer und seine Kollegen untersuchten den Einfluss einzelner Gene auf komplexe Verhalten, wie z. B. die circadiane Rhythmik (Konopka und Benzer, 1971), das Lernen und die Gedächtnisbildung (Quinn et al., 1974; Dudai et al., 1976), oder die Balz (Hotta und Benzer, 1976). In den darauffolgenden Jahren wurde insbesondere durch die Etablierung des GAL4/UAS-Systems (Brand und Perrimon, 1993) und die vollständige Entschlüsselung des *Drosophila*-Genoms (Adams et al., 2000) die Forschung revolutioniert.

Unter Anbetracht der bis heute erworbenen Fülle an Informationen und Werkzeugen ist es demnach vorstellbar, das Nervensystem der Fliege in seiner Funktionalität und Konnektivität in Zukunft ganzheitlich zu verstehen. Im Vergleich zum Menschen mit ca. 100 Milliarden Neuronen (Herculano-Houzel, 2009) und etwa 25.000 Protein-codierenden Genen (International Human Genome Sequencing Consortium et al., 2001) bietet die Fliege zahlentechnisch mit ungefähr 100.000 (Simpson, 2009) Neuronen und ca. 13.000 Protein-codierenden Genen (Bellen und Yamamoto, 2015) einen Vorteil. Hinzu kommt, dass aufgrund der kurzen Generationszeit und einer hohen Anzahl an Nachkommen Hypothesen experimentell schnell überprüft werden können. Minimale Haltungsanforderungen halten die Kosten zudem gering (Burne et al., 2011). Insbesondere für die neurobiologische Forschung ist entscheidend, dass die Verwendung der Fliege im Vergleich zu Vertebraten-Modellsystemen mit geringen ethischen Einschränkungen verbunden ist (Tan und Azzam, 2017).

1.3.1 Werkzeuge der *Drosophila*-Forschung

Gezielt die Expression eines Genes zu manipulieren war bis zum Jahr 1993 nur auf zwei Arten möglich: Zum einen konnte durch die Verwendung eines Hitzeschock-Promotors und Hitzeinduktion der Zeitpunkt der Genexpression

festgelegt werden. Zum anderen konnte der Ort der Genexpression definiert werden über die regulatorische Sequenz des eingesetzten Promotors. Zurückgegriffen wurde hierzu auf eine limitierte Anzahl bereits charakterisierter Promotoren. Die Einführung des GAL4/UAS-Systems (Brand und Perrimon, 1993) erlaubte erstmals die zielgerichtete Expression eines Gens in einer Vielzahl neuronaler Muster.

Bei GAL4 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher eine spezifische Bindung mit der sogenannten *upstream activating sequence* (UAS) eingehen kann. Der UAS nachgeschaltete Gene können bei Aktivierung dieser durch GAL4 spezifisch exprimiert werden (Brand und Perrimon, 1993). Die Integration des ursprünglich aus der Hefe stammenden Systems in das Fliegen-genom erfolgt unter Nutzung von P-Elementen. Diese besitzen die natürliche Eigenschaft, DNA mittels ihrer Transposase-Aktivität zu mobilisieren und an anderer Stelle über ihre invertierten *Repeats* (IR) im Genom zu integrieren. Durch gezielte Manipulation kann die Sequenz der Transposase ersetzt werden durch eine exogene DNA Sequenz. Parallel dazu wird ein Helfer-Plasmid erstellt, welches die Transposase codiert, jedoch defekt ist hinsichtlich der für die Integration notwendigen IRs. Durch diese Auftrennung kann nach Injektion beider Plasmide in die Keimbahn eine stabile Linie für die exogene DNA erstellt werden. Etabliert werden zwei voneinander unabhängige transgene Linien, die Treiberlinie (GAL4) und die Effektorlinie (UAS). Die Integration erfolgt dabei willkürlich, wodurch das zellspezifische Muster der GAL4-Expression vorgegeben wird durch den sie kontrollierende Enhancer benachbarter Gene (Rubin und Spradling, 1982; Spradling und Rubin, 1982). Mitunter können sich durch diese Eigenschaft Gene über ihr Expressionsmuster identifizieren lassen (*Enhancer Trap*) (O'Kane und Gehring, 1987).

Eine zeitliche Steuerung der zellspezifischen Genexpression bietet die 2004 eingeführte TARGET-Methode (*temporal and regional gene expression targeting*) (McGuire et al., 2004). Bei einer Temperatur von 19°C unterbindet der temperatur-sensitive GAL4-Repressor GAL80^{ts} die transkriptionale Aktivität von GAL4, sodass das Zielgen nicht exprimiert wird. Eine gezielte Temperaturerhöhung (auf 30°C) hingegen inaktiviert GAL80^{ts}, induziert die Genexpression und erlaubt damit eine systematische Eingrenzung des Zeitraums, zu dem das Zielgen einen Phänotyp hervorbringt und damit funktional aktiv ist.

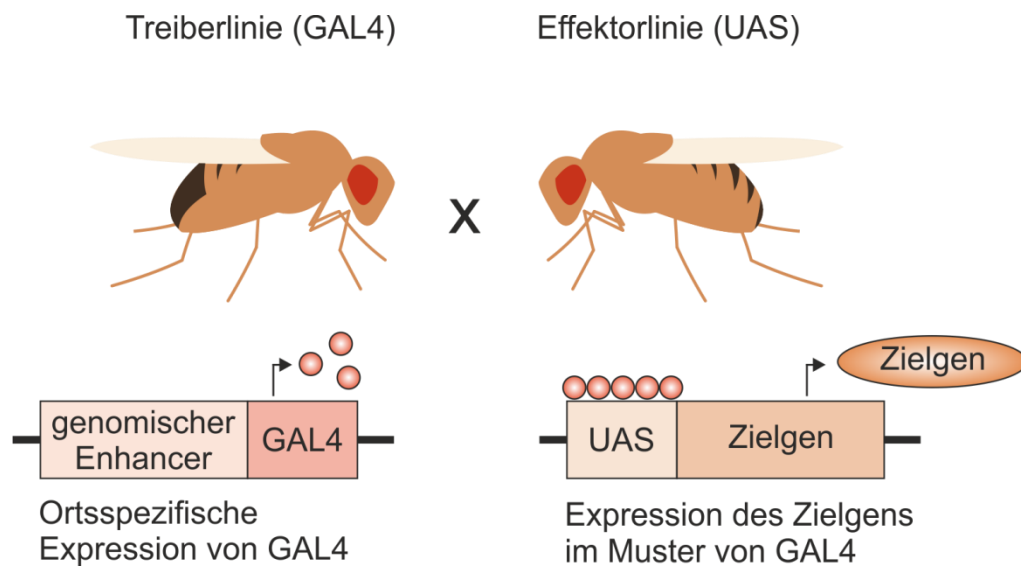


Abbildung 2: **Das GAL4/UAS-System.** Durch Kreuzung der Treiberlinie (GAL4) mit der Effektorlinie (*upstream activating sequence* [UAS]) kommt es zur Vereinigung beider Komponenten des binären Systems. Nachfolgend kann der Transkriptionsaktivator GAL4 spezifisch an die UAS binden und die Expression des Zielgens einleiten. Das Expressionsmuster wird dabei durch den GAL4-kontrollierenden genomischen Enhancer bestimmt.

Eine effiziente Methode, welche die auf dem Integrationsort beruhende vorgegebene Expressionsstärke vernachlässigt und eine reproduzierbare positionsspezifische Integration ermöglicht, wurde von Groth und Kollegen 2003 entwickelt. Dabei vermittelt eine Φ C31-Integrase die Rekombination zwischen zwei Erkennungssequenzen, attB und attP. Plasmide, welche die Sequenz attB, sowie das zu integrierende Gen beinhalten, können dadurch gezielt in etablierte attP-transgene Fliegen integriert werden (Groth, 2004). Diese positionsgenaue Integrationsmethode wurde 2008 dazu verwendet, die GAL4-Sequenz mit kleinsten Enhancer-Fragmenten zu kombinieren und eine Kollektion distinkter GAL4-Linien zu generieren (Pfeiffer et al., 2008), deren Expressionsmuster in Summe alle Neuronen des Fliegengehirns umfassen sollen (Jenett et al., 2012). Um das Expressionsmuster einer GAL4-Linie weiter einzuschränken wird das Split GAL4-System verwendet. Dabei stehen die Sequenzen der DNA-Bindedomäne und der Transkriptionsaktivator-Domäne des GAL4-Proteins unter der Kontrolle verschiedener Enhancer. Nur durch die Kombination beider Komponenten im überlappenden Expressionsbereich wird ein funktionales GAL4 generiert, welches die Transkription des Zielgens initiiert (Luan et al., 2006). Weitere Varianten binärer Systeme sind das *lexA/lexAop*-System (Lai und Lee, 2006), sowie das Q-System (Potter und Luo, 2011).

Auf Basis des GAL4/UAS-Systems wurden bis heute zahlreiche Methoden zur Erforschung der neuronalen Funktion und Verschaltung etabliert. Um die Aktivität einer Zelle zu beobachten und zu quantifizieren, werden u. a. Kalzium-Indikatoren eingesetzt, die auf eine Konzentrationszunahme des sekundären Botenstoffs mit einer Steigerung ihrer Fluoreszenz antworten (Tian et al., 2009). Ein Beispiel neuronaler Aktivatoren ist der thermosensitive Kationenkanal TrpA1, welcher sich bei Erhöhung der Umgebungstemperatur öffnet – ein endogener Schutzmechanismus zur Wahrnehmung von Wärme (Hamada et al., 2008). Als Inhibitor neuronaler Aktivität steht u. a. Tetanustoxin zur Verfügung. Die leichte Kette des Tetanustoxins (TeTxLC) sorgt für die Spaltung von Synaptobrevin, sodass die Exozytose synaptischer Vesikel und damit die synaptische Übertragung unterbunden wird (Sweeney et al., 1995).

Neben der Inhibition neuronaler Aktivität ist es durch den zentralen Mechanismus der RNA-Interferenz auch möglich, ausgewählte Gene gezielt herunter zu regulieren. Dazu wird eine exogene, palindromisch angelegte Sequenz in die Fliege integriert, welche nach Transkription eine doppelsträngige RNA (dsRNA) formt. Die dsRNA wird basierend auf einem endogenen Schutzmechanismus der Zelle vor viraler RNA degradiert. Der Abbau erfolgt, indem die lange dsRNA durch die RNase Dicer in 21 bp-lange Nukleotide geschnitten wird. Diese Fragmente werden nachfolgend in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingelagert und entwunden. Die einzelsträngige RNA hybridisiert mit der ihr komplementären endogenen mRNA (*messenger RNA*), formt dadurch erneut dsRNA und unterbindet damit gezielt die Translation des Zielgens (Heigwer et al., 2018). RNAi-Linien zu einer Vielzahl an Genen sind über großangelegte Projekte entstanden und stehen heute über das *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC), das *Vienna Drosophila Resource Center* (VDRC) und das *National Institute of Genetics* (NIG, Japan) zur Verfügung (Dietzl et al., 2007; Ni et al., 2011). Darüber hinaus stehen zur Untersuchung der Funktion eines Gens Mutanten zur Verfügung. Die Mutationen wurden ehemals unwillkürlich generiert über den Einsatz des mutagenen Ethylmethansulfonats (EMS) (Bökel, 2008) oder heutzutage durch gezielte Manipulation über das CRISPR/Cas9-System (Gratz et al., 2015). Wird in einer mutanten Fliege die genomische Sequenz des fehlenden Gens innerhalb

ausgewählten Zellen zurückgegeben, kann eine Rettung des Phänotyps hervorgerufen werden. Die ausgewählten neuronalen Strukturen wären demnach notwendig und hinreichend für zur Ausübung des untersuchten Verhaltens. Auf die neuronale Architektur des *Drosophila*-Gehirns soll im Folgenden eingegangen werden.

1.4 Der Zentralkomplex

Innerhalb des Fliegengehirns ist eine Einheit von besonderer Bedeutung: der Zentralkomplex (ZX, Abbildung 3). Als zentrale Steuereinheit generiert er zielgerichtete Verhaltensweisen nach sensorischem Eingang. Der Zentralkomplex ist in der Insektenwelt artenübergreifend strukturell hoch konserviert und umfasst vier markante Strukturen, welche sich symmetrisch an der Mittellinie des Protozerebrums anordnen.

Am weitesten anterior gelegen befindet sich der Zentralkörper, welcher sich bei *Drosophila* in den Fächerförmigen Körper (FK) und den Ellipsoidkörper (EK) unterteilt. Die ventrale Hälfte des EK liegt anterior, wohingegen die dorsale Hälfte posterior vom FK umschlossen wird. Der Ellipsoidkörper gliedert sich strukturell in sechs verschiedene konzentrische Ringsysteme (Omoto et al., 2018). Die Fliege benötigt einen Teil dieser EK-Neurone für die Ausbildung eines visuellen Ortsgedächtnisses (Ofstad et al., 2011). Dieses räumliche Kurzzeitgedächtnis könnte beispielsweise dazu genutzt werden, die Position einer Futterquelle für wenige Stunden zu speichern. Darüber hinaus besitzt *Drosophila* ein visuelles Arbeitsgedächtnis, welches in den R3-Neuronen lokalisiert ist. Dieses Kurzzeitgedächtnis gewährleistet eine zielgerichtete Navigation zu einem Objekt, auch wenn dieses für wenige Sekunden verdeckt wird (Neuser et al., 2008; Thran et al., 2013; Kuntz et al., 2017). Für R2-Neurone ist bekannt, dass sie in die Regulation des Schlafes eingebunden sind (Donlea et al., 2018; Guo et al., 2018; Lamaze et al., 2018). Den FK Körper benötigt *Drosophila* zur visuellen Mustererkennung während des Fluges (Liu et al., 2006; Pan et al., 2009). Außerdem resultiert eine Blockade der synaptischen Übertragung im FK in einer Reduktion der Balzaktivität (Sakai und Kitamoto, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass dorsal gelegene Neurone des FK die

Aufgabe haben, den Schlaf-Wach-Zustand der Fliege zu kontrollieren und bei Bedarf den Schlaf zu induzieren (Donlea et al., 2014; Donlea et al., 2018).

Ventral des Zentralkörpers sind die paarigen Noduli (NO) angeordnet. Für Fliegen, die einen strukturellen Defekt in den NO aufweisen, wurde ein Phänotyp im Laufverhalten festgestellt (Strauss und Heisenberg, 1993). Darüber hinaus ist von Buchanan und Kollegen bekannt, dass Fliegen eine individuelle Präferenz für Links oder Rechts besitzen, und dass diese lokomotorische Händigkeit mitunter von der Aktivität in den NO abhängt (Buchanan et al., 2015).

Die Protozerebralbrücke (PB) schließt posterior den Zentralkomplex ab (Young und Armstrong, 2010; Lin et al., 2013; Wolff et al., 2015). Von Heuschrecken ist bekannt, dass das Polarisationsmuster des Himmels topographisch in der PB repräsentiert wird; eine Eigenschaft, die einige Insekten zur Orientierung verwenden (Heinze und Homberg, 2007). In *Drosophila* ist die PB funktional verantwortlich für die Regulation der Schrittlänge (Strauss, 2002), sowie für eine orientierte Lokomotion im Kletterverhalten (Triphan et al., 2010). Darüber hinaus erforschte Krause während seiner Promotion das Körpergrößengedächtnis der Fruchtfliege, welches in der PB erlernt wird (Krause, 2015).

Von Wolff und Kollegen wurde 2018 angeregt, die Aufnahme des Asymmetrischen Körpers (AK) als fünftes Neuropil des Zentralkomplexes zu bedenken. Diese bilaterale Struktur liegt dem ventralen Bereich des FK benachbart und ist asymmetrisch in seiner Morphologie (Wolff und Rubin, 2018). Drei prominente akzessorische Neuropile schließen sich an den Zentralkomplex an; die lateralen akzessorischen Loben (LAL), die Bulbi (BU, auch als laterale Triangel bekannt) und die Gall (GA) (Wolff et al., 2015).



Abbildung 3: **Der Zentralkomplex inkl. akzessorischer Neuropile.** Der Zentralkomplex von *Drosophila* gliedert sich in die Protozerebralbrücke (PB), den Fächerförmigen Körper (FK), den Ellipsoidkörper (EK) und die Noduli (NO). Zudem wird der Asymmetrische Körper (AK) abgebildet. Darstellung zweier akzessorischer Strukturen, die Gall (GA) und die lateralen akzessorischen Loben (LAL). Abbildung verändert nach (Wolff et al., 2015).

Die Verknüpfung lateral gelegener Hirnstrukturen mit einzelnen Neuropilen des ZX erfolgt über sogenannte Großfeldneurone. Orthogonal dazu stehen die als Kleinfeldneurone bezeichneten Zentralkomplex-intrinsischen Neurone (inkl. Bulbi und LAL). Diese Neurone innervieren einzelne ZX-Neuropile oder stellen die Kommunikation zwischen den ZX-Neuropilen entlang der anterioposterioren Achse sicher (Hanesch et al., 1989; Young und Armstrong, 2010). Durch ihre Verzweigungen und terminale Innervierung gestalten die Kleinfeldneurone voneinander abgrenzbare horizontale und vertikale Schichten innerhalb der Neuropile. Diese Schichten sind über Färbung von Bruchpilot, einem Marker für aktive Zonen, immunhistologisch visualisierbar (Wolff et al., 2015; Omoto et al., 2018). Demnach ist die PB unterteilbar in 18 vertikale Einheiten, den Glomeruli, von denen jeweils neun per Hemisphäre zu finden sind (Wolff et al., 2015). Der FK besteht aus horizontalen Schichten und vertikalen Säulen. Die Anzahl derer ist in der Literatur variabel, da Funktion und Morphologie der einzelnen Einheiten nicht eindeutig definiert sind. Nach Wolff und Kollegen sind mind. neun horizontale Schichten voneinander zu unterscheiden. Die Anzahl der vertikalen Einheiten ändert sich abhängig von der horizontalen Schicht und bewegt sich zwischen weniger als acht bis 16 Säulen (Hanesch et al., 1989; Lin et al., 2013; Wolff et al., 2015). Um den sich mittig befindlichen Kanal des Ellipsoidkörpers ordnen sich wie oben genannt sechs verschiedene konzentrische Ringsysteme an (R1 – R6) (Omoto et al., 2018).

Entlang der anterioposterioren Achsen unterteilt sich der EK laut Wolff in drei voneinander abgrenzbare Subkompartimente (*shells* oder Schalen). Das posteriore Subkompartiment der drei Schalen lässt sich über acht von Wolff und Kollegen identifizierte *tiles* (Kacheln) weiter strukturieren. Des Weiteren umfasst der EK 16 radiale Einheiten (*wedges* oder Sektoren, weiter aufteilbar in *semi-wedges* [Halbsektoren]), welche in der Tiefe bis zu drei Schalen umschließen können (Wolff et al., 2015). An Noduli besitzt die Fliege drei pro Hemisphäre. Der dorsal gelegene Nodus (NO_1) wird gegliedert in einen medialen und einen lateralen Bereich. NO_2 besitzt einen großen dorsalen (NO_{2D}) und einen kleineren ventral gelegenen Bereich (NO_{2V}). Der am weitesten ventral gelegene Nodus, NO_3 , lässt sich in ein posteriores (NO_{3P}), ein mediales (NO_{3M}) und ein anteriores (NO_{3A}) Subkompartiment unterteilen (Wolff et al., 2015).

1.5 Langzeitgedächtnisse

Verschiedene Verhaltensweisen werden somit nach Verarbeitung des sensorischen Eingangs über die funktional unterschiedlichen, aber vernetzten Neupile des Zentralkomplexes generiert. Da der Fokus der Arbeit auf der Analyse der Gedächtnisaufrechterhaltung liegt, werden nachfolgend solche Verhalten betrachtet, denen die Bildung eines Langzeitgedächtnisses unterliegt.

So zeigen *Drosophila melanogaster* Weibchen ein natürliches nicht-assoziatives Langzeitgedächtnis nach Konfrontation mit Weibchen der endoparasitoiden Wespenart *Leptopilina heterotoma*. *Drosophila* Weibchen verfolgen die Strategie, bei Anwesenheit der Wespen-Weibchen alkoholhaltiges Futter gegenüber alkoholfreiem Futter für die Eiablage zu präferieren. Der Anteil an Nachkommen, der den Schlupf erfolgreich bewältigt, ist dadurch deutlich erhöht. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Alkoholaufnahme der Larven Infektionen vorbeugen und zur Bekämpfung von Infektionen beitragen kann. Das Gedächtnis zur Alkoholpräferierten Eiablage wird über vier Tage aufrecht erhalten (Kacsoh et al., 2013). Eine Verhaltensanpassung, die über neun Tage hinweg besteht, wurde bei *Drosophila* Männchen beobachtet. Jungfräuliche Männchen initiieren die Balz, sobald sie mit einem Weibchen zusammengebracht werden. Bereits verpaarte Weibchen

verweigern Annäherungsversuche von Männchen, sodass diese ihr Balzverhalten kurzzeitig unterdrücken. Diese Langzeit-Unterdrückung (Balzsuppression) wird dann ausgebildet, wenn die Konditionierung über einen ausgedehnten Zeitraum von fünf Stunden stattfindet (McBride et al., 1999). Ein Gedächtnis, das über sieben Tage aufrechterhalten werden kann, basiert auf der aversiven olfaktorischen Konditionierung. Voraussetzung für dieses wohl am umfassendsten studierten Langzeitgedächtnisses bei *Drosophila* ist die Synthese neuer Proteine, welche sich durch eine sich wiederholende und mit Pausen unterbrochene Präsentation von Duft und aversivem Stimulus initiieren lässt (Tully et al., 1994). Bei der appetitiven Konditionierung hingegen bewirkt bereits eine einzelne Paarung von Duft und Zucker die Formierung eines Proteinbiosynthese-abhängigen Langzeitgedächtnisses. Im Gegensatz zum aversiven Gedächtnis wird das appetitive Gedächtnis lediglich für drei Tage aufrecht erhalten, selbst bei sich wiederholender Paarung der präsentierten Stimuli (Colomb et al., 2009).

Sollte ein Weibchen dauerhaft alkoholhaltiges Futter präferieren, obwohl keine Gefahr mehr durch Wespen besteht, die Larven aber trotzdem toxische Mengen an Alkohol konsumieren? Ist es sinnvoll für ein Männchen die Balz komplett aufzugeben, obwohl zahlreiche jungfräuliche Weibchen darauf warten, befruchtet zu werden? Und in wie fern ist es nützlich für eine Fliege, im natürlichen Lebensraum einen generell Futter-versprechenden Duft zu meiden, wenn die negative Erfahrung lokal begrenzt erfolgte? Das ein Gedächtnis mit der Zeit vergeht trägt demnach zum Erfolg eines jeden Individuums bei. Für die Analyse der Gedächtnisaufrechterhaltung hingegen soll vielmehr ein Gedächtnis herangezogen werden, welches annähernd lebenslang Bestand hat: Das Körpergrößengedächtnis.

1.5.1 Das Körpergrößengedächtnis

Taufliegen sind dazu befähigt, die Größe ihres eigenen Körpers zu lernen und ein langanhaltendes, vermutlich lebenslanges Gedächtnis darüber auszubilden. Diese Informationen werden unter Zuhilfenahme eines Verhaltensparadigmas gewonnen, welches 2005 dazu etabliert wurde, um die motorische Ausführung und Koordination eines zielgerichteten Klettervorgangs zu studieren (Pick und Strauss,

2005). Daneben diene das Lückenüberwindungsparadigma als Werkzeug zur Analyse der Motivationslage bei Fliegen (Ries et al., 2017). Zur Erforschung des Körpergrößengedächtnisses wurde es erstmalig 2015 eingesetzt (Krause, 2015).

Eine flugunfähig gemachte Fliege wird mit einem Plastikblock konfrontiert, dessen obere Kante durch eine Lücke unterbrochen ist. Erklimmt sie diesen und entscheidet sich für einen Kletterversuch an einer für sie überwindbaren Lücke, läuft dieses Verhalten wie folgt ab: Nach Anlauf an die Lücke treten die Vorderbeine ins Leere. Die Fliege stoppt, wenn sich die Hälfte ihres Körpers über dem Spalt befindet. Nach einem kurzen Erstarren werden die Vorderbeine in die Luft und über den Kopf gehoben, sodass Suchschläge zur gegenüberliegenden Seite ausgeführt werden können. Dieses sogenannte „Bein-über-Kopf Verhalten“ (Abbildung 4A) ist charakteristisch für einen Kletterversuch, da es während des normalen Laufens nicht auftritt. Während der Ausführung der Suchschläge wird die Reichweite durch Justierung der Position der Füße und des Körpers optimiert. Die Fliege richtet sich horizontal aus, sobald die Vorderbeine die gegenüberliegende Seite erreichen (Abbildung 4B). Daraufhin wird das mittlere Beinpaar auf die andere Seite verlagert. Das hintere Beinpaar folgt nach, sodass der Körper in die Lücke rotiert. Der Lauf kann nachfolgend fortgesetzt werden (Pick und Strauss, 2005).

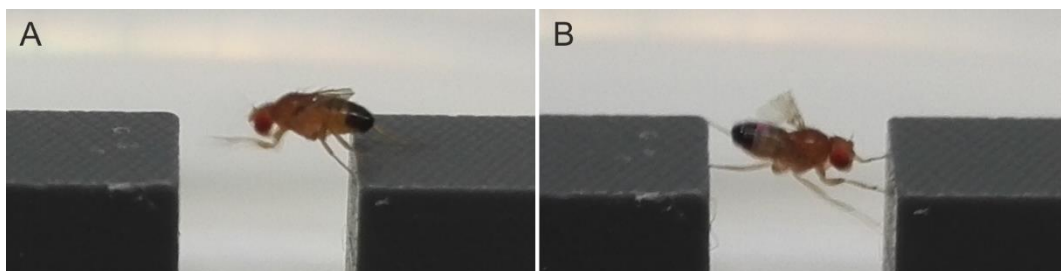


Abbildung 4: **Das Kletterverhalten einer wildtypischen männlichen *Drosophila*.** (A) „Bein-über-Kopf Verhalten“ (B) Horizontale Ausrichtung nach Kontakt mit der gegenüberliegenden Lückenseite. Verwendung einer 3,5 mm breiten Lücke.

Lücken, die sehr klein sind (2,0 mm) können mittels normalen Laufens überschritten werden. Zur Überwindung von größeren Lücken ist für flugunfähig gemachte Fliegen die Ausführung der Vorderbein-Suchschläge notwendig. Interessanterweise bedienen sich besonders kleine Fliegen zur erfolgreichen Lückenüberwindung bereits bei einer 2,5 mm breiten Lücke der Suchschläge,

wohingegen besonders große Fliegen diese erst bei einer 3,0 mm breiten Lücke ausführen (Größenunterschied: 15,8 Prozent). Die Wahrscheinlichkeit für die Ausführung der Suchschläge ist an der 3,5 mm breiten Lücke bei kleinen und großen Fliegen maximal (Krause, 2015). Steigt die Lückengröße weiter an, korreliert dies negativ mit der Initiation des „Bein-über-Kopf Verhaltens“. D.h. Fliegen sehen von Kletteraktionen an unüberwindbaren Lücken ab und durchlaufen vielmehr die Lücke oder drehen an der Kante um. Auch hier ist ein Zusammenhang zwischen der Körpergröße der Fliegen und der Größe der Lücke auffällig; die Reduktion der Suchschläge setzt bei kleinen Fliegen eher ein (Kienitz, 2010). Folglich liegt nahe, dass Fliegen ein Wissen über die eigene Körpergröße besitzen (Krause, 2015) und ihr Verhalten an der Lücke danach ausrichten (Kienitz, 2010).

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Fliegen, welche unter standardisierten hell/dunkel-Bedingungen aufwuchsen, zeichnen sich dunkel-aufgezoogene, d.h. visuell naive Fliegen, durch eine übermäßige Kletterbereitschaft an nicht überwindbaren Lücken aus (Krause, 2015). Um aber eine korrekte Einschätzung der Distanz zur gegenüberliegenden Seite der Lücke vorzunehmen, bedarf es der visuellen Kontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass bewegungsblinde Fliegen, in welchen die Photorezeptoren R1 - R6 degeneriert vorliegen, im Gegensatz zu Kontrollfliegen an überwindbaren Lücken keine Überkletterungen ausüben. Experimentell konnten Pick und Strauss herausfinden, dass die Messung der Entfernung bis zur gegenüberliegenden Lückenseite weder durch Akkommodation, binokulares Sehen, Bewegungsparallaxe durch seitliche oder Auf- und-Abwärtsbewegungen des Kopfes, noch durch optische Expansion vorgenommen wird. Vielmehr erfolgt die Einschätzung der Entfernung über Bewegungsparallaxe, die auf latero-lateralen Kopfbewegungen basieren, welche während des Laufens natürlich generiert werden (Pick und Strauss, 2005). Aufgrund der eigenen Vorwärtsbewegung verschiebt sich die gegenüberliegende Seite der Lücke über das Blickfeld der Fliege. Diese Verschiebung wird als Bewegungsparallaxe bezeichnet (Eglsperger, 2001).

Darüber hinaus ist bekannt, dass eine intakte Protozerebralbrücke für die Aneignung dieses Wissens erforderlich ist. *ocelliless* (*oc¹*)-Mutanten, deren PB bis auf die äußersten beiden Glomeruli nicht vorhanden ist, weichen in der visuellen

Ausrichtung ihrer Suchschläge zur gegenüberliegenden Seite auffallend vom Wildtyp ab. Folglich reduziert sich ihr Klettererfolg an kleinen Lücken massiv (Triphan et al., 2010). Darüber hinaus bekräftigt deren Phänotyp, an unüberwindbaren Lücken vermehrt zu klettern, die Notwendigkeit der PB (Krause, 2015).

Der molekularbiologische Mechanismus, auf den sich das Erlernen der Körpergröße stützt, basiert auf dem cAMP-Signalweg (1.2). Fehlt einem Fliegenstamm eine Komponente der Lernkaskade (AC, kodiert durch *rutabaga* oder PDE, kodiert durch *dunce*) zeigen die Fliegen ein unverhältnismäßiges Kletterverhalten selbst an unüberwindbaren Lücken (Kienitz, 2010; Krause, 2015). In seiner Dissertation konnte Krause zeigen, dass dieser Phänotyp in *rut¹*-Mutanten durch Expression von Rut in ausgewählten Neuronen der Protozerebralbrücke gerettet werden kann. Dafür nutzte er Treiberlinien, welche in den latero-lateralen Neuronen der Protozerebralbrücken (LPB) exprimieren; diese sorgen für einen Informationstausch innerhalb der PB-internen Glomeruli. In diesen Neuronen garantiert ein erhöhter cAMP-Spiegel und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors dCREB2 eine korrekte Körpergrößeneinschätzung und somit eine adäquates Verhalten an der Lücke. Gegensätzlich dazu verhalten sich die Anforderungen sogenannter PFN-Neurone (auch als kolumnäre Neurone bezeichnet). PFN-Neurone gehören zu den Kleinfeldneuronen und verknüpfen die Protozerebralbrücke, den Fächerförmigen Körper und die Noduli miteinander. Es wurde gezeigt, dass der exzessive Kletterphänotyp in der *dnc¹*-Mutante durch Expression von Dnc in den PFN-Neuronen gerettet werden kann. Ein anderes Experiment zeigt, dass eine Erhöhung der dCREB2-Aktivität durch Expression der dCREB2-cDNA in den PFN-Neuronen massiv der Ausbildung eines Körpergrößengedächtnisses schadet (Krause, 2015). Somit benötigen die PFN-Neurone für eine richtige Körpergrößeneinschätzung die Aktivität der regulatorischen Mechanismen, zur Inaktivierung von cAMP und dCREB2.

Krause postuliert daraus ein Modell des Körperreichweitenlernens (Abbildung 5). Grundlage dessen ist eine hypothetische Verschaltung von Neuronen vier verschiedener Kategorien. Demnach erhalten die LPB-Neurone aktivierenden Eingang von Neuronen, die die Efferenzkopie des Laufens repräsentieren, und von Neuronen, welche die Bewegungsparallaxe vermitteln. Mit Hilfe einer Efferenzkopie

unterscheidet das Hirn zwischen Eigenbewegung und Fremdbewegung; sie stellt eine Rückmeldung über die selbstständig ausgeführte Lokomotion dar. Postsynaptisch der LPB-Neurone liegen die PFN-Neurone. Diese erhalten zudem inhibierenden Eingang durch die Neurone der Bewegungsparallaxe. (1) Naiven Fliegen fehlt durch die Dunkelaufzucht der Eingang der Bewegungsparallaxe, ihr Verhalten zeichnet sich durch übermäßiges Klettern aus. (2) Gibt man naiven Fliegen die Möglichkeit, in einer visuell strukturierten Umgebung ihre Körpergröße zu lernen, führt die koinzidente Aktivierung der LPB-Neurone durch Eingang der Bewegungsparallaxe und der Efferenzkopie des Laufens zu einer Stärkung der Synapse zwischen LPB- und PFN-Neuronen. Dies beruht auf einem Anstieg des internen cAMP-Spiegels und der daraus folgenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors dCREB2. Parallel dazu reduziert sich in den PFN-Neuronen durch die Inhibition der Bewegungsparallaxe das cAMP-Level, wodurch weniger dCREB2 phosphoryliert wird. Die synaptische Verbindung zwischen PFN-Neuronen und denen, die nachgeschaltet den Kletterbefehl vermitteln, wird dadurch geschwächt. (3) Wird eine Fliege mit bereits konsolidiertem Körpergrößengedächtnis mit einer Lücke konfrontiert, so generiert die gegenüberliegende Lückenseite die Bewegungsparallaxe. Dabei erzeugen kleinere Lücken mehr Bewegungsparallaxe als größere Lücken; die Distanz zur gegenüberliegenden Lückenseite ist bei diesen geringer. Durch die vorangegangene Eichung des Körpergrößeneempfindens in der Lernphase führt die Fliege während des Tests nur an solchen Lücken das „Bein-über-Kopf Verhalten“ aus, welche physiologisch von ihr überwunden werden können. Generell besteht dabei eine Korrelation zwischen der Beinlänge und der Körpergröße (Siomava et al., 2016). Schlüpft eine Fliege mit besonders großer Körpergröße, generiert diese aufgrund ihrer langen Beine auch lange Schritte und damit mehr Bewegungsparallaxe als eine kleine Fliege. Die LPB-PFN-Synapse größerer Tiere wird dadurch während des Lernens mehr gestärkt als die Synapse kleinerer Tiere. Dies führt dazu, dass größere Tiere mit konsolidiertem Körpergrößengedächtnis an einer definierten Lückengröße mehr Kletterversuche wagen, als deren kleinere Artgenossen (Krause, 2015).

für das Studium der Gedächtnisaufrechterhaltung. Bislang ist wenig dazu bekannt, wie nach dem Lernen Veränderungen an der Synapse fortbestehen können.

Einer Hypothese zufolge sollen dauerhaft aktive Kinasen dafür sorgen, dass post-translational phosphorylierte Proteine permanent aktiv bleiben (Asok et al., 2019). Zu den Kinasen zählen die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) und die Proteinkinase M zeta (PKM ζ). Die CaMKII umfasst zwölf Untereinheiten, die jeweils aus einer katalytischen und einer regulatorischen Region bestehen und vom sekundären Botenstoff Calmodulin (CaM) aktiviert werden können. Diese Aktivierung hat nur solange Bestand, bis CaM wieder entfernt wird. Sorgt CaM für eine anfänglich schnelle Aktivierung aller zwölf Untereinheiten der CaMKII bei gleichzeitig langsamerer Dephosphorylierung der Untereinheiten, tritt eine Ca^{2+} -unabhängige Autophosphorylierung der Kinase ein. Bei diesem selbst-erhaltenden Vorgang phosphoryliert eine katalytische Untereinheit die nächst-benachbarte. Strukturelle und funktionelle Veränderungen zur Stärkung der Synapse bleiben so beständig (Malik und Hodge, 2014; Bear et al., 2018; Asok et al., 2019). In *Drosophila* wurde die Rolle der CaMKII in der Balzsuppression (Griffith et al., 1993) und in der olfaktorischen Konditionierung (Malik und Hodge, 2014) untersucht. Es wurde herausgefunden, dass sich Fliegenmännchen, die ein CaMKII-inhibitorisches Peptid exprimieren, während des Trainings der Balzsuppression normal verhalten. Eine Stunde nach Training bei Kontakt mit einer Jungfrau agieren sie jedoch, als hätte kein Training stattgefunden, d. h. sie zeigen keine verzögerte Balzinitiation (Griffith et al., 1993). In der olfaktorischen Konditionierung wird die Formierung eines sogenannten mittelfristigen Gedächtnisses (*Middle Term Memory*, MTM) und des LTM beeinträchtigt bei Fehlregulation der CaMKII-Autophosphorylierung. Die Autoren heben dabei die Funktion der Kinase CASK hervor, die bei Abwesenheit von CaM eine alternative Autophosphorylierungsstelle bedient und dadurch die Funktion der CaMKII inhibiert (Malik und Hodge, 2014). Von der zweiten dauerhaft aktiven Kinase PKM ζ ist bekannt, dass sie die Endozytose von AMPA-Rezeptoren reguliert. Besonders ist, dass die mRNA der Kinase in die Dendriten transportiert, aber erst bei Stimulation der Synapse translatiert wird. Parallel bewirkt die synaptische Aktivität die Neu-Synthese der katalytisch aktiven Form der PKM ζ . Eine Blockade von PKM ζ durch das Peptid ZIP führt zur Entfernung bereits gespeicherter Erinnerungen (Bear

et al., 2018; Asok et al., 2019). Die Arbeitsgruppe um Yin konnte dieser atypischen Kinase auch eine Rolle in der olfaktorischen Gedächtnisaufrechterhaltung bei *Drosophila* zuschreiben. Über Western Blot-Analyse zeigte die Gruppe, dass die *Drosophila*-PKC ζ , als auch deren gekürzte und dauerhaft aktive Isoform PKM ζ , in der Fliege zu finden und insbesondere im Gehirn angereichert ist. Die Arbeitsgruppe beschreibt die *Drosophila*-PKC ζ als stark-homolog zur Maus-PKC ζ . Sie wiesen nach, dass bei Verfütterung eines PKC-Inhibitors und Expression einer Kinase-inaktiven Maus-aPKM ζ das 24 Stunden-Gedächtnis nach *Massed Training* deutlich reduziert vorliegt. Gegensätzlich dazu bewirkt die Expression der Maus-aPKM ζ eine erhebliche Verbesserung des 4 Tage-Gedächtnisses nach *Massed Training* (Drier et al., 2002). Beim besagtem Training handelt es sich um eine Proteinbiosynthese-unabhängige Gedächtnis-Variante (Dauer: 3 Tage), welche durch zehn nacheinander geschaltete Trainingszyklen gebildet wird (Tully et al., 1994).

Ein anderer Ansatz berücksichtigt die Tatsache, dass strukturelle und funktionelle Veränderungen, die dem Erlernen neuer Informationen folgen, spezifisch an denjenigen Synapsen vorgenommen werden, welche während des Lernens aktiv stimuliert wurden. Einer Hypothese zufolge wird diese Spezifität durch den sogenannten „*Synaptic-Tagging-and-Capture*“-Mechanismus gewährleistet. Nach Transkription von Genen synaptischer Proteine im Zellkern, findet die Translation deren mRNA erst lokal in der Synapse statt, die zuvor durch Stimulation markiert worden ist. *Drosophila*-Forschungsergebnisse zur Balz legen nahe, dass Orb2 diese Markierung und Synapsen-spezifische Translation zur Ausbildung und Aufrechterhaltung eines LTMs übernimmt (Krüttner et al., 2015). Orb2 ist ein Ortholog des RNA-bindenden Proteins CPEB2 (*cytoplasmatic polyadenylation element binding protein 2*), kann in den Isoformen Orb2A und Orb2B auftreten, und besitzt eine C-terminale RNA-bindende Domäne und eine N-terminale Prionen-ähnliche Glutamin-reiche Domäne (Li und Dubnau, 2012). Es konnte herausgefunden werden, dass Orb2A hauptsächlich in den Synapsen auftritt und diese während der Gedächtnisakquise für eine mögliche, sich anschließende Gedächtnisspeicherung markiert. Während der Konsolidierung erfolgt dann die Rekrutierung von Orb2B in einen translational aktiven Protein-Komplex ausschließlich lokal in den markierten Synapsen. Zur Ziel-mRNA der RNA-bindenden

Domäne von Orb2B zählt u. a. die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II (Krüttner et al., 2015). Besonders ist, dass diese translationale Regulation in einem selbst-erhaltenden Vorgang fortbestehen und somit die Gedächtnisaufrechterhaltung garantieren kann. Der Mechanismus beruht auf der Eigenschaft der Glutamin-reichen Prion-ähnlichen Domäne der Orb2A-Isoform, bei Aktivierung eine kontrollierte Konformationsänderung einzugehen, welche dauerhaft aktiv ist (Li und Dubnau, 2012; Asok et al., 2019).

Weitere Akteure in der Gedächtnisaufrechterhaltung sind die sogenannten microRNAs (miRNAs). Bei diesen 18-23 Nukleotid-langen nicht-kodierenden RNAs handelt es sich um post-transkriptionale Regulatoren der Genexpression, welche Ziel-mRNAs binden und deren Translation dadurch unterbinden (Schratt, 2009). Eine Studie zu *Aplysia californica* konnten zeigen, dass während des Lernens die Ausschüttung des Neurotransmitters Serotonin das Level der miR-124 vermindert; ein Vorgang, der über die MAP-Kinase gesteuert wird. Direkte Konsequenz der miR-124-Reduktion ist eine Heraufregulierung der CREB1-mRNA und somit eine Induktion synaptischer Modulationen zur Langzeitgedächtnisbildung. Daneben deuten die Ergebnisse auf eine Kontrolle der Gedächtnisaufrechterhaltung durch miR-124 (Rajasethupathy et al., 2009). Diese Behauptung wird gestützt von einer zweiten Studie, nach der die Ausschüttung von Serotonin eine Herunterregulation der miR-22 hervorruft; auch hier vermittelt über die MAPK-Signalkaskade. Als Folge kommt es zur Aufhebung einer Translationsblockade der CPEB-mRNA, welche bekannt dafür ist, als Prionen-ähnliches Protein die synaptische Plastizität zu regulieren. Darüber hinaus zeigt die Arbeit, dass eine Inhibition von miR-22 das Level atypischer PKC (nach Proteolyse aPKM) anhebt (Fiumara et al., 2015). Wie zuvor genannt, gilt diese atypische Kinase als Kandidat der langfristigen Gedächtnisspeicherung. Eine *Drosophila*-Studie der Arbeitsgruppe um Dubnau konnte zeigen, dass die miR-267a repressiv auf die Expression des dopaminergen Rezeptors (DopR, Typ 1) in den Pilzkörpern wirkt. Bei Mutation der miR-267a kommt es zur Heraufregulierung des DopR und einer sich anschließenden Reduktion des 24 Stunden-, Proteinbiosynthese-abhängigen LTMs (Li et al., 2013). Ursprünglich sind mi-RNAs als Regulatoren zellulärer Prozesse wie der Zellproliferation, der Apoptose

oder dem neuronalen Wachstum bekannt; ihre Funktion in der Regulation synaptischer Plastizität wurde erst neu aufgedeckt (Rajasethupathy et al., 2009).

Abschließend sollen epigenetische Mechanismen als Regulatoren der Gedächtnisaufrechterhaltung diskutiert werden. Epigenetische Mechanismen agieren über post-translationale Modifikationen der DNA und der Histone. Dadurch bleibt die DNA-Sequenz selbst unverändert, vielmehr wird der Expressions-Status der Gene moduliert. Dies geschieht beispielsweise über die epigenetische Variante der Acetylierung, bei der es zum Anfügen einer Acetylgruppe an die Aminogruppe eines Lysin-Restes eines Histons kommt. Durch diese Bindung wird die zuvor positive Ladung neutralisiert und die DNA-Histon-Interaktion geschwächt. Die Auflockerung des Chromatins ermöglicht der RNA-Polymerase II die Bindung an die DNA und die Initiation der Transkription (Miller und Sweatt, 2007). Neben dieser Transkriptionsfördernden Modulation sorgt u. a. die Histon-Deacetylierung für eine negative Regulation der Genexpression. Letztlich entscheidet jedoch eine Kombination epigenetischer Markierungen (u. a. Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung von Histonen) darüber, ob ein Gen abgelesen wird oder nicht (Berger, 2007). Epigenetische Modulationen sind ursprünglich bekannt aus der Entwicklung und dabei essentiell für die Festlegung der zellulären Identität und deren Beibehaltung über die Zellteilung hinaus (Miller und Sweatt, 2007). Dieser Mechanismus zur Wahrung eines zellulären Gedächtnisses wurde als Vorbild genommen, um die molekularen Grundlagen hinter der Aufrechterhaltung gelernter Informationen zu verstehen. Vorausgesetzt wurde, dass im Sinne einer dynamischen synaptischen Plastizität epigenetische Markierungen reversibel gesetzt und entfernt werden können (Levenson und Sweatt, 2006). Ein Beispiel epigenetischer Kontrolle des Langzeitgedächtnisses wurde von der Arbeitsgruppe um Schenck publiziert. Der Fokus der Arbeitsgruppe lag auf der Erforschung der Euchromatin-spezifischen Histon-Methyltransferase G9a, welche an Histon 3 den Lysinrest 9 (H3K9) zweifach methyliert. Kommt es zur Überexpression oder zum Fehlen von G9a innerhalb der Pilzkörper von *Drosophila*, resultiert dies in einem verschlechterten Gedächtnis männlicher Fliegen nach vorangegangener Balzsuppression (Kramer et al., 2011). Neben der Aufgabe epigenetischer Faktoren in der Chromatin-Auflockerung und – Verpackung können diese aber auch direkt über post-translationale Modifikationen

synaptischer Proteine die synaptische Plastizität regulieren. So ist bekannt, dass Bruchpilot, eine präsynaptische Komponente der aktiven Zone, von der Histon Deacetylase 6 (HDAC6) reguliert wird. Die Modulation des Acetylierungsgrades des C-terminalen Endes von Bruchpilot ist bestimmend für die Anbindung von Vesikeln und damit für die synaptische Transmission und Plastizität. Die Arbeitsgruppe um Ray konnte zeigen, dass *Drosophila*-Larven und adulte Fliegen mit mutierter Histon Deacetylase 6 (HDAC6) einen zuvor gelernten Duft nachfolgend nicht erinnern können (Perry et al., 2017). Inwieweit epigenetische Faktoren im Aufrechterhaltungsprozess eines nahezu lebenslangen Gedächtnisses benötigt werden, ist bislang nicht bekannt und soll nachfolgend thematisiert werden.

1.7 Zielsetzung

Drosophila melanogaster ist es möglich, ihre Spannweite beim Klettern zu erlernen und diese Information in ein langanhaltendes, vermutlich lebenslanges Gedächtnis zu überführen (Körpergrößengedächtnis). Mithilfe des Lückenüberwindungsparadigmas kann festgestellt werden, ob Fliegen ihre Kletterinitiationen der zu überwindenden Lückengröße anpassen und somit ein Körpergrößengedächtnis besitzen. Es wird postuliert, dass während des Lernens die Körpergrößeneichung über Verrechnung der Schrittlänge, bzw. –Frequenz mit der generierten Bewegungsparallaxe erfolgt. Als Ort der Verrechnung wird die Protozerebralbrücke angegeben, unter Berücksichtigung der latero-lateralen Neuronen der PB und der PFN-Neuronen, welche die PB mit dem Fächerförmigen Körper und den Noduli verknüpfen. Eine neurogenetische Analyse ergab, dass die aus der olfaktorischen Konditionierung bekannte Signalkaskade über cAMP, PKA und dCREB2 in den beiden Neuronen-Bündeln unterschiedlich reguliert vorliegt – mit hoher Aktivität in den lateralen PB-Neuronen und geringer Aktivität in den PFN-Neuronen (Krause, 2015). Basierend auf dieser umfassenden Grundlage sollen weiterführende Fragestellungen beantwortet werden. Der Fokus wird dabei auf den lateralen Protozerebralbrückenneuronen liegen. Aufgrund des Nachweises eines erhöhten cAMP-Spiegels und der damit einhergehenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors dCREB2 in diesen LPB-Neuronen, ist davon auszugehen, dass die Gedächtnisspur zur Körpergröße in diesen Zellen lokalisiert liegt.

Der erste Themenkomplex dieser Arbeit kann unter dem Aspekt der Gedächtnislokalisierung zusammengefasst werden. Durch Evaluation alternativer Protozerebralbrücken-Treiber sollen Linien mit distinktem Expressionsmuster identifiziert werden, mit denen die Kartierung des Gedächtnisses weiter eingegrenzt werden kann (Krause, 2015). Darüber hinaus soll immunhistochemisch bestimmt werden, welche nach Wolff et al. (Wolff et al., 2015) identifizierten Zelltypen des Zentralkomplexes im Muster der verwendeten PB-Linien enthalten sind. Abschließend ist von Interesse, ob im Sinne des postulierten Körpergrößenmodells synaptische Kontakte zwischen den LPB- und den PFN-Neuronen bestehen.

Der zweite Themenkomplex dieser Arbeit befasst sich mit der weiterführenden Charakterisierung der Physiologie des Körpergrößengedächtnisses. Nachdem herausgefunden wurde, dass Fliegen in der Lage sind ihre Körpergröße zu erlernen, bleibt von Interesse, ob dies auf eine bestimmte Phase begrenzt ist oder zu jedem Zeitpunkt im Leben der Fliege erfolgen kann. Auch ist bislang nicht gezeigt worden, ab welchem Zeitpunkt nach der Aneignung des Körpergrößenwissens dieses auch wieder abgerufen werden kann. Zuletzt soll das Körpergrößengedächtnis als Langzeitgedächtnisform qualifiziert werden über den Nachweis von Proteinbiosynthese als essentiellen Aspekt der Konsolidierung.

Der dritte Themenkomplex der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie Gedächtnisaufrechterhaltung in den lateralen Protozerebralbrückenneuronen gewährleistet wird. Dies könnte zum einen über eine permanente Aktivität des Transkriptionsfaktors dCREB2 sichergestellt werden. Zum anderen könnten dCREB2-nachgeschaltete Mechanismen die Genexpression synaptischer Proteine dauerhaft regulieren. Aus den unter 1.6 vorgestellten Hypothesen nachgeschalteter Mechanismen zur Gedächtnisaufrechterhaltung wird der Fokus auf die Epigenetik gelegt. Beide Möglichkeiten sollen im Folgenden analysiert werden und zur prinzipiellen Aufklärung von Gedächtnis-Aufrechterhaltungsprozessen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Zucht

2.1.1 Fliegenstämme

In Tabelle 1 sind die in der vorliegenden Arbeit genutzten Fliegenstämme angegeben, inkl. Lokalisation der genetischen Veränderung, Bezugsquelle und zugehöriger Referenz.

Tabelle 1: **Fliegenstämme** mit Vermerk zur Lokalisation der Modifikation (Chromosom), Bezugsquelle und Bestandsnummer, sowie einer Referenz. *Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)*, *Vienna Drosophila Resource Center (VDRC)*.

Stamm	Chromosom	Bezugsquelle, Bestandsnummer	Referenz
Canton-Spezial (CS)		AG Strauß, IDN, Universität Mainz	
<i>rut</i> ¹	I	BDSC #9404	(Levin et al., 1992)
Effektoren [UAS]			
UAS- <i>dCreb2-a</i>	III	BDSC #9233	(Perazzona et al., 2004)
UAS- <i>dCreb2-b</i>		R. Davis, Florida	(Yu et al., 2006)
<i>w</i> [*] ;UAS- <i>mC</i> [*]	III	Poeck, Mainz	(Li et al., 1995)
<i>rut</i> ²⁰⁸⁰ ;UAS- <i>rut</i>	I, II	BDSC #9405	(Zars et al., 2000)
<i>w</i> [*] ; <i>lexAop-nSyb::spGFP</i> ₁₋₁₀ , UAS-CD4::spGFP ₁₁ /CyO; <i>MKRS/TM6B</i>	I, II, III	BDSC #64315	(Macpherson et al., 2015)
<i>w</i> [*] ; UAS- <i>nSyb::spGFP</i> ₁₋₁₀ , <i>lexAop-CD4::spGFP</i> ₁₁ /CyO	I, II	BDSC #64314	(Macpherson et al., 2015)
<i>y</i> ¹ <i>w</i> [*] ;UAS- <i>myrGFP</i> ,QUAS- <i>mtdTomato-3xHA</i> ; <i>trans-Tango</i>	I, II	BDSC #77124	(Talay et al., 2017)
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ;UAS- <i>DenMark</i> , UAS- <i>syt.eGFP</i> ;In(3L)D/ <i>TM6C,Sb</i> ¹	I, II	BDSC # 33064	(Nicolai et al., 2010)
Effektoren [UAS-RNAi]			
UAS- <i>Ada2b-RNAi</i>	III	BDSC #31347	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Ada3-RNAi</i>	III	BDSC #28905	(Perkins et al., 2015)

UAS- <i>Ada3</i> -RNAi	III	BDSC #32451	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Art1</i> -RNAi	III	BDSC #31348	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Art4</i> -RNAi	III	BDSC #31349	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>ash1</i> -RNAi	III	BDSC #31050	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>ash2</i> -RNAi	III	BDSC #35388	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Bin1</i> -RNAi	III	BDSC #31048	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Caf1-180</i> - RNAi/TM3,Sb1	III	BDSC #28918	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>CG1894</i> -RNAi	III	BDSC #34925	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Chd1</i> -RNAi	III	BDSC #34665	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>chm</i> -RNAi	III	BDSC #27027	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>chm</i> -RNAi	III	BDSC #32484	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Chrac-16</i> -RNAi	III	BDSC #51155	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Crtc</i> -RNAi	III	BDSC #28886	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Crtc</i> -RNAi/ <i>CyO</i>	II	BDSC #42561	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>dCBP</i> -RNAi	III	BDSC #27724	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>dCBP</i> -RNAi	III	BDSC #31728	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>dCBP</i> -RNAi	II	VDRC #46534	(Dietzl et al., 2007)
UAS- <i>dCBP</i> -RNAi	II	VDRC #102885	(Dietzl et al., 2007)
UAS- <i>dnc</i> -RNAi	II	VDRC # 107967	(Dietzl et al., 2007)
UAS- <i>egg</i> -RNAi	III	BDSC #31352	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>enok</i> -RNAi/ <i>TM3,Sb1</i>	III	BDSC #29518	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>enok</i> -RNAi	III	BDSC #40917	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>esc</i> -RNAi	III	BDSC #31618	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>E(z)</i> -RNAi	III	BDSC #31617	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>G9a</i> -RNAi	III	BDSC #31630	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Gcn5</i> -RNAi	III	BDSC #33981	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>gpp</i> -RNAi	III	BDSC #31327	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Gug</i> -RNAi	III	BDSC #32961	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Hat1</i> -RNAi	III	BDSC #34730	(Perkins et al., 2015)

UAS- <i>HDAC1</i> -RNAi	III	BDSC #31616	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>HDAC3</i> -RNAi	III	BDSC #31633	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>HDAC4</i> -RNAi	III	BDSC #28549	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>HDAC6</i> -RNAi	III	BDSC #31053	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>HDAC11</i> -RNAi	III	BDSC #32480	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>kis</i> -RNAi	III	BDSC #34908	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>lid</i> -RNAi	III	BDSC #28944	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>LKRS DH</i> -RNAi	III	BDSC #35470	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>mle</i> -RNAi/ <i>TM3,Sb1</i>	III	BDSC #34864	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>mof</i> -RNAi/ <i>CyO</i>	II	BDSC #36870	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>mof</i> -RNAi/ <i>CyO</i>	II	BDSC #58281	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>mof</i> -RNAi/ <i>TM3,Sb1</i>	III	BDSC #33698	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>mof</i> -RNAi	III	BDSC #31401	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>msl-1</i> -RNAi/ <i>CyO</i>	II	BDSC #39012	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>msl-3</i> -RNAi	III	BDSC #35272	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>NSD</i> -RNAi	III	BDSC #34033	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Pc</i> -RNAi	III	BDSC #31110	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Pc</i> -RNAi	III	BDSC #33964	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Pcl</i> -RNAi	III	BDSC #31189	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Pcl</i> -RNAi	III	BDSC #33945	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>pho</i> -RNAi	III	BDSC #31609	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>PKA-R1</i> -RNAi	II	VDRG #103720	(Dietzl et al., 2007)
UAS- <i>Psc</i> -RNAi	III	BDSC #31611	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>PR-Set7</i> -RNAi/ <i>TM3,Sb1</i>	III	BDSC #35322	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>PR-Set7</i> -RNAi	II	BDSC #67346	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Ptip</i> -RNAi	III	BDSC #31741	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Ptip</i> -RNAi	III	BDSC #35269	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>RYBP</i> -RNAi/ <i>TM3,Sb1</i>	III	BDSC #33974	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Rtf1</i> -RNAi	III	BDSC #31718	(Perkins et al., 2015)

UAS- <i>Sce</i> -RNAi	III	BDSC #31612	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Scm</i> -RNAi	III	BDSC #31614	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Set1</i> -RNAi	III	BDSC #33704	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Set1</i> -RNAi/ <i>CyO</i>	II	BDSC #40931	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Set1</i> -RNAi/ <i>TM3</i>	III	VDRC #10833	(Dietzl et al., 2007; Mummery-Widmer et al., 2009)
UAS- <i>Set2</i> -RNAi	III	BDSC #31355	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sfmbt</i> -RNAi	III	BDSC #28677	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sin3A</i> -RNAi	III	BDSC #32368	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sirt1</i> -RNAi	III	BDSC #32481	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sirt1</i> -RNAi/ <i>CyO</i>	II	BDSC #53697	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sirt2</i> -RNAi	III	BDSC #31613	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sirt2</i> -RNAi/ <i>CyO</i>	II	BDSC #36868	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sirt4</i> -RNAi/ <i>TM3,Ser1</i>	III	BDSC #31638	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sirt6</i> -RNAi	III	BDSC #34530	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sirt6</i> -RNAi	III	BDSC #31399	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Sirt7</i> -RNAi	III	BDSC #31093	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Su(var)205</i> -RNAi	III	BDSC #33400	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Su(z)12</i> -RNAi	III	BDSC #31191	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Tip60</i> -RNAi	III	BDSC #28563	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Tip60</i> -RNAi	III	BDSC #35243	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Top2</i> -RNAi	III	BDSC #31342	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>Top2</i> -RNAi	III	BDSC #35416	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>tou</i> -RNAi	III	BDSC #31637	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>trr</i> -RNAi	III	BDSC #29563	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>trx</i> -RNAi	III	BDSC #31092	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>YL-1</i> -RNAi	III	BDSC #31938	(Perkins et al., 2015)
UAS- <i>YL-1</i> -RNAi	III	NIG-FLY #4621R- 2	(Dietzl et al., 2007)

Treiber [GAL4]			
<i>w*</i> ; <i>sna</i> ^{ScO} / <i>CyO</i> ; <i>Tub</i> - <i>GAL80</i> ^{ts}		BDSC #7018	(McGuire et al., 2003)
R55G08- <i>Tub</i> > <i>GAL80</i> ^{ts}	III	Diese Arbeit	Rekombiniertes Chromosom
R55G08-GAL4	III	BDSC #50422	(Jenett et al., 2012)
R55G08-lexA	II	BDSC #53544	(Pfeiffer et al., 2010)
007Y-GAL4	III	BDSC #30812	(Renn et al., 1999)
R73D06-GAL4	III	BDSC #46692	(Jenett et al., 2012)
R84A01-GAL4/ <i>TM3,Sb</i> ¹	III	BDSC #48375	(Jenett et al., 2012)
R52B10-GAL4	III	BDSC #38820	(Jenett et al., 2012)
R44B10-GAL4	III	BDSC #50202	(Jenett et al., 2012)
R16D06-GAL4	III	BDSC #48724	(Jenett et al., 2012)
R15D05-GAL4	III	BDSC #48686	(Jenett et al., 2012)

2.1.2 Fliegenhaltung

Für die Haltung der Fliegen wurden zwei Klimakammern genutzt: Fliegen, welche frequentiert verwendet und im Verhalten getestet wurden, befanden sich in einer 25°C-Klimakammer (60 % Luftfeuchtigkeit). Sie wurden wöchentlich umgesetzt, damit die Fliegen mit ausreichend Futter versorgt waren und einer Überbevölkerung innerhalb der Gläschen entgegengewirkt werden konnte. Die Linien hingegen, die nur unregelmäßig experimentelle Verwendung fanden, standen aus Kosten- und Effizienzgründen auf 18°C (60 % Luftfeuchtigkeit). Der Entwicklungszyklus der Fliegen verlangsamt sich mit abnehmender Temperatur (Angilletta, Jr. ,Michael J. et al., 2004), das Umsetzen der Fliegen wurde auf jede dritte Woche reduziert. Der Hell-/Dunkelrhythmus betrug in beiden Kammern 14/10 Stunden.

Bei den Haltungsgefäßen handelte es sich um zylindrische Plastikgläschen (Höhe: 8 cm, Durchmesser: 3,5 cm), die mit einem Milben-undurchlässigen Schaumstoffstopfen verschlossen wurden. Gefüllt wurden die Gläschen zu etwa einem Viertel mit einem Futterbrei, bestehend aus Wasser, Maisgries, Sojamehl, Bierhefe, Agar-Agar, Malzextrakt, Zuckerrübensirup und Nipagin. Innerhalb des Gläschens sorgte ein Filtersteifen für einen ausgewogenen Feuchtigkeitshaushalt.

Benetzt wurde dieser mit Backhefe, welche die Eiablage der Weibchen förderte (Billeter und Wolfner, 2018), sowie Nipagin zur Vorbeugung von Pilzentwicklung.

2.1.3 Kreuzungen

Über Kreuzungsschemata wurde definiert, aus welcher Linie (Effektor oder Treiber) Jungfrauen, bzw. Männchen bezogen werden. Dabei wurden mindestens zehn Jungfrauen mit wenigstens fünf Männchen vereint. Die Immobilisation und Selektion der Fliegen erfolgte unter Einsatz von CO₂ als Narkotikum (Nicolas, 1989). Frisch geschlüpfte Weibchen verpaaren sich die ersten Stunden nach dem Schlupf nicht. Während diesen Stunden sind Jungfrauen gekennzeichnet durch das Mekonium, ein Abfallprodukt des pupalen Metabolismus, welches als dunkler Punkt im Abdomen der Fliege erkennbar ist. Bezeichnend sind außerdem die eng am Abdomen liegenden, noch nicht aufgepumpten Flügel (Pulver und Berni, 2012). Wurde eine Kreuzung angesetzt, galt es zu verhindern, dass sich die parentale Generation (G0) mit der ersten Filialgeneration (F1) vermischt. Die Generationszeit beträgt bei *Drosophila* etwa zehn Tage. Demnach wurde die Elterngeneration etwa jeden dritten Tag in ein frisches Futterglas überführt.

2.2 Das Lückenüberwindungsparadigma

Für die weiterführenden Studien zur Charakterisierung des Körpergrößengedächtnisses wurde das Lückenüberwindungsparadigma verwendet. Dafür wurden die Versuchstiere aus ihrem Haltungsgefäß abgesammelt und am darauf folgenden Tag für den Verhaltensversuch vorbereitet. Unter Kälteanästhesie¹ (3-4 °C) wurden die zu testenden Fliegen vereinzelt und deren Flügel mit Hilfe einer Iridektomie-Schere² auf etwa ein Drittel ihrer Länge gekürzt. Es wurde darauf geachtet, die Tiere so kurz wie möglich der Kälte auszusetzen, da diese die Physiologie der Tiere negativ beeinflussen kann. Ab dem folgenden Tag waren die Fliegen für den Versuch verwendbar. Sofern nicht anders angegeben, wurden ausschließlich Männchen im Alter von zwei bis sechs Tagen getestet.

¹ Olympus Stereomikroskop SZ61 (WHSZ10x-H/22), MEDO Kompressor 1.6, Temperaturregler

² Kager, Iridektomie-Schere

Für den Verhaltensversuch wurde eine Fliege auf eine Plattform inmitten einer Testarena platziert (Abbildung 6B). Ein Entkommen der Fliege wurde durch die zuvor gestutzten Flügel verhindert, sowie durch einen Wassergraben als Begrenzung der Plattform. Ein strukturloser Schichtschutz schirmte die Fliege vor anderen visuellen Stimuli als dem zentral gelegenen Kletterblock ab. Dieser wurde aufgrund der negativen Geotaxis präferiert erklommen (Gargano et al., 2005), was eine gezielte Beobachtung der Fliege an der Lücke über ein Binokular³ ermöglichte. Der Kletterblock wurde zudem flankiert von zwei Rampen, durch welche die Fliege den Laufsteg des Kletterblocks erreichen konnte. Die Erleuchtung der Arena erfolgte von oben über eine angrenzend stehende Kaltlichtquelle⁴ (Abbildung 6C).

Pro Fliege wurden zehn korrekte Anläufe an die Lücke dokumentiert. Gewertet wurde ein Anlauf zur Lücke, sofern dieser über mindestens die Hälfte der Länge des Laufstegs erfolgte. Mögliche Verhalten an der Lückenkante waren das Umdrehen (dokumentiert mit „U“), das Herunterlaufen („R“), das Fallen („F“), sowie das Überklettern („X“). Wurde vor der jeweiligen Aktion ein „Bein-über-Kopf Verhalten“ ausgeübt, kennzeichnete man die Aktion zusätzlich mit einem „+“. Dieses Bein-über-Kopf Verhalten trat nicht während des normalen Laufens auf; es handelt sich hierbei um einen Kletterversuch. Eine Aktion wurde nicht vermerkt, sofern die Fliege zuvor mehrere Sekunden an der Lückenkante verweilte. Auch wurde der Fliege ein exploratives erstes Herunterlaufen gewährt ohne dies zu dokumentieren.

³ ZEISS West Germany, 464002-9901 W10x/25

⁴ Schott, KL-1500

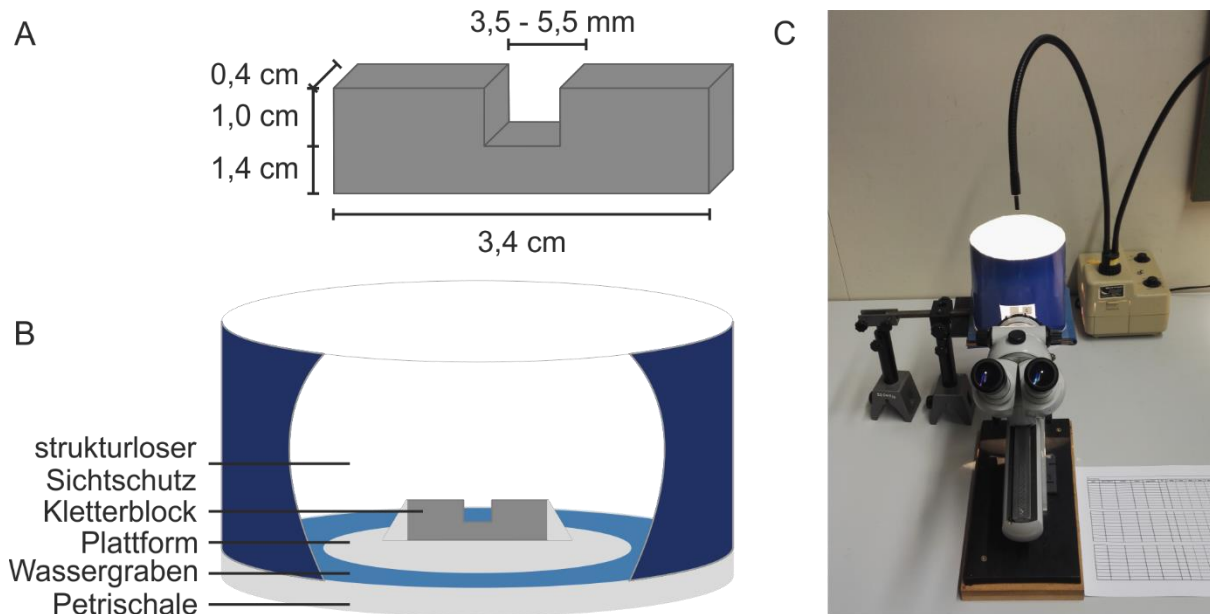


Abbildung 6: **Der Aufbau der Kletterapparatur.** (A) Maße der verwendeten Kletterblöcke (dunkelgrau) (B) Schematischer Aufbau der Testarena mit Beschriftung (C) Foto der Apparatur inkl. Stereolupe, Testarena mit Stativ, Kaltlichtquelle und Dokumentationsblatt.

Abhängig von der Fragestellung wurden den Versuchstieren Lücken unterschiedlicher Größe präsentiert (Abbildung 6A). Mit der Analyse des Kletterverhaltens an einer überwindbaren 3,5 mm breiten Lücke wurde kontrolliert, ob eine Fliege visuell und motorisch befähigt ist, diese zu überklettern. Wurde hingegen geprüft, ob eine Fliege ein Gedächtnis zu ihrer Körpergröße ausbilden konnte, wurde die 5,0 mm breite Lücke eingesetzt. An dieser unüberwindbaren Lücke sehen wildtypische Fliegen davon ab, Kletterversuche auszuüben (Krause, 2015). Eine 5,5 mm breite Lücke wurde bei Tests von temperatur-sensitiven Fliegen genutzt. Deren Körpergröße war überdurchschnittlich groß, da sie ihre Entwicklung verlangsamt auf 17 °C verbrachten (Siomava et al., 2016).

Im Anschluss an den Verhaltensversuch wurde unter Kälteanästhesie je ein Vorderbein der experimentellen Fliegen auf Höhe des Femurs mittels Iridektomie-Schere abgetrennt, sodass Tibia und Tarsus unversehrt blieben und vermessen werden konnten. Dazu fixierte man diese auf einem doppelseitig klebenden Streifen⁵ auf einem Objektträger⁶. Die Vorderbeine wurden über ein Mikroskop⁷ vergrößert

⁵ Tesa Doppelband Metalldose 10m x 15mm

⁶ Roth, Art. Nr. 0656

⁷ Wild Heerbrugg M650 (15x/14)

(40x) und konnten nach Übertragung per Kamera⁸ auf einen Bildschirm⁹ mit einem Messschieber¹⁰ vermessen werden. Dabei entsprachen 117,46 mm gemessener Beinlänge 1 mm der tatsächlichen Größe (Krause, 2015). Die summierte Länge der beiden Segmente repräsentierte die Körpergröße der Männchen. Eine Körpergrößenabhängige Interpretation der Kletterinitiationen zwischen zu vergleichenden Versuchsgruppen wurde durch diese Messung ermöglicht.

2.3 Training naiver Fliegen

Adulte Fliegen wurden als naiv bezeichnet, wenn sie keine Kenntnis ihrer eigenen Körpergröße besaßen. Um dies zu erreichen, mussten wildtypische Fliegen unter Ausschluss von visuellen Reizen aufgezogen werden. Dazu wurden die Zuchtgläschen mit weißem Papier umwickelt und mindestens einen Tag vor Schlupf der Tiere in einen Pappkarton gestellt, welcher mit lichtundurchlässigem Stoff verkleidet war. Eine weitere Schicht desselben synthetischen Stoffs umhüllte den Karton und schützte zusätzlich vor eindringendem Licht. Das Schneiden der Flügel fand unter Rotlicht¹¹ statt, welches die Fliegen nicht mehr detektieren konnten (Hanai et al., 2008). Zudem wurden ausschließlich Fliegen des ersten bis dritten Schlupfs genutzt. Es sollte sichergestellt werden, dass Tiere mit annähernd derselben großen Körpergröße getestet werden. Denn die Körpergröße hängt auch von der Populationsdichte im Zuchtgläschen und der Qualität des Futterbreis ab (Siomava et al., 2016).

Um einen erfahrungsbedingten, visuellen Lern- bzw. Trainingseffekt beurteilen zu können, wurden zunächst naive, flugunfähige Fliegen im Lückenüberwindungsparadigma nach ihrem Körpergrößenwissen befragt (Abbildung 7). Damit das Versuchstier an die neuen Lichtverhältnisse adaptieren konnte, wurden vor Beginn des Tests etwa 20 s verstreichen gelassen. Nach dem Test kamen die Tiere bis zum Training vereinzelt in kleine Papier-ummantelte und Futterbrei-befüllte Röhrchen (Höhe: 6,3 cm, Durchmesser: 2,1 cm). Das visuelle Training belief sich auf 20 min und erfolgte mit max. vier Fliegen pro Trainingsglas (normale Zuchtgläser

⁸ Hitachi hv-c20, Hitachi Power Adaptor/Charger

⁹ Sony HR Trinitron

¹⁰ Mauser digital 2, 0-150/0,01mm

¹¹ Dr. Fischer Dunkelkammerbirne Rot 230V 15W

ohne Brei) und bis zu vier Trainingsgläsern zur gleichen Zeit in einer vertikal gestreiften Arena (24° räumliche Wellenlänge, Durchmesser: 24,5 cm; siehe auch Ergebnisse 3.3.1). Die Trainingsgläser wurden innen mind. zweimal vollständig mit Sigmacote¹² benetzt. Die Silikonlösung bildete nach Verdampfung des Heptans einen dünnen Film auf der Oberfläche des Glases, wodurch die Fliegen am Erklimmen der Glaswand mittels Van-der-Waals Kräften gehindert wurden. Die Möglichkeit an erhöhter Stelle zu verweilen wurde den Fliegen dadurch verwehrt. Durch die lokale Begrenzung auf den Bereich des Bodens, waren die Fliegen in der Position das vertikale Streifenmuster als solches zu detektieren und über Parallaxenerfahrung innerhalb des gestreiften Zylinders ein Körpergrößenwissen auszubilden. Nach dem 20-minütigen Training wurden die Fliegen erneut in die ummantelten Röhrchen vereinzelt und für 24 Stunden unter Ausschluss von Licht verwahrt, bevor sie erneut getestet wurden.

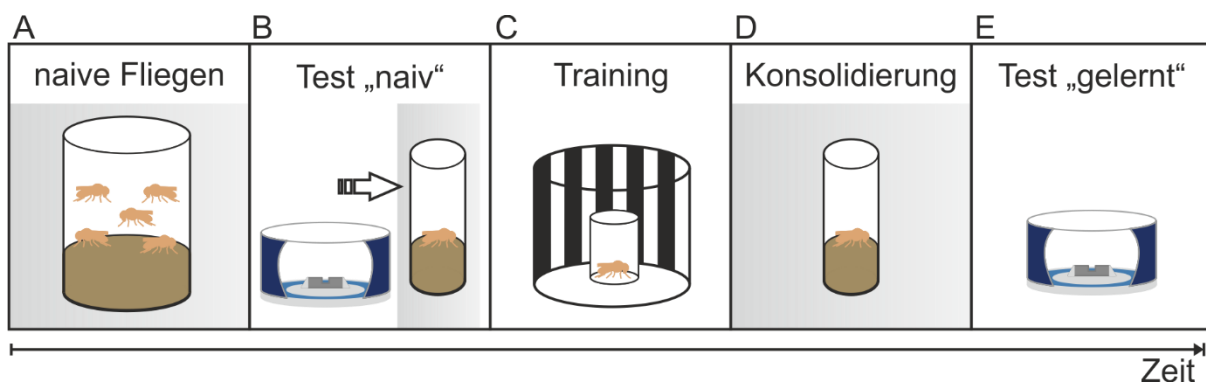


Abbildung 7: **Training naiver Fliegen.** (A) Dunkelgehaltene (grauer Hintergrund) adulte Fliegen wurden zum (B) „naiven“ Test aus einem gemeinschaftlichen Glas einzeln entnommen. Anschließend wurden sie bis zum Training dunkel in einzelnen Röhrchen verwahrt. (C) Das 20-minütige Training in einem optimalen Streifenzyylinder konnte für bis zu 16 Fliegen gleichzeitig erfolgen (4 Fliegen pro Glas, 4 Gläser pro Arena). (D) Die trainierten Fliegen wurden vorsichtig zur Gedächtnisbildung in ihre Röhrchen vereinzelt, dunkel gestellt und (E) nach 24 Stunden auf ihr Körpergrößenwissen geprüft.

2.4 Spatio-temporale Versuchsreihen unter Verwendung von R55G08-*Tub>GAL80^{ts}*

Spatio-temporale Versuchsreihen wurden durchgeführt, um die Funktion eines Gens, bzw. dessen Produktes zu definierten Zeiten zu ermitteln. Dazu werden im Folgenden drei verschiedene Versuchsreihen vorgestellt (siehe Abbildung 8). Ihnen ist gemein, dass die Versuchstiere eine manipulationsfreie, normale Entwicklung durchlebten (Haltung auf 17°C). Die Kälte-bedingte Verlängerung der

¹² Sigma-Aldrich, Sigmacote SL2 Sigma

Entwicklungszeit sorgte dafür, dass die Fliegen besonders groß wurden. Dieser Effekt wurde durch die Verwendung der 5,5 mm Lücke kompensiert.

(A) *Trainings-Kontrolle:* Diese Trainings-Kontrolle wurde parallel zu Protokoll (B) durchgeführt. Sie diente als Positiv-Kontrolle, um herauszufinden, ob Fliegen, welche auf 17°C und in Dunkelheit aufwuchsen (naiv), in der Lage waren ein Körpergrößengedächtnis auszubilden. Dazu unterliefen naive Fliegen nach einem initialen Test (Test Tag 0) ein Trainingsschema entsprechend Kapitel 2.3 (Achtung: die Fliegen wurden einzeln trainiert, um nachfolgend gepaarte Statistik durchführen zu können). Nach 24 Stunden und erneut nach sieben Tagen wurde die Kletterleistung im Lückenüberwindungsparadigma abgefragt. Die Haltung auf 17°C und in Dunkelheit wurde während dieser Zeit weitergeführt.

(B) *Lernen und Konsolidierung der Körpergröße:* Mit diesem Protokoll galt es herauszufinden, ob gezielt das Lernen und die Konsolidierung bei Abwesenheit eines ausgewählten Gens möglich sind. Dazu wurden flugunfähige, naive Fliegen (Dunkelheit, 17°C) zur Induktion des RNAi-Konstruktes für drei Tage einer Temperaturerhöhung von 30°C (Dunkelheit) ausgesetzt. Nachfolgend durchliefen sie wie ihre Kontrolle (A) ein zwanzig-minütiges Training in einem optimalen Streifenzyylinder (Kapitel 2.3, Einzel-Training). Nach 24 Stunden, vier Tagen, bzw. sieben Tagen auf 17°C und Dunkelheit wurde ihre Kletterleistung erneut abgefragt.

(C) *Aufrechterhaltung des Gedächtnisses:* Mit diesem Protokoll sollte analysiert werden, ob Fliegen, die ihre Körpergröße bereits erlernt hatten, ihr Gedächtnis wieder verlieren können. Das Erlernen fand im Gegensatz zu (A) und (B) nicht unter Trainingsbedingungen statt, sondern wurde nach dem Schlupf im Haltungsgefäß unter Hell/Dunkel-Bedingungen vollzogen. Nach einem initialen Test (Test Tag 0) wurde die Temperatur auf 30°C erhöht, sodass das UAS-Konstrukt gezielt aktiviert wurde. Nach 24 Stunden, vier Tagen, sowie sieben Tagen in Dunkelheit und 30°C wurde die Körpergrößeneinschätzung erneut abgefragt. Die Fliegen wurden dazu nach dem initialen Test einzeln gehalten.

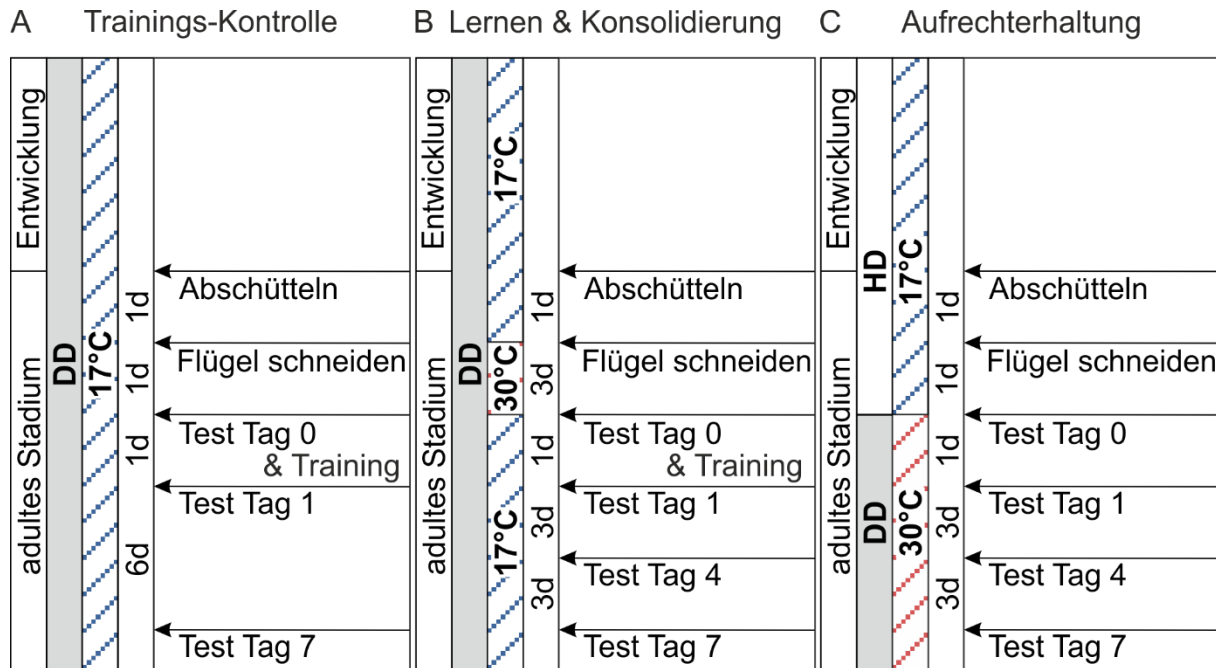


Abbildung 8: **Graphische Darstellung spatio-temporaler Versuchsreihen.**

(A) Trainings-Kontrolle: Die Entwicklung und Haltung fanden ausschließlich auf 17°C und in Dunkelheit (DD) statt. Die naiven Fliegen wurden getestet (Test Tag 0) und optimal trainiert (20 min). Nach 24 Stunden (Test Tag 1) und nach sieben Tagen (Test Tag 7) wurden die erfolglosen Kletterinitiationen an einer 5,5 mm Lücke dokumentiert.

(B) Lernen und Konsolidierung der Körpergröße: Das Trainingsprotokoll entsprach (A) mit Ausnahme einer dreitägigen Induktionsphase (30°C, Dunkelheit) vor dem naiven Test. Zudem wurden die Kletterinitiationen der Versuchstiere an Tag 4 nach dem Training erfasst (5,5 mm Lücke).

(C) Aufrechterhaltung des Gedächtnisses: Die Entwicklung und Haltung der Fliegen fand bis zum initialen Test (Test Tag 0) auf 17°C unter Hell/Dunkelbedingungen (HD) statt. Es schloss sich eine Temperaturerhöhung (30°C, Dunkelheit) über sieben Tage hinweg an mit Tests an Tag eins, vier und sieben (5,5 mm Lücke).

2.5 Pharmakologische Behandlung mit Cycloheximid

Bei Cycloheximid¹³ (CXM) handelt es sich um einen Translationsinhibitor, welcher die Proteinbiosynthese zum Zeitpunkt der Verfütterung unterbindet. Die Substanz wurde in einer Konzentration von 35 mM eingesetzt (Tully et al., 1994). Gelöst wurde CXM in 10% Glukose/ 3% Ethanol. Die Zugabe von Patentblau¹⁴ (eine Spatelspitze auf 10 ml Lösung) färbte die Lösung blau an. Ob eine Fliege die Substanz nach Verfütterung zu sich nahm, ließ sich demnach über eine Blaufärbung des Abdomens nachweisen. Für die Verfütterung wurden kleine, mit Filterpapier ausgelegte Röhrchen verwendet, in welche 200 µl der Cycloheximid-Lösung, bzw. der Kontrolllösung pipettiert wurden. Innerhalb des Röhrchens befanden sich maximal vier Fliegen für etwa zwei Stunden. Behandelt wurden Fliegen, welche das

¹³ PanReacAppliChem, Cycloheximide BioChemia, A0879

¹⁴ Sigma, Patent blue V sodium salt, 21605

Trainingsschema beschrieben in (Abbildung 7) durchliefen. Die Verfütterung schloss sich entweder direkt an das Training an, oder erfolgt 24 Stunden später. Bis zum Test „gelernt“ (Abbildung 7E) verblieben die Fliegen in Dunkelheit.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Durchführung Adult-spezifischer Versuche wurde die Treiberlinie R55G08-*Tub>GAL80^{ts}* über homologe Rekombination erstellt und die Anwesenheit beider Konstrukte über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geprüft (Anhang, Abbildung 25).

Für die Extraktion genomischer (g) DNA wurden von jedem Genotyp zehn Fliegen eingesetzt. Zum Gewebeaufschluss wurden die Fliegen zunächst mit einem Plastikstößel kräftig zerdrückt und direkt mit 500 µl Homogenisierungspuffer gleichmäßig vermischt, ggf. kurz mit dem Vortexmischer gründlich geschüttelt. Daran schloss sich eine 30-minütige Inkubation bei 68°C an, während der eine Denaturierung der Proteine stattfand. Um diese auszufällen, wurden die Proben auf Eis transferiert, mit 65 µl 8 M Kaliumacetat (KAc) vermischt und dort für zehn Minuten inkubiert. Zur Trennung von gDNA und Proteinen wurde daraufhin für zehn Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert¹⁵. Der Überstand, welcher die gelöste gDNA enthielt, wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und weitere zehn Minuten zentrifugiert. Nach erneuter Überführung des Überstands wurden 900 µl 100% Ethanol zur Probe gegeben, über Invertieren gemischt (7x) und das Reaktionsgefäß für zehn Minuten zum Fällen der DNA auf Eis gestellt. Die gefällte gDNA befand sich nach Zentrifugation über zehn Minuten als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes wieder. Das überstehende Ethanol wurde abgenommen, mit 750 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min). Um zu gewährleisten, dass dabei alle Salze des Homogenisierungspuffers und des Kaliumacetats in die wässrige Phase übergangen, wurde dieser Schritt wiederholt. Das Ethanol wurde im Anschluss vom Pellet abgezogen und dieses bei Raumtemperatur getrocknet. Das Abdampfen des Ethanols konnte durch Erwärmung der Probe beschleunigt werden. Zuletzt wurde das Pellet in 120 µl in 0,1x TE (Tris EDTA) gelöst. Bei zehn eingesetzten Fliegen und

¹⁵ Eppendorf, Centrifuge 5418, 5418000017

einem Erwartungswert von etwa 300 ng DNA pro Fliege, lag die DNA zum Ende mit einer Konzentration von 25 ng/µl vor.

Für die PCR wurden für die extrahierte gDNA jedes Genotyps Duplikate angesetzt. Vorgelegt wurden dazu in 0,2 ml Eppendorfreaktionsgefäßen je 3 µl der DNA. Darauf pipettiert wurde ein Mastermix bestehend aus je 3 µl 5'- und 3'-Primern (5 µM), 5 µl 10x PCR Puffer Y¹⁶, 2 µl Desoxynukleosidtriphosphaten¹⁷ (dNTPs), 34 µl bidestilliertem Wasser (ddH₂O) und 0,5 µl der Taq-Polymerase¹⁸ (5U/µl). Die PCR fand in einem Thermocycler¹⁹ unter Bedingungen statt (Tabelle 2), die optimal auf die Anforderungen der Primer (Tabelle 3) und der Polymerase abgestimmt wurden. Nach Beendigung der PCR wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 10x Stopp-/Ladepuffer (50 µl 2,5 % Bromphenolblau, 600 µl Glycerin, 200 µl 20 % SDS, 1150 µl ddH₂O) pro Reaktionsgefäß angehalten. Die Proben konnten bei 4°C gelagert werden oder direkt für die Gelelektrophorese²⁰ in die Taschen eines 1,5-prozentigen Agarosegels pipettiert werden. Durch Anlegung einer Spannung wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend schnell durch das Gel zum Pluspol. Von jeder Probe wurden 20 µl aufgetragen; als Molekularmassenstandard dienen 10 µl einer Markerlösung (50 µl DNA-Leiter²¹; 450 µl TE; 100 µl 6x Stopppuffer²²); als Puffer wurde TBE (Tris Borat EDTA) verwendet. Die Banden wurden im Anschluss in einem Ethidiumbromid²³-Bad für 45 min angefärbt und 15 min mit ddH₂O entfärbt. Die Detektion erfolgte nach Anregung mit UV-Licht über eine Kamera²⁴, wurde mit der Geldokumentationssoftware²⁵ festgehalten und letztendlich ausgedruckt²⁶.

Zum Nachweis von GAL4 und GAL80 wurde die Herstellung der Primer GAL4 *forward* (for)1, GAL4 *reverse* (rev)1, GAL80 for1 und GAL80 rev1 (Tabelle 3) bei der

¹⁶ Peqlab

¹⁷ Peqlab, dNTP-Mix (10 mM each)

¹⁸ Peqlab, Taq-DNA-Polymerase, 01-1020

¹⁹ Peqlab, peqSTAR 96 Universal Gradient, 732-2887DE

²⁰ Peqlab, PerfectBlue Mini S, 40-0708 & Mini L, 40-1214

²¹ Invitrogen, 1 kb DNA Leiter

²² Roth, T847.1

²³ Invitrogen, UltraPure Ethidium Bromide, 10 mg/ml, 15585011

²⁴ Intas, CCD Kamera

²⁵ Intas, GDS

²⁶ Mitsubishi Electric, Digital Monochrome Printer P95DE/DW

Firma Sigma in Auftrag gegeben. Die Primerpaare wurden dann für die PCR eingesetzt.

Tabelle 2: **PCR-Programm „16“** (selbst programmiert) mit Angabe der aufeinanderfolgenden PCR-Teilschritte, der Anzahl an Wiederholungen, sowie der Temperatur- und Zeitsequenzen

Programm 16	Zyklen	Temperatur- und Zeitsequenzen
Initiale Denaturierung	1x	10 min 95°C
Denaturierung, Primerhybridisierung, Elongation	39x	(30 s 95°C, 30 s 60°C, 1 min 72°C)
Denaturierung, Primerhybridisierung, Elongation/Amplifizierung	1x	(30 s 95°C, 30 s 60°C, 2 min 72°C)
Aufbewahrung		∞ 8°C

Tabelle 3: **Primersequenzen für GAL4 und GAL80** (*forward* [for] und *reverse* [rev]) mit einzusetzender Konzentration und Schmelztemperatur T_m .

Primer	Sequenz (5' – 3')	Konzentration	T_m
GAL4 for1	ACGCCGAATTTGGTGGTCTG	5 μ M	69,3°C
GAL4 rev1	GTGCGGTCTCGTTATTCTCAGC	5 μ M	67,0°C
GAL80 for1	ATGCCACTGCTTTTCCCACTTTAG	5 μ M	67,9°C
GAL80 rev1	TACACCGTTCCCGATTTTCATAGATG	5 μ M	68,3°C

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Methodik

Mit Hilfe der Immunhistochemie lassen sich Proteine von Interesse (im Folgenden Antigene genannt) innerhalb des Fliegengehirns visualisieren. Dabei wird die Spezifität des Antigens definiert über die Tertiärstruktur seines Epitops. Über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen bindet dieses an das Paratop des primären Antikörpers. Dieser kann polyklonal sein, sofern er verschiedene Epitope erkennt oder monoklonal bei Erkennung eines einzigen Epitotyps. Der primäre Antikörper besitzt darüber hinaus einen Fc (*Fragment crystallizable*) - Abschnitt, der ihm erlaubt einen sekundären Antikörper zu binden (indirekte Methode der Antikörperfärbung). Dieser ist gegen das Wirtstier des primären Antikörpers gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mehrere sekundäre Antikörper sind in der Lage den Fc-Abschnitt zu binden, wodurch das Signal des Reporters potenziert wird (Ramos-Vara, 2005).

Im Folgenden werden drei Protokolle vorgestellt, die zur indirekten Färbung ganzer *Drosophila*-Gehirne genutzt wurden. Sie unterscheiden sich in der

verwendeten Präparierlösung, der Dauer der Fixierung, der Konzentration des Fixativs, als auch der des Detergenz, sowie des eingesetzten Serums. Die Komposition der Präparierlösung imitierte das Ionen-Milieu innerhalb des Fliegengehirns. Eine Kühlung der Lösung beugte den Abbau von Proteinen vor. Zelluläre Strukturen blieben durch den Einsatz des Fixativs (Paraformaldehyd) erhalten. Dabei wurden die Proteine quervernetzt, ohne dass ihre Antigenität durch gravierende Konformationsänderung der Tertiärstruktur verloren ging. Dies wurde bestimmt durch die Dauer und die Konzentration der Fixierung. Der Eintritt des Antikörpers durch die quervernetzten Strukturen wurde durch das nichtionische Detergenz Triton X-100 ermöglicht, welches in Phospholipid-Doppelschichten und integrale Membranpeptide interkaliert und diese damit aufweicht (Javois, 1994).

2.7.2 Antikörper

Tabelle 4 umfasst alle verwendeten primären und sekundären Antikörper dieser Arbeit.

Tabelle 4: **Liste primärer und sekundärer Antikörper.** Zudem sind Wirtstier, Firma und Katalognummer angegeben, sowie das verwendete Protokoll und die eingesetzte Konzentration.

Antikörper	Tier	Firma, Katalognummer	Protokoll	Verdünnung
Primäre Antikörper				
α -CD4	Kaninchen	Sigma-Aldrich, HPA004252	siehe 2.7.5	1:100
α -DN-Ex #8 (α -N Cadherin)	Ratte	DSHB, AB_528121	siehe 2.7.4	1:200
α -GFP (GFP-20)	Maus	Sigma-Aldrich, G6539	siehe 2.7.5	1:200
α -GFP	Hühnchen	Aves Labs, GFP-1020	siehe 2.7.3 und 2.7.4*	1:1000
α -mCherry	Ziege	SICGEN, AB0040-200	siehe 2.7.3 und 2.7.4*	1:200
α -RFP	Maus	Rockland, 200-301-379	siehe 2.7.4	1:1000
Sekundäre Antikörper				
α -chicken A488	Esel	Sigma-Aldrich, SAB4600031	siehe 2.7.4 und 2.7.3	1:1000
α -goat Cy3	Esel	Dianova, 705-165-147	siehe 2.7.3 und 2.7.4	1:1000
α -mouse A488	Ziege	Sigma-Aldrich, 62197	siehe 2.7.5	1:250
α -mouse Cy3	Ziege	Dianova, 115-165-003	siehe 2.7.4	1:1000
α -rabbit Cy3	Ziege	Dianova, 111-165-003	siehe 2.7.5	1:1000
α -rat Cy5	Esel	Dianova, 712-175-150	siehe 2.7.4	1:1000

*statt Ziegenserum wurde Pferdeserum verwendet

2.7.3 Standard-Protokoll AG Strauß

Die Fliegen wurden mit Eis betäubt und standen anschließend gekühlt auf diesem zur Präparation bereit. Jede Fliege wurde kurz in 70% Ethanol (EtOH) von Schmutz befreit, von EtOH in eiskalter 1x Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gereinigt und in einem frischen Präpariergefäß in 1x PBS sezirt. Dabei wurde mithilfe eines Binokulars²⁷ und zweier Pinzetten²⁸ der Kopf vom Abdomen getrennt und darauf folgend das Gehirn von der umgebenden Cuticula gelöst. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst alle Tracheen entfernt und die optischen Loben erhalten blieben. Bis zur Fixierung wurden die Gehirne auf Eis in 1x PBS gesammelt.

²⁷ Olympus, Stereomikroskop SZ51

²⁸ DUMONT, Pinzette Nr. 5, Inox-Edelstahl

Alle weiteren Schritte, ausgenommen der primären und sekundären Antikörperinkubation, fanden bei Raumtemperatur (RT) statt. Sofern sich die Gehirne in Lösungen befanden, welche Triton X-100 als Detergenz enthielten, wurde auf dem Schüttler²⁹ inkubiert. Die Fixierung erfolgte für 30 min in einer frischen 4%igen PFA/PBS-Lösung und für weitere 30 min in 4% PFA/PBS + 0,2% Triton X-100 (PBTx0,2%). Es schlossen sich mehrere Waschschriffe mit PBTx0,5% an; zunächst 4x fünf min, gefolgt von 3x zehn min. Fortgefahren wurde mit einer 30-minütigen Permeabilisierung mit PBTx1,0%, sowie zwei fünf-minütigen Waschschriffen. Geblockt wurde für 60 min mit einer 5%igen Pferdeserum³⁰/PBTx0,5%-Lösung. Die primären Antikörper wurden entsprechend ihrer Konzentration zu einer frischen 5%igen Pferdeserum/PBTx0,5%-Lösung gegeben. Die Inkubation erfolgte für 48 Stunden bei 4°C. Der primäre Antikörper wurde mit PBTx0,5% 2x fünf min, sowie 6x 20 min gewaschen. Nachfolgend wurde für 30 min mit 5% Pferdeserum/PBTx0,5% blockiert. Die Blockierungslösung wurde in drei fünf-minütigen Waschschriffen mit PBTx0,5% entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, gelöst in PBTx0,5%, erfolgte für 48 Stunden bei 4°C. Der sekundäre Antikörper wurde mit PBTx0,5% 2x fünf min, sowie 6x 20 min gewaschen, anschließend folgten zwei fünf-minütige Waschschriffe mit PBS. In einer 50%igen Glycerin/PBS-Lösung sollten die Gehirne über Nacht bei 4°C absinken, um am folgenden Tag eingedeckelt zu werden. Dabei wurde jedes Gehirn auf einen separaten, zuvor vorbereiteten Objektträger³¹ mit der anterioren Seite nach unten positioniert und mit Vectashield³² benetzt, welches eine Photobleichung der Fluoreszenzfarbstoffe verhindern sollte. Versiegelt wurde das Präparat mit einem Deckgläschen³³ und klarem Nagellack.

2.7.4 Protokoll nach Wilson und Laurent, 2005:

Die Fixierung in diesem Protokoll wurde mit 5% PFA/PBS durchgeführt und belief sich auf 15 min. Gewaschen wurden die zuvor fixierten Gehirne 3x mit PBS.

²⁹ Edmund Bühler, Kombischüttler Typ KL 2

³⁰ VECTOR Laboratories, Normal Horse Serum Blocking Solution, S-2000

³¹ Marienfeld Superior, Objektträger (76 x 26 x 1 mm, geschnitten, ohne Mattrand) und GRACE BIO-LABS SecureSeal™ Imaging Spacers (SS8X9, 8-9mm Diameter ID X 0.12mm Depth)

³² VECTOR Laboratories, VECTASHIELD Antifade Mounting Medium

³³ Marienfeld Superior, Precision cover glasses thickness No. 1.5H (18 x 18 mm)

Für die Blockierung (20 min), sowie die primäre Antikörperinkubation (48 Stunden, 4°C) wurde 5% Ziegen Serum³⁴/PBTx0,2% verwendet. Die primären Antikörper wurden mit PBTx0,2% gewaschen (2x 5 min, 3x 20 min), ein Blockierungsschritt vor der sekundären Antikörperinkubation entfiel. Die sekundären Antikörper wurden in PBTx0,2% aufgenommen und verblieben auf den Gehirnen für weitere 48 Stunden bei 4°C. Gewaschen wurden die Gehirne nach der Inkubation mit PBTx0,2% (3x 10 min) und 1x kurz mit PBS (Wilson und Laurent, 2005).

2.7.5 Protokoll nach Pech et al., 2013: GRASP

Visualisierung des rekonstituierten GFPs (unfixiert): Die Präparation eines jeden Gehirns erfolgte wie zuvor beschrieben. Nachfolgend wurde dieses in 1x PBS eingedeckelt und unmittelbar danach gescannt.

Visualisierung des rekonstituierten GFPs (fixiert): Zur Präparation wurde eiskalte Ringerlösung verwendet. Für die nachfolgende Fixierung (2 Stunden) wurde 4% PFA/PBS genutzt. Es schlossen sich drei 20-minütige Waschschriffe mit PBTx0,5% an, welchen ein Präinkubationsschritt mit 0,1% *Bovine Serum Albumin* (BSA)/5% Ziegen Serum/PBTx0,5% bei 4°C folgte (2 Stunden). Die primäre Antikörperinkubation fand in beschriebener Blockierungslösung über Nacht bei 4°C statt. Der darauf folgenden Tag wurde mit drei Waschschriffen à 20 min begonnen. Die sekundären Antikörper wurden ebenfalls in Blockierungslösung gelöst und verblieben auf den Gehirnen für weitere 24 Stunden bei 4°C. Gewaschen wurde erneut mit PBTx0,5% (3x 20 min), sowie 1x mit 1x PBS über Nacht (Pech et al., 2013). Anschließend konnte wie beschrieben eingedeckelt werden.

2.7.6 Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung

Mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop³⁵ konnte die Fluoreszenz der präparierten Gehirne erfasst werden. Das Mikroskop besaß einen Argon- (20% Ausgangsleistung) und einen *Diode Pumped Solid State* (DPSS)-Laser, drei Detektoren (*Photomultiplier* [PMT] 1, PMT 2, Hybriddetektor [HyD]), sowie vier

³⁴ VECTOR Laboratories, Normal Goat Serum Blocking Solution, S-1000

³⁵ Leica, TCS SP8

Objektive (10x, 20x, 40x, 63x). Sofern nicht anders angegeben, erfolgte mit der Software LAS X die Aufnahme unter Standardeinstellungen (Bildformat: 1024 x 1024, Frequenz: 600 Hz, Scan-Wiederholungen jeder Schicht: 2-3). Die Schichtdicke eines Bildes variierte einstellbar zwischen 0,3 und 0,75 μm . Die Schichtdicke der gestapelten Bilder ist der Beschriftung jeder Abbildung zu entnehmen. Die Bildbearbeitung wurde mit der Software „ImageJ 1.52e“ und „CorelDRAW 2018“ vorgenommen.

2.8 Chemikalien/ Lösungen

Tabelle 5 bildet die Zusammensetzung der für die PCR und bei der Immunhistochemie (IHC) genutzten Lösungen ab. Die Ausgangskemikalien dazu, sowie alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem und Roth bezogen.

Tabelle 5: **Verwendete Lösungen und Chemikalien der PCR und IHC**

Lösungen	Chemikalien
Homogenisierungspuffer	100 mM NaCl
	100 mM Tris, pH 8,0
	50 mM EDTA, pH 8,0
	0,5 % SDS
Ringerlösung, pH 7,3	5 mM HEPES
	130 mM NaCl
	5 mM KCl
	2 mM MgCl_2
	2 mM CaCl_2
TBE, 10x, pH = 8, V = 2 l	50 mM Tris
	50 mM Borsäure
	2,5 mM EDTA
TE	10 mM Tris, pH 8,0
	1 mM EDTA, pH 8,0

2.9 Statistik und Graphikbearbeitung

Die statistische Analyse wurde mit der frei verfügbaren Software „R, Version 3.5.0“ durchgeführt. Sie diente der Entscheidung zwischen zwei konkurrierenden Hypothesen. Das Signifikanzniveau (α) wurde auf 5% festgelegt. Demnach wurde bei einer Wahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ die Nullhypothese abgelehnt und die

Alternativhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% gewählt. Fiel $p > 0,05$ aus, wurde die Nullhypothese nicht abgelehnt.

Als Testverfahren auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test genutzt. Folgt die Daten einer Normalverteilung wurde ein parametrischer Test zur weiteren Analyse angewandt. Mithilfe des t-Tests wurden alle möglichen Kombinationspaare miteinander verglichen. Die Korrektur des Signifikanzniveaus erfolgte nach Bonferroni-Holm. Lagen die Stichproben nicht normalverteilt vor, wurde ein nicht-parametrischer Test angewandt. Die paarweisen Einzelvergleiche berechnete die Software mit dem Wilcoxon-Rangsummentest. Korrigiert wurde auch hier mit der Bonferroni-Holm-Korrektur. Wurde ein Versuchstier mehr als einmal zu unterschiedlichen Bedingungen getestet, wurden abhängig von der Stichprobenverteilung gepaarte Testverfahren genutzt.

Abhängig vom ermittelten p-Wert wurde wie folgt unterschieden: Bei $0,05 > p \geq 0,01$ verhielten sich die Datensätze signifikant verschieden voneinander (*), bei $0,01 > p \geq 0,001$ hoch signifikant verschieden (**), bei $0,001 > p$ höchst signifikant verschieden (***). Ist $p \geq 0,05$ unterschieden sich die Datensätze statistisch nicht voneinander (n.s.).

Die Datensätze wurden als Boxplots dargestellt. Die Länge der Box definiert den Interquartilsabstand (IQA), dessen oberes Ende das 75 %-Quartil und dessen untere Grenze das 25 %-Quartil beschreibt. Als dicker Querstrich dazwischen wird der Median gekennzeichnet. Ausgehend von der oberen und der unteren Kante der Box spannen sich die Fehlerbalken. Datenpunkte, die mehr als 1,5x IQA von den Grenzen der Box entfernt liegen, befinden sich außerhalb der Fehlerbalken und werden als Ausreißer bezeichnet. Die Boxplots wurden mit der Statistik-Software erstellt und nachträglich mit „CoreIDRAW X7“ bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 $\Delta 7$ -Neurone

Krause konnte in seiner Dissertation zeigen, dass ein intaktes Körpergrößengedächtnis abhängig ist von der Aktivität der *rutabaga* Adenylylzyklase (AC) und des Transkriptionsfaktors dCREB2 in den latero-lateralen Neuronen der Protozerebralbrücke. Experimentell erarbeitete sich Krause diese Datenlage unter Verwendung des Treibers 210Y-GAL4 (Krause, 2015). 210Y-GAL4 ist eine *Enhancer-Trap*-Linie mit einer spezifischen Expression in den latero-lateralen PB-Neuronen. Darüber hinaus sind jedoch weitere Neuropile im Expressionsmuster enthalten, u. a. der Fächerförmige Körper, die Noduli und der Kanal des Ellipsoidkörpers (Poeck et al., 2008). Ein spezifischeres Expressionsmuster für die LPB-Neurone weist die Treiberlinie R55G08-GAL4 aus der *Janelia FlyLight*-Kollektion auf (Jenett et al., 2012). Krause konnte durch die Nutzung dieses alternativen Treibers die Rettung von *rutabaga* (AC) wiederholen und die Funktion der Adenylylzyklase in den LPB-Neuronen bekräftigen (Krause, 2015). Durch die der AC nachgeschalteten Aktivität von dCREB2 werden in diesen Neuronen durch gezielte Genexpression synaptische Veränderungen vorgenommen, welche langanhaltend, vermutlich lebenslang Bestand haben müssen. Für die Untersuchung dieser Gedächtnisaufrechterhaltung soll zukünftig der Treiber R55G08-GAL4 genutzt werden.

R55G08-GAL4 besteht aus PB-spezifischen Interneuronen mit einem stereotypischen Projektionsmuster. Die Interneurone erhalten dendritischen Eingang über die komplette Protozerebralbrücke hinweg (PB18.s, s: *spines*, postsynaptische Eingänge). Die PB umfasst wie in 1.4 geschildert insgesamt 18 vertikale Einheiten, die Glomeruli (neun per Hemisphäre). Der Glomerulus G_9 befindet sich dabei am weitesten lateral, wohingegen G_1 medial zu finden ist. Die Glomeruli in denen der synaptische Ausgang erfolgt, sind exakt durch weitere sieben Glomeruli voneinander getrennt ($G_x\Delta 7G_y.b$, b: *boutons*, präsynaptische Ausgänge). Der Nomenklatur Wolffs und Kollegen zufolge, handelt es sich bei den R55G08-GAL4-Neuronen um den Zelltyp PB18.s- $G_x\Delta 7G_y.b$. Darüber hinaus ist der Zelltyp PB18.s-9i1i8c.b (i: ipsilateral, c: kontralateral) bekannt. Der dendritische Eingang erfolgt ebenfalls entlang aller Glomeruli. Auch muss für den synaptischen Ausgang ein Abstand von

genau sieben Glomeruli eingehalten werden. Der letztgenannte Zelltyp unterscheidet sich vom ersten dahingehend, dass insgesamt zwei $\Delta 7$ -Intervalle auftreten, da der synaptische Ausgang am äußersten Glomeruli beginnt. Es wird diskutiert, ob es sich bei PB18.s-Gx $\Delta 7$ Gy.b und PB18.s-9i1i8c.b um denselben Zelltyp handelt (Wolff et al., 2015). Nachfolgend sollen die R55G08-GAL4-Neuronen, bzw. die LPB-Neurone auch als „ $\Delta 7$ -Neurone“ bezeichnet werden (Wolff et al., 2015; Franconville et al., 2018).

Zu Beginn erfolgte die Validierung des Treibers R55G08-GAL4. Dazu sollte das Expressionsmuster der $\Delta 7$ -Neurone immunhistologisch visualisiert und die Notwendigkeit einer aktiven cAMP-Signalkaskade über Verhaltensversuche bestätigt werden. Für die Darstellung des Expressionsmusters wurden die präsynaptischen Ausgänge markiert durch Expression des Fusionsproteins Synaptotagmin::eGFP (SYT::eGFP, Abbildung 9A), die postsynaptischen Eingänge mithilfe des dendritischen Markers DenMark (Nicolai et al., 2010) (magenta, Abbildung 9A'). Die Antikörperfärbung zeigt präsynaptische Ausgänge und postsynaptische Eingänge in allen Glomeruli der Protozerebralbrücke inkl. der Zellkörper. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Untersuchungen nach Wolff (Wolff et al., 2015). Das Schlüsselexperiment zum Nachweis der Notwendigkeit einer aktiven cAMP-Kaskade im Körpergrößengedächtnis stellt die Rettung der Adenylylzyklase in den lateralen Neuronen dar. Das Verhalten wurde an einer nicht-überwindbaren 5,0 mm Lücke abgefragt. Die erfolglosen Kletterversuche repräsentieren den Anteil an ausgeführten Bein-über-Kopf-Suchschlägen. Die heterozygote GAL4-Kontrolle zeigt mit 10% erfolglosen Kletterversuchen ein wildtypisches Verhalten (Abbildung 9B). Im Gegensatz dazu zeigen Tiere, deren Adenylylzyklase aufgrund einer Punktmutation funktionslos vorliegt (kodiert durch *rutabaga*¹) (Levin et al., 1992) ein übermäßiges Kletterverhalten (55%). Wird durch Expression der cDNA (Zars et al., 2000) die Funktion der AC in den $\Delta 7$ -Neuronen wiederhergestellt, kann der Phänotyp partiell gerettet werden (30%). Wird darüber hinaus in den $\Delta 7$ -Neuronen der Endpunkt der cAMP-Signalkaskade durch Expression der dominant negativen dCREB2-Isoform dCREB2-b (Yu et al., 2006) inhibiert, äußert sich dies in einem statistisch signifikanten Anstieg an initiierten Suchschlägen (30%) verglichen mit den Kontrollen (0, bzw. 5% erfolglose Kletterversuche, Abbildung 9C). Die Ergebnisse stützen somit

die Versuche von Krause und beweisen, dass die Bildung des Körpergrößengedächtnisses abhängig ist von der Aktivität der Adenylylzyklase und des Transkriptionsfaktors dCREB2 in den $\Delta 7$ -Neuronen.

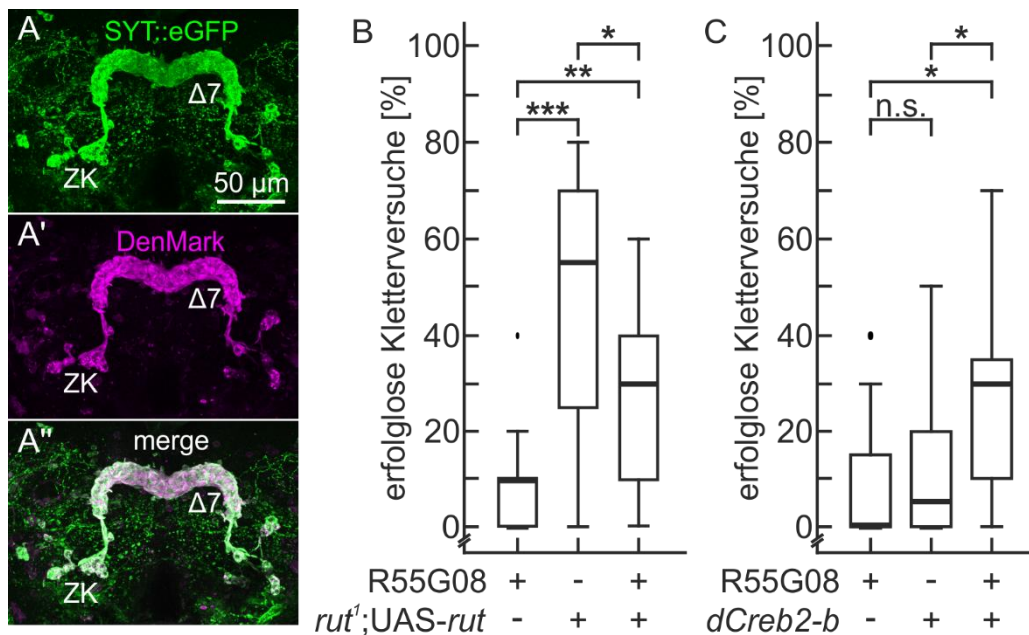


Abbildung 9: Charakterisierung der $\Delta 7$ -Neurone der Protozerebralbrücke.

(A-A'') Färbung des Expressionsmusters der $\Delta 7$ -Neurone (*R55G08>DenSy1*). (A) Synaptotagmin-GFP (SYT::eGFP) markiert die Präsynapsen in grün, (A') postsynaptisch wird der Marker DenMark-mCherry (magenta) getrieben. (A'') zeigt die Überlappung beider Expressionsmuster. ZK = Zellkörper. Optische Schichtdicke: 51 μm . Zur Färbung verwendet wurde das Protokoll aus Kapitel 2.7.3; α -GFP (Aves Labs), α -mCherry (SICGEN), siehe Tabelle 4.

(B) Der Anteil an ausgeführten Suchschlägen pro zehn Anläufen wird als erfolgreiche Kletterversuche in Prozent angegeben. Durch Rückgabe der cDNA (*UAS-rut*) in den $\Delta 7$ -Neuronen der PB (*R55G08-GAL4*) kann der *rut¹*-Phänotyp (55%) partiell gerettet werden (30%). Die Statistik kann dem Anhang, Tabelle 9 entnommen werden.

(C) Die Expression der dominant negativen Isoform dCREB2-b in den $\Delta 7$ -Neuronen der PB führt dazu, dass die Fliegen unzureichend lernen (30% erfolgreiche Kletterversuche). Tabelle 10 des Anhangs gibt Auskunft über die statistische Auswertung.

Nutzung einer nicht-überwindbaren 5,0 mm Lücke. *Drosophila* Männchen. N = 20 pro Genotyp. Nicht-parametrische Mediendarstellung der Daten. Die Box reicht vom 25%- bis zum 75%-Quartil (Interquartilsabstand [IQA]). Als hervorgehobener Balken innerhalb der Box ist der Median zu finden. Die Fehlerbalken umfassen die Datenpunkte, die maximal das 1,5-fache des IQAs von den Grenzen der Box entfernt liegen. Über diese Grenze hinweg werden Datenpunkte als Ausreißer gewertet. n.s.: nicht signifikant; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Zu (A-A'') und (C) siehe auch (Krause et al., 2019).

3.2 Die Konnektivität der $\Delta 7$ -Neurone

3.2.1 Visualisierung postsynaptischer Partner der $\Delta 7$ -Neurone

Krause zeigt in seiner Dissertation, dass neben den $\Delta 7$ -Neuronen die PFN-Neurone für die Gedächtnisbildung der Körpergröße benötigt werden. Er entwirft ein Modell, nachdem die kolumnären PFN-Neurone erregenden Eingang von den $\Delta 7$ -Neuronen erhalten (Krause, 2015). Um herauszufinden, ob PFN-Neurone im

postsynaptischen Muster der $\Delta 7$ -Neurone liegen, wurde die transTango-Methode angewandt (Talay et al., 2017).

Generell dient die Methode der Visualisierung der postsynaptischen Zellen zu einem ausgewählten präsynaptischen Treiber (GAL4) von Interesse. Voraussetzung dafür ist die Interaktion zwischen einem synthetischen Liganden (Expression in den präsynaptischen $\Delta 7$ -Neuronen) und einem panneuronal exprimierten synthetischen Rezeptor. Bei Ligandenbindung wird postsynaptisch die Abspaltung des an den synthetischen Rezeptor gekoppelten Transkriptionsfaktors QF vorgenommen, durch Rekrutierung einer panneuronal exprimierten Protease des *tobacco etch virus*. QF kann nachfolgend die Expression des mCherry-Reporters in den postsynaptischen Zellen der $\Delta 7$ -Neuronen initiieren; Neuropil und Zellkörper werden dadurch rot markiert (Talay et al., 2017). Die $\Delta 7$ -Neurone selbst leuchten durch Expression von GFP grün, deren Zellkörper sind lateral der PB angeordnet (Abbildung 10A).

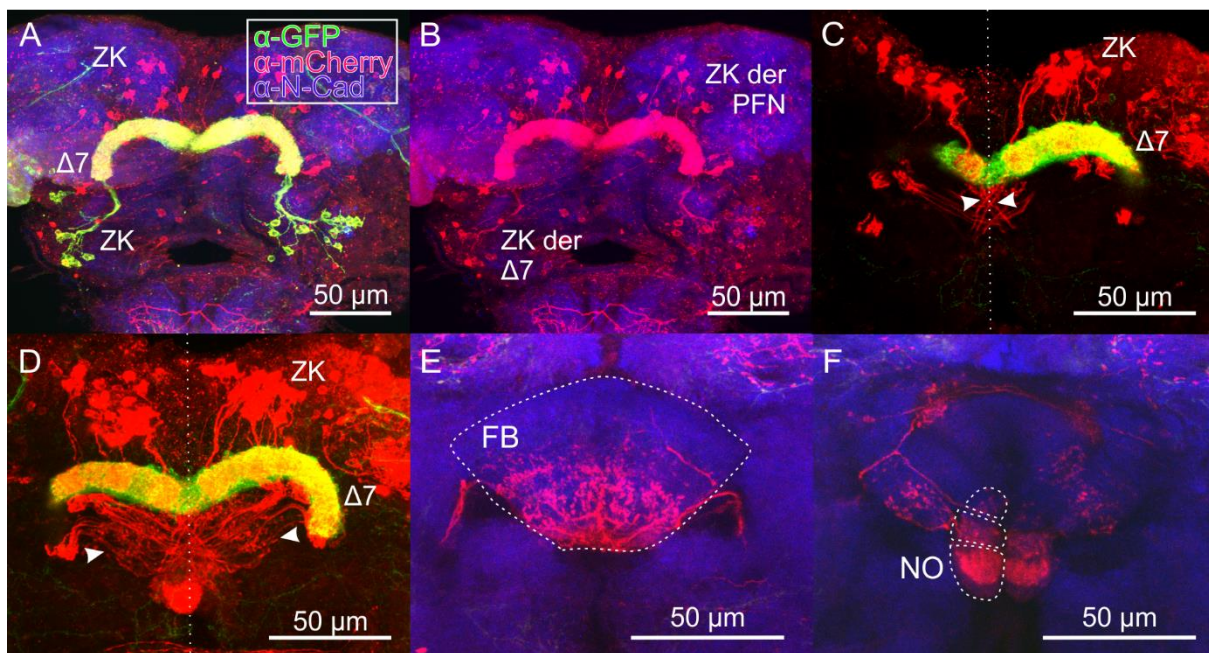


Abbildung 10: **Visualisierung des postsynaptischen PFN-Musters der $\Delta 7$ -Neurone.** Adulte Gehirne des Genotyps R55G08>myrGFP, mtdTomato; transTango wurden immunhistochemisch gegen GFP ($\Delta 7$ -Neurone, grün) und mCherry (postsynaptische Neurone zu $\Delta 7$ -Neurone, rot) gefärbt. Zur anatomischen Einordnung des Expressionsmusters wurden alle Neuropile gegengefärbt mit N-Cadherin (N-Cad, blau) (Iwai et al., 1997). ZK: Zellkörper, FB: Fächerförmiger Körper, NO: Noduli. Anwendung des Protokolls aus Kapitel 2.7.4; α -GFP (Aves Labs), α -mCherry (SICGEN), α -N-Cad (DSHB), siehe Tabelle 4.

(A) Darstellung präsynaptischer $\Delta 7$ -Neurone (grün) und deren postsynaptischer Neurone (rot). Überlappendes Expressionsprofil innerhalb der Protozerebralbrücke und in den Zellkörpern der $\Delta 7$ -Neurone (lateral). Optische Schichtdicke: 39 μ m.

(B) Darstellung der postsynaptischen Neurone inkl. Zellkörpern der PFN- und der $\Delta 7$ -Neurone. Optische Schichtdicke: 39 μ m.

(C) Darstellung der Projektionen medial gelegener PFN-Neurone. Ausgehend von der Protozerebralbrücke

überqueren die Projektionen die Mittellinie des Gehirns vor Eintritt in den Fächerförmigen Körper (Pfeile). Optische Schichtdicke: 9 μm .

(D) Darstellung der Projektionen lateral gelegener PFN-Neurone. Ausgehend von der Protozerebralbrücke verbleiben die Projektionen ipsilateral bei Eintritt in den Fächerförmigen Körper. Optische Schichtdicke: 33,75 μm .

(E) Visualisierung der Verzweigungen der postsynaptischen Zellen innerhalb des Fächerförmigen Körpers. Optische Schichtdicke: 14,25 μm .

(F) Visualisierung der Verzweigungen der postsynaptischen Zellen innerhalb der Noduli. Optische Schichtdicke: 10,5 μm .

Bei Überlagerung des präsynaptischen grünen und postsynaptischen roten Zellmusters (gelbes Signal) ist ersichtlich, dass das postsynaptische Muster auch laterale Neurone enthält (Abbildung 10A, vgl. auch Abbildung 10B). Bei Durchsicht der gescannten Präparate konnte festgestellt werden, dass das Zellkern-Muster der $\Delta 7$ -Neurone komplett im Muster der postsynaptischen Zellen enthalten ist; mal ist dies besser, mal schlechter erkennbar. Die Beobachtung lässt sich erklären durch die Funktion der $\Delta 7$ -Neurone. Als Interneurone garantieren sie die Informationsweitergabe innerhalb eines Neuropils. Übermittelt ein präsynaptisches $\Delta 7$ -Neuron eine Information an ein anderes $\Delta 7$ -Neuron, agiert das letztgenannte als Postsynapse und wird über transTango durch mCherry-Expression rot markiert. Darüber hinaus wird mCherry in Zellen exprimiert, deren Zellkörper dorsal liegen und in die Protozerebralbrücke, den Fächerförmigen Körper und die Noduli projizieren (Abbildung 10B, E, F). Medial gelegene Projektionen vom PB zum FK überkreuzen vor Eintritt in den FK die Mittellinie (Abbildung 10C, Pfeile), wohingegen lateral gelegene Projektionen ipsilateral verbleiben (Abbildung 10D, Pfeile).

2015 sind von Wolff und Kollegen insgesamt fünf verschiedenen Zelltypen identifiziert worden mit diversen Verzweigungsmustern in der Protozerebralbrücke, dem Fächerförmigen Körper und den Noduli: (1) *PB_{G2-9}.s-FBI1.b-NO3P.b.* (2) *PB_{G2-9}.s-FBI1.b-NO3M.b.* (3) *PB_{G2-9}.s-FBI2.b-NO3A.b.* (4) *PB_{G2-9}.s-FBI3.b-NO2D.b.* (5) *PB_{G2-9}.s-FBI3.b-NO2V.b.* (*G: Glomeruli; b: boutons; s: spines; P: Posterior; M: Medial, A: Anterior; D: Dorsal; V: Ventral*) (Wolff et al., 2015). Die Namensgebung der Zelltypen basiert auf der Kompartimentierung der Neuropile in horizontale und vertikale Schichten, hervorgerufen durch die Verzweigungen und terminale Innervierung der Kleinfeldneurone (siehe 1.4). Mithilfe der Visualisierungstechnik transTango konnte die Hypothese bestätigt werden, dass das postsynaptische Muster der $\Delta 7$ -Neurone PFN-Neurone enthält. Diese zeigen Verzweigungen in der PB, den unteren Schichten des FK und den Noduli zwei und drei auf (Abbildung 10).

Ein anatomischer Vergleich mit der Literatur legt nahe, dass es sich bei den $\Delta 7$ -postsynaptischen Neuronen um einen oder mehrere der fünf verschiedenen PFN-Zelltypen nach Wolff et al. handelt. Zur weiterführenden Analyse des Körpergrößenmodells stellte sich als nächstes die Frage, ob zwischen den $\Delta 7$ -Neuronen und den identifizierten PFN-Neuronen auch eine Signalübertragung stattfindet.

3.2.2 Detektion synaptischer Kontakte zwischen $\Delta 7$ - und PFN-Neuronen

Um herauszufinden, ob $\Delta 7$ -Neurone entsprechend des Modells zum Körperreichweitenlernen mit PFN-Neuronen kommunizieren, soll die Technik GRASP (*GFP reconstitution across synaptic partners*) verwendet werden. Prinzipiell wird die Methode herangezogen, um synaptische Verknüpfungen zwischen zwei Neuronen aufzuzeigen.

Das prä- ($\Delta 7$) und postsynaptische Neuron (PFN) exprimiert dazu je eine Hälfte eines geteilten GFPs (splitGFP₁₋₁₀ vs. splitGFP₁₁). Damit die eine spGFP-Version ausschließlich präsynaptisch und die andere Version ausschließlich postsynaptisch exprimiert wird, werden die beiden binären Systeme GAL4/UAS und *lexA/lexAop* eingesetzt. Für sich genommen ist ein geteiltes GFP-Fragment nicht in der Lage zu fluoreszieren. Erst die synaptische Nähe ermöglicht deren Rekonstitution zu einem funktionalen Fluoreszenzfarbstoff. Die Lokalisation der splitGFP-Fragmente ist durch Fusion an das Glykoprotein CD4 membranspezifisch (Gordon und Scott, 2009). Erst durch Verwendung der weiterentwickelten Variante Synaptobrevin-GRASP ist eine Aussage zur Richtung der Signalübertragung möglich. Dabei wird das splitGFP₁₋₁₀-Fragment an das neuronale Vesikelprotein Synaptobrevin fusioniert, die zweite Hälfte verbleibt membrangebunden an CD4. Bei Aktivierung des präsynaptischen Neurons und darauffolgender Vesikelausschüttung verschmilzt die vesikuläre Membran mit der präsynaptischen Membran, woraufhin das Synaptobrevin-gebundene splitGFP₁₋₁₀ mit seinem postsynaptisch gelegenen komplementären Part rekonstituieren kann (Macpherson et al., 2015). Für den Versuch wurde diese weiterentwickelte Synaptobrevin-GRASP-Variante verwendet.

Als präsynaptischer Treiber fungierte R55G08-lexA, als postsynaptische Treiber 007Y-GAL4, sowie R73D06-GAL4.

007Y-GAL4 und R73D06-GAL4 wurden ausgewählt, da Krause in seiner Dissertation diese Treiber zur Rettung der Phosphodiesterase in den PFN-Neuronen verwendete. Wie bei 210Y-GAL4 handelt es sich bei 007Y-GAL4 um eine *Enhancer-Trap*-Linie (Renn et al., 1999) und sie weist ein breites Expressionsmuster auf: Es umfasst die gesamte Protozerebralbrücke, den Fächerförmigen Körper, die Noduli, sowie die Pilzkörper und den Ellipsoidkörper (Poeck et al., 2008). Für ein distinkteres Expressionsmuster nutze Krause daher eine zweite Linie, R73D06-GAL4 aus der *Janelia FlyLight*-Kollektion (Jenett et al., 2012). Neben einer starken Expression in PB, FK und NO, exprimiert diese Linie jedoch auch in verschiedenen Bereichen des Gehirns. Beide Linien sind aber in der Lage, durch Rettung der Phosphodiesterase das Körpergrößengedächtnis wiederherzustellen.

Die nach dem Körpergrößenmodell hypothetisierte Kommunikationsrichtung von lateral nach kolumnär wird in Abbildung 11 visualisiert. Dabei umfasst Abbildung 11A-G die Synaptobrevin-GRASP-Experimente, für welche 007Y-GAL4 als PFN-Treiber eingesetzt wurde, Abbildung 11H-K die immunhistologischen Versuche mit R73D06-GAL4. Eine grüne Fluoreszenz steht repräsentativ für den synaptischen Kontakt zwischen zwei Neuronen; die Färbung der Postsynapsen erfolgte in magenta mittels eines α -CD4 Antikörpers (CD4::GFP₁₁).

$\Delta 7 \rightarrow$ PFN (R73D06-GAL4): Basierend auf der Rekonstitution des Markers sind im Bereich der Protozerebralbrücke deutlich synaptische Verknüpfungen zu erkennen (grün, Abbildung 11I). Eine Bekräftigung dieses Ergebnisses liefert Abbildung 11H; es handelt sich hierbei um die Eingenfluoreszenz eines Lebendpräparats, d.h. es wurde keine Verstärkung der Fluoreszenz mittels Antikörperfärbung vorgenommen. In diesem unfixierten Zustand des Präparates ist auffällig, dass Synapsen im Bereich der medialen Glomeruli G₁ ausbleiben (Pfeil). Begründet liegt dies im Projektionsmuster der PFN-Neuronen (Abbildung 11J), welche ebenfalls die beiden Glomeruli G₁ aussparen. Dies stimmt überein mit den Forschungsergebnissen von Wolff und Kollegen, denen zufolge bislang kein

kolumnärer Neurontyp bekannt ist, welcher den mittleren Glomerulus mit dem FK und den NO verbindet (Wolff et al., 2015).

$\Delta 7 \rightarrow$ PFN (007Y-GAL4): Zur besseren Darstellung der Antikörperfärbung wurde in der Abbildung 11B-G die Protozerebralbrücke (posterior) separiert vom Fächerförmigen Körper und den Noduli (anterior). Auch hier sind im Bereich der PB synaptische Kontakte zu sehen (Abbildung 11C), ein Ergebnis, welches durch die Visualisierung der Eigenfluoreszenz des Lebenspräparats bekräftigt werden kann (Abbildung 11A). Unerwarteter Weise kann unter Verwendung des 007Y-Treibers eine grüne Fluoreszenz auch in der Mitte der Protozerebralbrücke (G_1) detektiert werden (Abbildung 11C). Aus der Literatur ist bekannt, dass der monoklonale GFP-Antikörper (Sigma-Aldrich, G6539) spezifisch das rekonstituierte GFP nach der GRASP-Methode erkennen soll und nicht eine der beiden geteilten GFP-Varianten alleine (Gordon und Scott, 2009). Nach Untersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe und deutlich ersichtlich auch im nachfolgenden Experiment (Abbildung 12B und F) ist jedoch anzunehmen, dass besagter Antikörper geringfügig auch den CD4::spGFP₁₁-Part erkennt. Diese CD4::spGFP₁₁-Variante wird dann visualisiert, wenn während des Scanvorgangs die Fluoreszenz ausreichend stark durch den Laser angeregt wird. Da im durchgeführten Experiment der Kontakt einzelner weniger Zellen visualisiert werden sollte, ist dieser Effekt aufgetreten. Daneben ist bekannt, dass es sich bei 007Y-GAL4 um eine *Enhancer-Trap*-Linie mit einem breiten Expressionsmuster handelt, welche neben den PFN-Neuronen weitere Zellen umfasst. Es wäre möglich, dass 007Y-GAL4 einen Zelltyp mit leichter Expression in den mittleren Glomeruli enthält. Diese geringe Expression ist jedoch nur zum Teil erkennbar (siehe dazu auch das nachfolgendes Experiment).

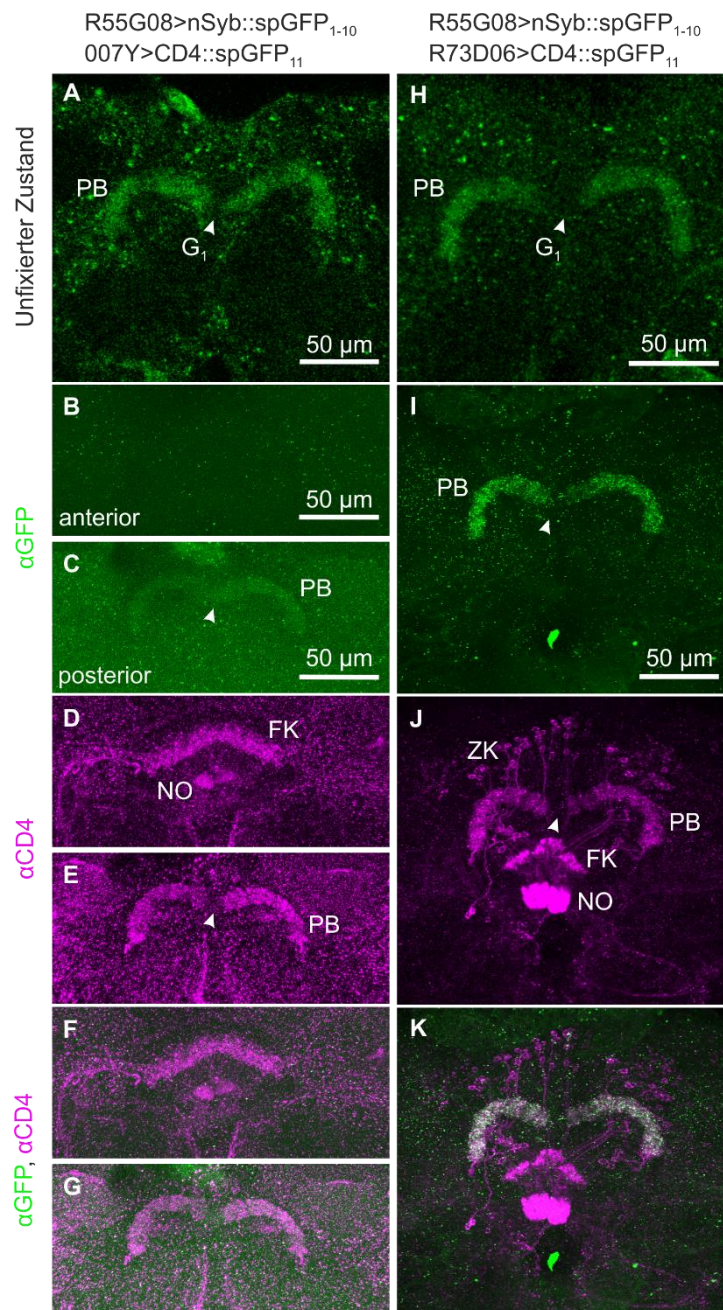


Abbildung 11: **Detektion synaptischer Kontakte zwischen $\Delta 7$ - und PFN-Neuronen.** Stehen zwei neuronale Gruppen miteinander in Kontakt, kann über die Expression zweier split-GFP Fragmente prä- (R55G08-lexA>lexAop-nSyb::spGFP₁₋₁₀) und postsynaptisch (007Y-GAL4>UAS-CD4::GFP₁₁ [A-G], bzw. R73D06-GAL4>UAS-CD4::GFP₁₁ [H-K]) ein funktionaler GFP-Reporter rekonstituiert werden. Ein synaptischer Kontakt zwischen den präsynaptischen $\Delta 7$ -Neuronen und den postsynaptischen PFN-Neuronen konnte bei Nutzung beider PFN-Treiber nachgewiesen werden. Die Pfeile deuten auf die medialen Glomeruli G₁. Zur Färbung wurde das Protokoll aus Kapitel 2.7.5 verwendet, α -GFP (Sigma-Aldrich), α -CD4 (Sigma-Aldrich); siehe Tabelle 4.

(A) Unfixierter Zustand, Schichtdicke: 8,25 μ m.

(B-G) Visualisierung der postsynaptischen PFN-Neurone (007Y-GAL4), FK = Fächerförmiger Körper, NO = Noduli, PB = Protozerebralbrücke. Unterteilung in anteriore ([B, D, F] Schichtdicke: 12,9 μ m) und posteriore Segmente ([C, E, G] Schichtdicke: 11,1 μ m).

(H) Unfixierter Zustand, Schichtdicke: 18,75 μ m.

(I-K) Visualisierung der postsynaptischen PFN-Neurone (R73D06-GAL4). Schichtdicke: 51 μ m.

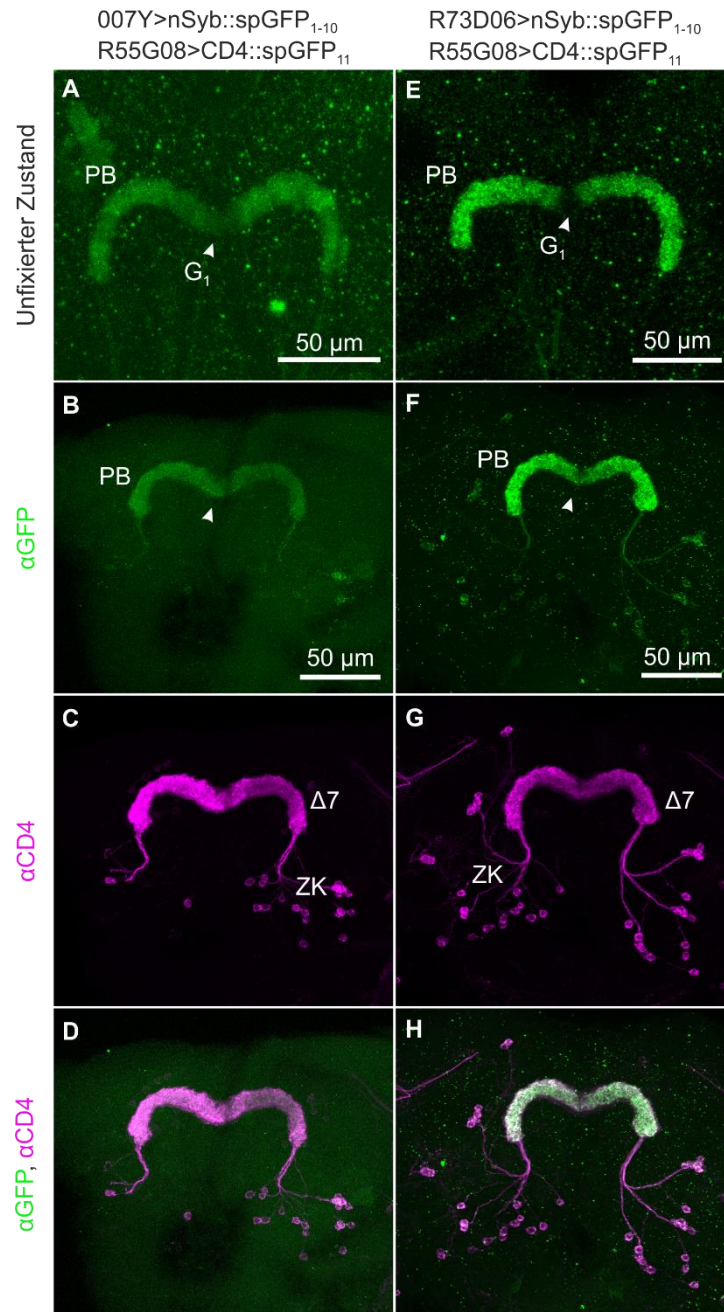


Abbildung 12: **Detektion synaptischer Kontakte zwischen PFN- und $\Delta 7$ -Neuronen.** Stehen zwei neuronale Gruppen miteinander in Kontakt, kann über die Expression zweier split-GFP Fragmente prä- (007Y-GAL4>UAS-nSyb::GFP₁₋₁₀ [A-D], bzw. R73D06-GAL4>UAS-nSyb::GFP₁₋₁₀ [E-H]) und postsynaptisch (R55G08-lexA>lexAop-CD4::spGFP₁₁) ein funktionaler GFP-Reporter rekonstituiert werden. Ein synaptischer Kontakt zwischen den kolumnären PFN-Neuronen und den $\Delta 7$ -Neuronen kann bei Nutzung beider PFN-Treiber nachgewiesen werden. Die Pfeile deuten auf die medialen Glomeruli G₁. Zur Färbung wurde das Protokoll aus Kapitel 2.7.5 verwendet, α -GFP (Sigma-Aldrich), α -CD4 (Sigma-Aldrich); siehe Tabelle 4.

(A) unfixierter Zustand, Schichtdicke: 26,4 μ m.

(B-D) Visualisierung der postsynaptischen $\Delta 7$ -Neurone, ZK = Zellkörper. Schichtdicke: 40,2 μ m.

(E) unfixierter Zustand, Schichtdicke: 29,25 μ m,

(F-H) Visualisierung der postsynaptischen $\Delta 7$ -Neurone. Schichtdicke: 44,25 μ m.

Durch die Anwendung von GRASP konnte die nach dem Körpergrößenmodell präferierte Kommunikationsrichtung von den $\Delta 7$ - auf die kolumnären PFN-Neuronen bestätigt werden. Nachfolgend war von großem Interesse, ob eine dem entgegen gerichtete Aktivierung, bzw. Inhibierung lateraler Neurone durch die PFN-Neurone physiologisch auftritt. Getrieben wurde dazu die präsynaptische nSyb::spGFP₁₋₁₀-Variante kolumnär (007Y-GAL4, bzw. R73D06-GAL4), die postsynaptische Variante CD4::spGFP₁₁ lateral mittels R55G08-lexA (Abbildung 12). Gegengefärbt wurden dieses Mal die $\Delta 7$ -Neurone (CD4::spGFP₁₁) mit α -CD4.

PFN (R73D06-GAL4) \rightarrow $\Delta 7$: Erstaunlicherweise sind auch für diese Richtung synaptische Verbindungen zwischen $\Delta 7$ - und PFN-Neuronen im Bereich der Protozerebralbrücke nachweisbar. Die grüne Fluoreszenz tritt sowohl im unfixierten Zustand (Abbildung 12E), als auch nach verstärkender Antikörperfärbung (Abbildung 12F) auf. Dieses Mal kann nach Färbung auch für den R73D06-Treiber im Bereich der mittleren Glomeruli eine Expression detektiert werden (Abbildung 12F). Zudem werden die $\Delta 7$ -Zellkerne fälschlicher Weise als „synaptische Kontakte“ durch die GRASP-Färbung visualisiert (vergleiche dazu die α -CD4-Gegenfärbung zu R55G08>CD4::spGFP₁₁, Abbildung 12G). Der verwendete monoklonale Antikörper für das rekonstituierte GFP ist somit nicht spezifisch (siehe dazu auch das vorheriges Experiment).

PFN (007Y-GAL4) \rightarrow $\Delta 7$: Die Ergebnisse mit 007Y-GAL4 stimmen mit denen von R73D06-GAL4 überein. Dass das 007Y-Expressionsmuster weitere G₁-enthaltende Zellen beinhaltet, wird durch die Eigenfluoreszenz des Lebendpräparats in Abbildung 12A unterstützt (siehe Pfeil).

Eine Einbindung dieses Ergebnisses (Kommunikation von PFN nach $\Delta 7$) in das Modell des Körperreichweitenlernens kann in Betracht gezogen werden, ist jedoch mit Vorsicht zu genießen. GRASP ermöglicht die Identifizierung bestehender Synapsen durch artifizielle Expression zweier splitGFP-Konstrukte. Ob diese Kommunikation jedoch während des Lernens der Körpergröße, deren Speicherung oder Abruf stattfindet, kann mithilfe von GRASP nicht nachgewiesen werden.

3.2.3 Identifizierung alternativer PFN-Treiber

Es stellt sich die Frage, ob die für GRASP herangezogenen PFN-Treiber 007Y und R73D06 die von Wolff und Kollegen identifizierten PFN-Zelltypen enthalten (siehe dazu 3.2.1). Der Namensgebung zufolge verzweigen sich diese entweder (1) in den Glomeruli 2-9 der PB, in der ersten Schicht des FB und der dritten Schicht der NO (PF1N3) oder etwa (2) in den Glomeruli 2-9 der PB, der zweiten Schicht des FB und der dritten Schicht der NO (PF2N3) oder (3) den Glomeruli 2-9 der PB, der dritten Schicht des FB und der zweiten Schicht der NO (PF3N2) (Wolff et al., 2015). Um einen Vergleich anzustellen, fällt unglücklicherweise die Expressionsstärke des breiten 007Y-Treibers sehr schwach aus. Auch die Expressionsstärke des kolumnären *Janelia FlyLight*-Treibers ist reduziert. Jedoch ist bekannt, dass sich die Expression des 007Y-Treibers auf eine dorsale und eine ventral-mittige Schicht des FK begrenzt (Poeck et al., 2008). R73D06 exprimiert in den ventralen Schichten des FK (Jenett et al., 2012). Folglich kann weder bestätigt, noch ausgeschlossen werden, ob PF1N3, PF2N3 oder PF3N2 dem Muster von 007Y und R73D06 zugehörig sind.

Daraufhin sollte ein für 007Y- und R73D06-GAL4 alternativer und präziserer PFN-Treiber ermittelt werden, da keine eindeutige Aussage zur Komposition der verwendeten PFN-Linien getroffen werden kann. In der Publikation von Wolff sind neben den identifizierten Zelltypen auch Treiberlinien der *Janelia FlyLight*-Kollektion angegeben, die die entsprechenden Zelltypen enthalten. Daraufhin wurden online (Jenett et al., 2012) die Expressionsmuster der angegebenen Treiber geprüft. Von den 17 aufgelisteten Treibern wurden diejenigen ausgeschlossen, die entweder starke Expression in den optischen Loben, unspezifische Expression im gesamten Gehirn oder zusätzliche Expression in anderen Strukturen wie den Pilzkörpern oder dem Ellipsoidkörper besaßen (insgesamt 9) oder aber sehr schwach in ihrer Expressionsstärke waren (insgesamt 4). Von den verbleibenden vier GAL4-Linien, R15D05, R16D01, R15E12 und R20C08 wurden die ersten beiden näher analysiert. Zudem wurden die Treiberlinien R84A01, R52B10, R44B10 aufgrund ihres online ersichtlichen PFN-präzisen Musters zur Kandidaten-Liste hinzugefügt. Wie in 1.5.1 beschrieben, nutzen PFN-Neurone bei der Bildung eines Körpergrößengedächtnisses regulatorischen Mechanismen, um die Signalweiterleitung über cAMP und PKA zu unterbinden. Demnach sollte eine Reduktion der Phosphodiesterase

Dunce und der regulatorischen Untereinheit der PKA (PKA-R1) in diesen Neuronen zu einem defekten Körpergrößenwissen führen, ebenso wie eine Überexpression der wildtypischen dCREB2-a-Isoform (Perazzona et al., 2004). Für den Treiber 007Y-GAL4 ist dies bekannt; er diente in der Analyse als Positivkontrolle. Tabelle 6 fasst die Ergebnisse der untersuchten Linien zusammen.

Tabelle 6: **Analyse alternativer PFN-Treiber.** Potentielle PFN-Treiber wurden durch Herunterregulierung der Phosphodiesterase Dunce (UAS-*dnc*^{RNAi}) und der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A (UAS-*PKA-R1*^{RNAi}) identifiziert. Die Treiber R16D01, und 007Y als Kontrolle, wurden alternativ durch Überexpression der wildtypischen Isoform von dCREB2 evaluiert. Neben dem bekannten 007Y-Treiber ist R84A01-GAL4 als einzige weitere Linie in der Lage durch *Knock-Down* der beiden RNAi-Konstrukte einen PFN-spezifischen Effekt (+) im Kletterverhalten zu erzielen. N = 20 pro Gruppe, außer R16D01>*dCreb2* (13), n = 10. Die statistische Auswertung ist im Anhang, Kapitel 9.2 zu entnehmen.

PFN-Treiber (GAL4)	PFN-Neurone> UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}	PFN-Neurone> UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}	PFN-Neurone> UAS- <i>dCREB2-a</i>
007Y	+	+	+
R84A01	+	+	nicht getestet
R52B10	+	-	nicht getestet
R15D05	-	-	nicht getestet
R44B10	-	-	nicht getestet
R16D01	nicht getestet	nicht getestet	-

Ausschließlich mit dem Treiber R84A01-GAL4 konnte sowohl durch *Knock-Down* von *dnc* (Median: 60%), als auch der *PKA-R1* (Median: 30%) das Körpergrößengedächtnis zerstört werden (Abbildung 13A und B). Dieser Treiber sollte darüber hinaus mittels Überexpression der katalytischen Untereinheit der PKA validiert werden. Diese konstitutiv aktive katalytische Untereinheit entstammt der Maus und wurde so mutiert, dass sie durch die regulatorische Untereinheit nicht inhibiert werden kann (Li et al., 1995). Diese andauernde Verstärkung der PKA-Aktivität führte zu einer deutlichen Verschlechterung der Körpergrößeneinschätzung der Fliegen (Median: 50%). Dieser Effekt kann jedoch nicht eindeutig den PFN-Neuronen zugeordnet werden. Die experimentellen Tiere unterscheiden sich statistisch nicht von der UAS-Kontrolle (Median: 30%); ein Trend zeichnet sich jedoch ab ($p = 0,06$). Abschließend sollte anhand des Expressionsmusters untersucht werden, welcher nach Wolff und Kollegen identifizierte PFN-Zelltyp im Muster von R84A01 vorhanden ist. Leider war es nicht möglich die Axone und Dendriten des Treibers durch Expression von DenMark (mCherry) und Synaptotagmin (GFP) zu visualisieren. Erst durch Expression von *CD4::tdGFP*

konnte eine schwache Färbung erzielt werden (Abbildung 13D-D“). Erkennbar sind Zellkörper dorsal der Protozerebralbrücke, Fragmente der PB selbst (Abbildung 13D), Projektionen zum Fächerförmigen Körper (Abbildung 13D') und der FB selbst (Abbildung 13D“). Die PB-FK-Projektionen verästeln sich in den unteren Schichten des FB, eine nähere Bestimmung ist bei der geringen Expressionsstärke jedoch nicht möglich. Die Linie R84A01 (BDSC #48375) wurde zweimal bestellt, die Linien unterschieden sich in ihrer Expressionsstärke nicht. Da R84A01-GAL4 Teil der Janelia FlyLight-Kollektion distinkter GAL4-Linien ist, kann dessen Expressionsmuster online eingesehen werden (Jenett et al., 2012). Deutlich ist eine GFP-Fluoreszenz in der untersten Schicht des FK zu erkennen, einer ventral-mittigen Schicht des FK, darüber hinaus in NO2 und NO3. Demnach ist es wahrscheinlich, dass die Zelltypen PF1N3, PF2N3 und PF3N2 in R84A01 enthalten sind und R84A01 als alternativer Treiber zu nutzen ist. Ein GRASP-Experiment wurde aufgrund der geringen Expressionsstärke des Treibers jedoch nicht angesetzt.

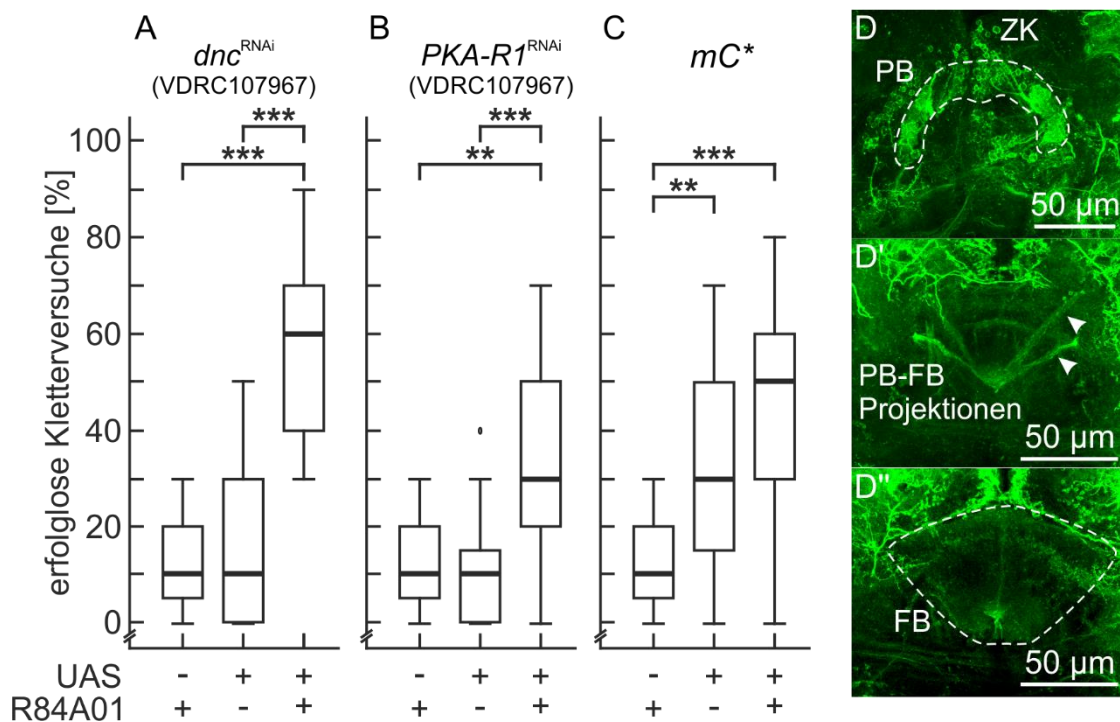


Abbildung 13: **Charakterisierung des potentiellen PFN-Treibers R84A01-GAL4.**

(A) Der *Knock-Down* der Phosphodiesterase (UAS-*dnc*^{RNAi}) im Muster von R84A01-GAL4 führte zu einer höchst signifikanten Verschlechterung des Körpergrößengedächtnisses (Median: 60%).

(B) Wird die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (UAS-*PKA-R1*^{RNAi}) in R84A01-GAL4 durch RNA-Interferenz herunterreguliert, initiieren die experimentellen Tiere deutlich mehr Kletterversuche als die Kontrollen.

(C) Die Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs durch Überexpression der katalytischen Untereinheit der PKA (*mC**) in R84A01-GAL4 resultiert in exzessivem Kletterverhalten (Median: 50%); die experimentelle Gruppe unterscheidet sich statistisch jedoch nicht signifikant von der UAS-Kontrolle (Median: 30%).

Nutzung einer nicht-überwindbaren 5,0 mm Lücke. *Drosophila* Männchen. N = 20 pro Genotyp. Nicht-parametrische Mediandarstellung der Daten entsprechend Abbildung 9. Die statistische Auswertung ist in Tabelle 14, Tabelle 15 und Tabelle 23 zu finden.

(D-D'') Antikörperfärbung des Genotyps R84A01>CD4::tdGFP (Standard-Protokoll AG Strauß, 2.7.3, α -GFP [Aves Labs]). Zur besseren Visualisierung wurden die Protozerebralbrücke (PB [D, optische Schichtdicke: 14,25 μ m]), die Projektionen zwischen PB und Fächerförmigen Körper (FB [D', optische Schichtdicke 20,25 μ m]) und der FB selbst (D'', optische Schichtdicke: 21,75 μ m) separiert dargestellt. Die Neuropile sind mit gestrichelten Linien umzeichnet. ZK: Zellkörper.

Interessanterweise befasste sich eine kürzlich veröffentlichte Studie des Jayaraman-Labors mit der funktionalen Analyse des Zentralkomplex-intrinsischen Netzwerkes, unter Zuhilfenahme der *Patch-Clamp*-Technik, Optogenetik und Kalzium-Indikatoren (Franconville et al., 2018). Dabei wurden funktionale Verknüpfungen zwischen Δ 7-Neuronen und PFN-Neuronen nachgewiesen (Abbildung 14). Darunter fällt zum einen eine exzitatorische Signalübermittlung von Δ 7-Neuronen auf PFN-Neuronen mit Verzweigungen in der ersten, am meisten ventral gelegenen Schicht des FK und Verzweigungen im ventralen dritten Nodus (Zelltyp PF1N3). Zum anderen inhibieren Δ 7-Neurone den Zelltyp PF3N2v, welcher seine Verästelungen in der dritten Schicht des FK und dem ventralen Kompartiment des mittleren Nodus besitzt. Für ihre Analysen nutzte die Arbeitsgruppe die Treiber R85H06 (PF1N3) und R67D09 (PF3N2) (Franconville et al., 2018). R85H06 wurde auch von Wolff und Kollegen als PF1N3-beinhaltender Treiber identifiziert (Wolff et al., 2015), für eine Körpergrößengedächtnis-spezifische Analyse jedoch aufgrund seiner sehr schwachen Expression in der PB ausgeschlossen; R67D09 ist nicht in der Wolff-Publikation aufgeführt. Auf Basis dieser neuen Daten sollten die beiden Treiber als alternative PFN-Treiber zwingend getestet werden. Es soll angemerkt werden, dass die Experimente der Veröffentlichung *ex vivo* durchgeführt wurden. Um eine funktionale Konnektivität unter physiologischen Bedingungen zu beschreiben, sollten die Experimente um weitere Verhaltensversuche ergänzt werden (Franconville et al., 2018).

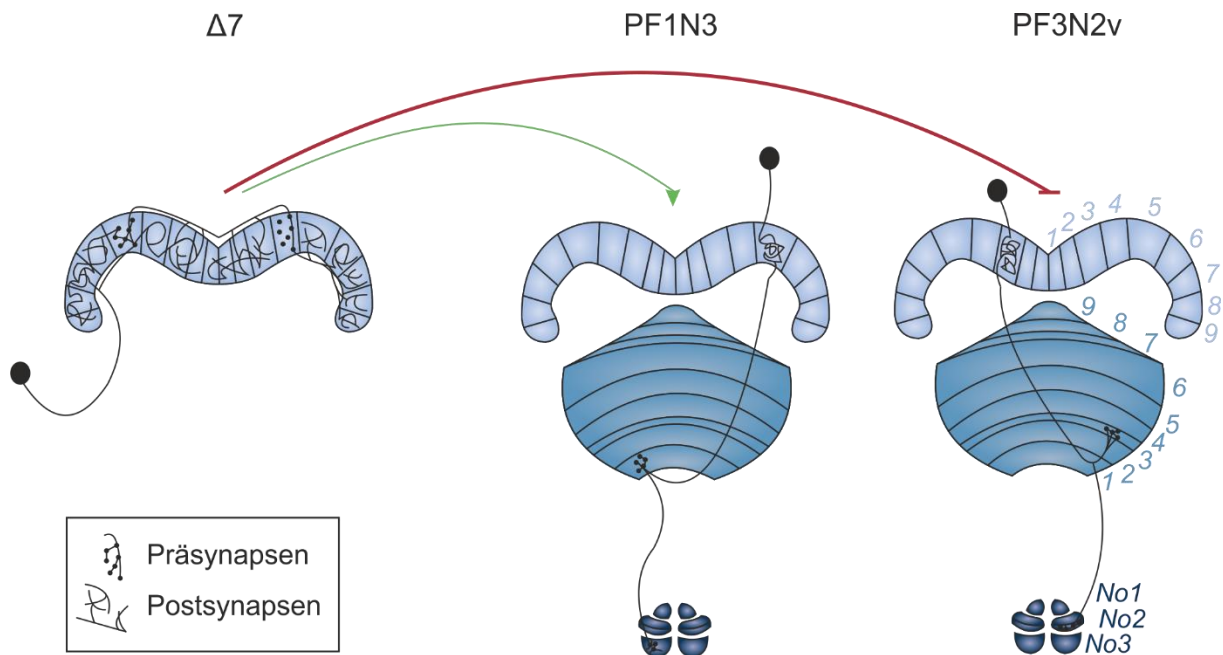


Abbildung 14: **Funktionale Verknüpfung zwischen $\Delta 7$ -Neuronen und PFN-Neuronen.** Schematische Darstellung nach (Franconville et al., 2018). PB-intrinsische $\Delta 7$ -Neurone gewährleisten die Informationsweitergabe innerhalb der PB. Dazu besitzen sie postsynaptische Eingänge in allen 18 Glomeruli, die präsynaptischen Ausgänge sind durch sieben Glomeruli voneinander separiert. $\Delta 7$ -Neurone haben eine aktivierende Funktion auf PF1N3-Neurone und eine inhibierende Funktion auf PF3N2v-Neurone. PF1N3-Neurone projizieren von der PB (Postsynapsen) auf die erste Schicht des FK (Präsynapsen) und den dritten Nodus (Prä- und Postsynapsen). PF3N2v projizieren von der PB (Postsynapsen) auf die dritte Schicht des FK (Präsynapsen) und das ventrale Kompartiment des zweiten Nodus (Prä- und Postsynapsen).

3.3 Phasen der Gedächtnisbildung

3.3.1 Das Erlernen der Körpergröße bedarf keiner sensiblen Lebensphase

Krause beantwortete, nach Vorarbeiten von Kienitz (2010), bei der Analyse des Körpergrößengedächtnisses die entscheidende Frage, dass die Körpergrößenreichweite von der Fliege erlernt werden muss und nicht angeboren ist (Krause, 2015). Das Erlernen unterliegt der Generierung von Bewegungsparallaxe im Lauf, natürliche Landmarken dienen dabei als Anhaltspunkte. Im Labor kann eine visuell strukturierte Umgebung durch eine vertikal schraffierte Arena ersetzt werden. Dabei ist zu beachten, dass die räumliche Wellenlänge des eingesetzten Streifenmusters mit dem Komplexauge von *Drosophila* interferieren kann. Dieses besteht aus 700 Ommatidien mit einem Interommatidialabstand von $4,8^\circ$. Wird einer Fliege im Flug ein vertikales Streifenmuster einer räumlichen Wellenlänge von 24° (optimal) dargeboten, ist die optomotorische Antwort der Fliege am stärksten. Nimmt die räumliche Wellenlänge hingegen einen Wert zwischen dem einfachen und dem doppelten Interommatidialabstand an, empfindet die Fliege eine Umkehr der

Bewegung aufgrund rein geometrischer Interferenz. Ein vertikales Streifenmuster vom doppelten Interommatidialabstand (etwa 10°) hebt jegliches Bewegungssehen auf (Heisenberg und Wolf, 1984). Diese Studien von Heisenberg und Wolff zum Bewegungssehen der Fliege wurden von Krause zur Analyse des Körpergrößenerlernens genutzt. Er konnte zeigen, dass exzessiv kletternde, naive Fliegen, welche in einem Streifenzyylinder von 24° räumlicher Wellenlänge trainiert wurden, ihre Körpergröße am folgenden Tag an einer unüberwindbaren Lücke optimal einschätzen konnten. Bei Training in vertikalen Streifenzyindern von 10° oder 8° räumlicher Wellenlänge war dies hingegen nicht möglich (Krause, 2015).

Die Tiere, mit denen Krause die beschriebenen Versuche durchführte, besaßen ein Alter von drei Tagen. Es stellt sich die Frage, ob das Erlernen der Körpergröße auf diese frühe, möglicherweise sensible Lebensphase beschränkt ist. Dazu wurde neben einer jungen Kontrollgruppe (3-4 Tage alt) ältere Fliegen (8-9 Tage alt) dunkel aufgezogen und auf ihren naiven Zustand an einer nicht überwindbaren 5,0 mm Lücke getestet (Abbildung 15, graue Boxen). Parallel dazu wurden jeweils junge und ältere Fliegen in einem optimal gestreiften Zylinder (24°) für 20 min trainiert. Diese trainierten Tiere zeigten am folgenden Tag eine signifikante Reduktion erfolgloser Kletterversuche (Abbildung 15, weiße Boxen, jung: 60 % auf 20%, älter: 45% auf 20% im Median). Demnach kann eine kritische Lebensphase für das Körpergrößenerlernen ausgeschlossen werden.

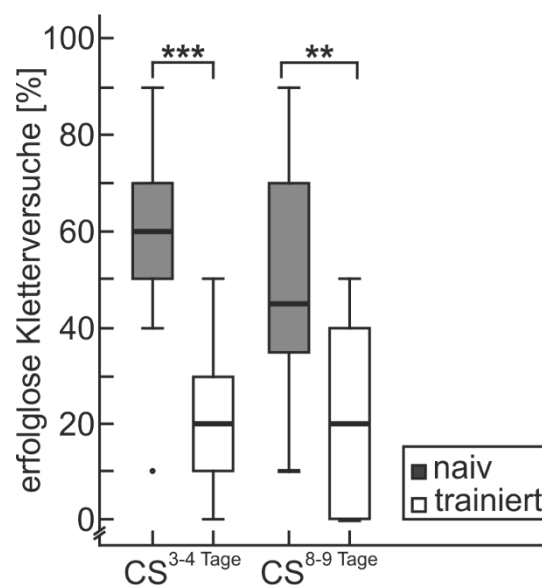


Abbildung 15: **Das Erlernen der Körpergröße kennt keine kritische Phase.** Die erfolglosen Kletterversuche

dunkel-aufgezogener (naiv, graue Boxen) junger (3 – 4 Tage alt) und älterer (8 – 9 Tage alt) Männchen wurden an einer 5,0 mm Lücke erfasst. Parallel dazu wurden naive Männchen gleichen Alters in einem optimalen Streifenzyylinder für 20 min trainiert und gleich danach während der Konsolidierung dunkel gestellt und nach 24 Stunden getestet (weiße Boxen). N = 10 (CS³⁻⁴ Tage naiv), 14 (CS³⁻⁴ Tage trainiert), 12 (CS⁸⁻⁹ Tage naiv), 10 (CS⁸⁻⁹ Tage trainiert); n = 10. Die statistische Auswertung ist im Anhang, Tabelle 24 aufgeführt.

Nicht-parametrische Median-Darstellung entsprechend Abbildung 9, **: p>0,01; ***: p> 0,001. Siehe auch (Krause et al., 2019).

3.3.2 Der Abruf der Körpergröße ist 12 Stunden nach dem Lernen möglich

Krause konnten zeigen, dass die Konsolidierung der erlernten Größe verhindert werden kann, sofern Fliegen einem andauernden Bewegungstress ausgesetzt sind. Dazu ließen sie die Haltungsgläschen naiver Fliegen direkt nach Abschluss des Trainings für 24 Stunden auf einem Wippschüttler hin und her rollen. Begannen diese Rollbewegungen hingegen erst zwei Stunden nach Trainingsende, wiesen die Fliegen am folgenden Tag ein intaktes Körpergrößengedächtnis auf. Folglich unterbindet die induzierte Lokomotion oder Stress die Konsolidierung der Körpergröße; dieser Prozess scheint jedoch zwei Stunden nach dem Lernen abgeschlossen zu sein (Krause, 2015).

Daraufhin stellte sich die Frage, wann nach Abschluss der Lernphase die Fliege in der Lage ist, ihr Körpergrößenwissen auch abzurufen. Dafür wurden naive Fliegen für 20 Minuten in einem optimalen Streifenzyylinder trainiert und zu definierten Zeiten nach Abschluss des Trainings an einer unüberwindbaren 5,0 mm Lücke getestet. Drei Minuten, vier Stunden, sowie sechs Stunden nach Trainingsende konnten keine Unterschiede zwischen naiven (graue Boxen) und trainierten Fliegen (weiße Boxen) festgestellt werden (Abbildung 16). Frühestens nach 12 Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion der Kletterinitiationen bei der trainierten Gruppe (von 55% auf 40% im Median). Ein intaktes Körpergrößengedächtnis (Median: 20%) zeigten Fliegen 14, bzw. 24 Stunden nach Abschluss des Trainings. Das Körpergrößengedächtnis unterscheidet sich in diesem Parameter deutlich vom olfaktorischen Gedächtnis, welches direkt nach dem Training abrufbar ist (Tully et al., 1994).

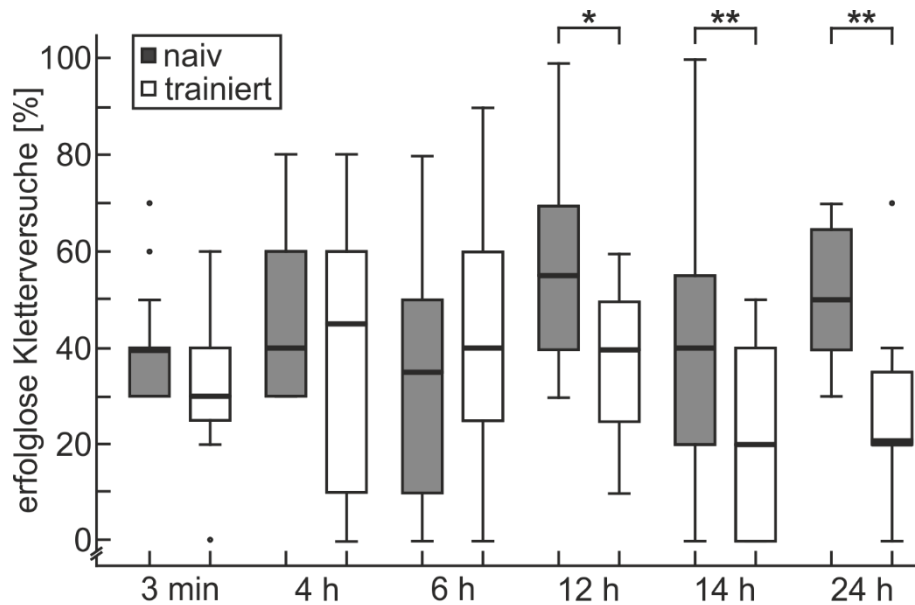


Abbildung 16: **Der Abruf der Körpergröße ist erst 12 Stunden (h) nach dem Lernen möglich.** Die grauen Boxen bilden die erfolglosen Kletterversuche dunkel-aufgezogener (naiv) Männchen an einer 5,0 mm Lücke ab. Zum Erlernen der Körpergröße schloss sich für die getesteten Männchen ein Training von 20 min in einem Streifenzylinder an, zur Generierung von optimaler Parallaxenbewegung. Daraufhin wurden die Fliegen 3 min, 4 h, 6 h, 12 h, 14 h, und 24 h nach dem Training durch einen erneuten Test an der unüberwindbaren Lücke nach dem Abruf der Körpergrößeninformation befragt (weiße Boxen). Während dieser Zeitspannen verblieben die Fliegen im Dunkeln. Für den naiven Test (3 min, 4 h, 12 h, 24 h) wurden nur Fliegen gewertet und nachfolgend trainiert, die min. 30 % Kletterinitiationen an der 5,0 mm Lücke zeigten. Die Selektion war aufgrund äußerer schwankender Bedingungen notwendig. Für den naiven Test (6 h und 14 h) waren die Bedingungen konstant, eine Selektion musste nicht angewandt werden. N = 15 (3 min naiv), 15 (3 min trainiert), 14 (4 h, naiv), 14 (4 h trainiert), 24 (6 h naiv), 24 (6 h trainiert), 12 (12 h, naiv), 12 (12 h trainiert), 24 (14 h naiv), 22 (14 h trainiert), 12 (24 h naiv), 12 (24 h trainiert); n = 10. Die statistische Auswertung ist im Anhang, Tabelle 25 aufgeführt. Nicht-parametrische Median-Darstellung entsprechend Abbildung 9. Siehe auch (Krause et al., 2019).

3.3.3 Die Konsolidierung und Aufrechterhaltung der Körpergröße ist

Proteinbiosynthese-abhängig

Tully konnte 1994 zeigen, dass die Verfütterung des Proteinbiosynthese-Inhibitors Cycloheximid die Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses stört; eine Assoziation zwischen Duft und elektrischen Schock blieb aus. Wird die Synthese neuer Proteine während der Konsolidierung behindert, finden keine langfristigen Veränderungen der Synapse statt; die gelernte Information kann nicht in ein Langzeitgedächtnis überführt werden. Wichtig zu nennen ist, dass zur Bildung dieses Langzeitgedächtnisses das sogenannte *Spaced Training* angewandt wurde. Bei diesem Intervalltraining werden Duft und Schock gekoppelt in sich wiederholenden Trainingseinheiten, unterbrochen von definierten Pausen. Es ist zu unterscheiden vom *Massed Training*, bei welchem die Trainingszyklen aneinandergereiht ohne Pausen stattfinden. Das *Massed Training* ist im Gegensatz zum *Spaced Training* unabhängig von der Proteinbiosynthese. Es erzeugt ein Gedächtnis, welches bereits

nach 24 Stunden um 50% reduziert ist und innerhalb der nächsten drei Tage komplett verschwindet (Tully et al., 1994). Um herauszufinden, ob auch für die Gedächtnisbildung der Körpergröße bei Tauffliegen die Synthese neuer Proteine benötigt wird, wurde nach Vorbild Tullys Cycloheximid verfüttert. Als Glutarimid-Antibiotikum greift Cycloheximid auf vielfältige Weise in den Prozess der Translation ein; u. a. inhibiert es den Transfer von Aminosäuren von den Aminoacyl-tRNAs auf das entstehende Peptid (Obrig et al., 1971). Zur Beantwortung der Fragestellung wird die Körpergrößeneinschätzung dunkelaufgezogene Fliegen an einer unüberwindbaren 5,0 mm Lücke festgehalten, bevor die Fliegen ein 20-minütiges Training in einem optimalen Streifenzyylinder absolvieren. Im Anschluss an das Training erfolgt die Verfütterung des Translationshemmers für zwei Stunden im Dunklen. Die Ergebnisse zeigen, dass, im Vergleich zur Kontrolle, behandelte Fliegen nicht in der Lage sind ihr Körpergrößenwissen zu konsolidieren (Abbildung 17A); deren Kletterinitiationen am Folgetag (weiße Box, 55% im Median) unterscheiden sich nicht von denen des naiven Zustandes (graue Box, 50% im Median).

Aufbauend auf den Versuchen von Tully gingen Lagasse und Kollegen 2009 bei der Analyse des olfaktorischen aversiven Gedächtnisses noch einen Schritt weiter. Sie fragten nach der Notwendigkeit der Proteinbiosynthese bei der Aufrechterhaltung des Gedächtnisses. Erhielten die Versuchstiere 24 Stunden nach dem olfaktorischen Training eine Behandlung mit Cycloheximid, zeigte sich keine Beeinflussung des Gedächtnisses; die Fliegen waren in der Lage den bestraften Duft zu erinnern (Lagasse et al., 2009). Dies verhält sich gegensätzlich zur Gedächtnisaufrechterhaltung der Körpergröße. Eine Blockade der Translation 24 Stunden nach optimaler Parallaxenerfahrung im Streifenzyylinder verhindert eine signifikante Reduktion der Kletterinitiationen an der unüberwindbaren Lücke (Abbildung 17B). Für die Aufrechterhaltung des Körpergrößengedächtnisses ist demnach eine kontinuierliche Synthese neuer Proteine notwendig.

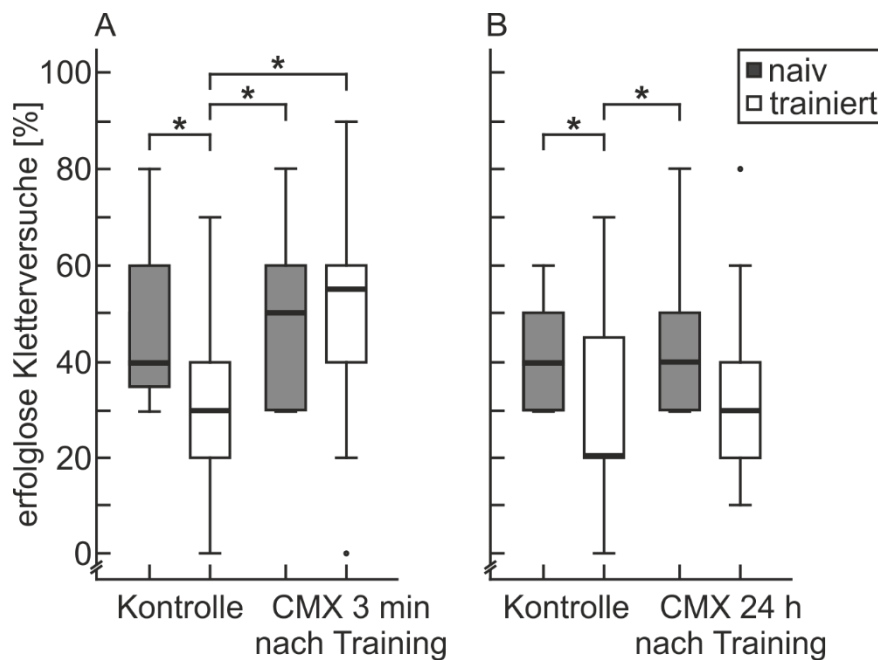


Abbildung 17: **Die Konsolidierung und Aufrechterhaltung der Körpergröße ist Proteinbiosynthese-abhängig.** Zur Gewährleistung eines naiven Phänotyps wurden dunkel-aufgezogene Männchen (graue Boxen) an der 5,0 mm Lücke auf min. 30% erfolgreiche Kletterinitiationen selektiert. Zum Erlernen der Körpergröße schloss sich an den Test ein 20-minütiges Training in einem optimalen Streifenzyylinder an. Nachfolgend wurden den Fliegen entweder 200 μ l 35 mM Cycloheximid/ 10% Glukose/ 3% Ethanol (Tully et al., 1994) verfüttert oder 200 μ l der Kontrolllösung, bestehend aus 10% Glukose/ 3% Ethanol. Die Verfütterung erfolgte auf Filterpapier für zwei Stunden, der sich anschließende Test fand 24 Stunden später statt (Dunkelhaltung). Dunkelgraue Boxen: naiver Zustand, weiße Boxen: trainierter Zustand.

(A) Wird die Proteinbiosynthese direkt nach dem Training (3 min) unterbunden, können die Fliege ihre Körpergröße nicht konsolidieren. N = 23 (Kontrolle, naiv), 20 (Kontrolle 3 min nach Training, trainiert), 21 (CMX, naiv), 18 (CMX 3 min nach Training, trainiert); n = 10.

(B) Wird die Proteinbiosynthese 24 h nach dem Training unterbunden, ist es den Fliegen nicht möglich ihr Gedächtnis auszubilden, bzw. aufrechtzuerhalten. N = 26 (Kontrolle, naiv), 19 (Kontrolle 24 h nach Training, trainiert), 25 (CMX, naiv), 21 (CMX 24 nach Training, trainiert); n = 10.

Die statistische Auswertung ist im Anhang, Tabelle 26 aufgeführt. Nicht-parametrische Median-Darstellung entsprechend Abbildung 9. Siehe auch (Krause et al., 2019).

3.4 Die Konsolidierung und Gedächtnisaufrechterhaltung der Körpergröße bedarf dCREB2

Kapitel 1.2 beschreibt die cAMP-Signalkaskade, welche mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors dCREB2 die Synthese neuer Proteine einleitet, sodass eine gelernte Information in ein Langzeitgedächtnis überführt werden kann. Inwiefern einzelne Komponenten dieser Kaskade neben der Gedächtnisbildung auch für die Gedächtnisaufrechterhaltung genutzt werden, soll im Folgenden analysiert werden. Diesbezüglich konnte Krause in seiner Dissertation bereits zeigen, dass mechanistische Unterschiede in der Gedächtnisbildung und Gedächtnisaufrechterhaltung auftreten. Er nutzte dazu den temperatursensitiven ubiquitär exprimierten GAL4-Repressor *Tub>GAL80^{ts}*. Versuchstiere des Genotyps

*rut¹/Y;Tub>GAL80^{ts}/+;UAS-*rut*/210Y-GAL4* zeigten bei Haltung auf 17°C und unter hell/dunkel-Verhältnissen ein exzessives Kletterverhalten. Eine sich anschließende 24-stündige Hitzeinduktion konnte durch Transkription der *rutabaga*-cDNA in den LPB-Neuronen den Phänotyp retten. Dies zeigte sich dadurch, dass die Fliegen am Folgetag von Kletterversuchen an unüberwindbaren Lücken absahen. Wird hingegen Fliegen dieses Genotyps mit bereits konsolidiertem Körpergrößengedächtnis die Transkription der *rut*-cDNA durch Temperaturreduktion vorenthalten (bis zu 18 Tage lang), kommt es nicht zu einer Verschlechterung des Gedächtnisses (Krause, 2015). Demnach bleiben die Synapsen der LPB-Neurone solange plastisch, bis die Konsolidierung der Körpergröße vorgenommen worden ist. Für die Aufrechterhaltung des Gedächtnisses wird die Aktivität der Adenylylzyklase nicht mehr benötigt.

Daraufhin stellte sich die Frage nach der Aktivität des Transkriptionsfaktors dCREB2 in der Gedächtnisbildung- und Aufrechterhaltung. Unter Verwendung des Genotyps *Hsp70-GAL4>UAS-dCREB2-b* konnte Krause nachweisen, dass dCREB2 für die Konsolidierung benötigt wird. Dazu setzte er dunkel- und bei 17°C aufgezogene Versuchstiere einer optimalen visuellen Stimulation aus. Die Hälfte der Versuchsgruppe, die im Anschluss an das Training ihre Körpergröße bei 17°C konsolidieren durfte, zeigte ein intaktes Körpergrößengedächtnis am Folgetag. Dahingegen war es der anderen Hälfte der Versuchstiere, welche die 24 Stunden nach dem Training auf 31°C verbrachte, nicht möglich ihre Körpergröße am nächsten Tag abzurufen (Krause, 2015). Der nachfolgende Versuch befasst sich mit der Aktivität von dCREB2 zum Zeitpunkt der Gedächtnisaufrechterhaltung. Angelehnt an die Untersuchungen von Hirano und Kollegen zum olfaktorischen aversiven Gedächtnis wird dabei unterschieden zwischen einer frühen (bis zu vier Tage nach Training) und einer späten Phase (vier – sieben Tage nach Training) der Gedächtnisaufrechterhaltung. Die japanische Arbeitsgruppe fand heraus, dass durch Überexpression der dominant negativen dCREB2-b-Isoform einen Tag nach der olfaktorischen Konditionierung das Gedächtnis am Tag vier nach dem Training höchst signifikant reduziert vorlag. Erfolgte die Inaktivierung von dCREB2 jedoch erst vier bis sieben Tage nach Training, verhielten sich die Versuchstiere entsprechend gut wie die Kontrolle (Hirano et al., 2016). Es stellt sich heraus, dass das olfaktorische Gedächtnis und das Körpergrößengedächtnis während der frühen Phase der

Aufrechterhaltung beide von der Aktivität von dCREB2 abhängen. Wird durch 24-stündige Temperaturerhöhung die Expression der Repressor-Isoform in drei-Tage alten Fliegen mit intaktem Körpergrößengedächtnis induziert, steigen die durchgeführten Bein-über-Kopf-Suchschläge am Folgetag höchst signifikant von 10% auf 20 % im Median an (Abbildung 18A). Entsprechend verhalten sich auch die experimentellen Tiere, bei denen die Induktion mit einem Alter von sieben Tagen erfolgt; die Kletterinitiationen erhöhen sich im Median von 10% auf 20% erfolgreiche Kletterversuche (Abbildung 18C). Die Treiberkontrollen ändern ihren Anteil an erfolglosen Kletterversuchen nach Temperaturerhöhung nicht (Abbildung 18B und D). Im Gegensatz zum olfaktorischen Gedächtnis zeigt sich somit für das Körpergrößengedächtnis, dass die frühe, als auch späte Phase der Aufrechterhaltung von dCREB2 abhängt.

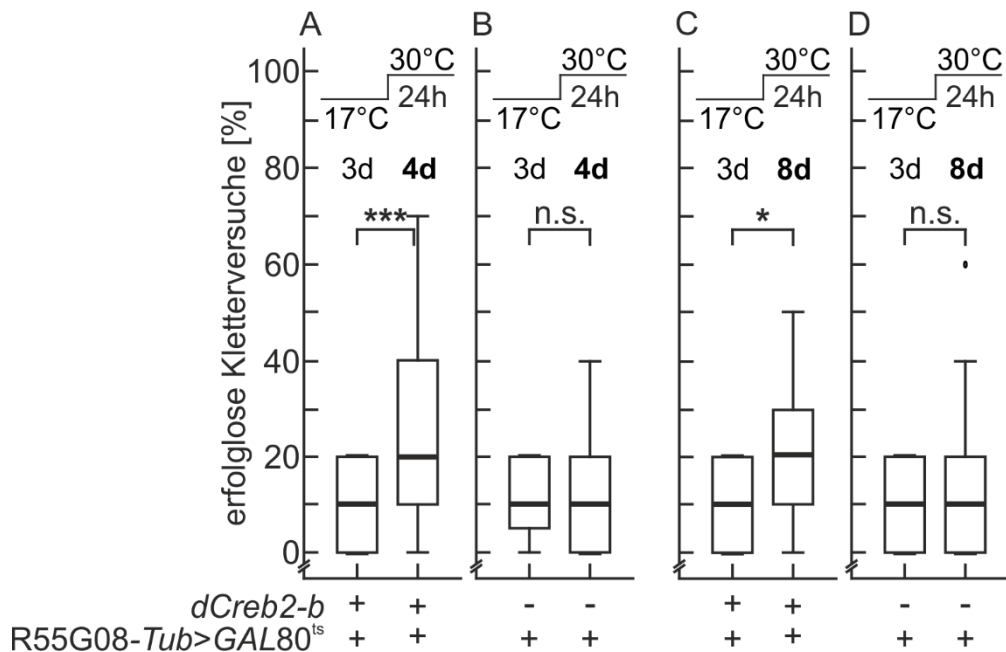


Abbildung 18: **dCREB2-Aktivität wird in den $\Delta 7$ -Neuronen für die Konsolidierung und Gedächtnisaufrechterhaltung der Körpergröße benötigt.**

(A) Mit einem Alter von drei Tagen werden hell/dunkel- und bei 17°C aufgezogene Fliegen auf ein intaktes Körpergrößengedächtnis selektioniert (Kletterversuche $\leq 20\%$). Eine anschließende Hitzeinduktion des dominant negativen Repressors dCREB2-b (UAS-dCreb2-b) über 24 h soll für eine Inhibition des dCREB2-Transkriptionsaktivators in den $\Delta 7$ -Neuronen sorgen. Durch erneutes Testen am Folgetag zeigt sich, dass die frühe Phase der Gedächtnisaufrechterhaltung beeinträchtigt ist; N = 21 je Gruppe, n = 10.

(B) Bei einer entsprechenden Treiberkontrolle konnte dieser Phänotyp nicht beobachtet werden; N = 24 je Gruppe, n = 10.

(C) Wird die Hitzeinduktion während der späten Phase der Gedächtnisaufrechterhaltung durchgeführt (Alter der Fliegen: sieben Tage), führt auch dies zu einer Reduktion der Gedächtnisleistung; N = 21 je Gruppe, n = 10.

(D) Die Treiberkontrolle ist davon nicht betroffen; N = 21 je Gruppe, n = 10.

Eingesetzt wurde für diesen Versuch eine 5,5 mm Lücke. Kompensiert wurde eine größere Körpergröße der Tiere, welche durch ein verlangsamtes Wachstum auf 17°C entstand. Die statistische Auswertung ist im Anhang,

in Tabelle 28 bis Tabelle 31 zu finden. Nicht-parametrische Median-Darstellung entsprechend Abbildung 9. Siehe auch (Krause et al., 2019).

3.5 Die Analyse der dCREB2 Co-Aktivatoren dCBP und CRTC

Im Zuge der Analyse der Gedächtnisaufrechterhaltung sollten die dCREB2 Co-Aktivatoren dCBP (*Drosophila CREB binding protein*) und CRTC (*CREB-regulated transcription coactivator*) untersucht werden. Aus der Vertebraten-Forschung ist bekannt, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB durch diese Co-Aktivatoren modulierbar ist. Die Rekrutierung von CBP findet dabei spezifisch nach vorangegangener Transkriptionsinduktion durch cAMP statt. Mechanistisch erfolgt die Interaktion zwischen der KIX-Domäne von CBP und der KI-Domäne (*kinase-inducible domain*) von CREB nach der Phosphorylierung des Aminosäurerestes Ser133. CBP erfüllt zwei Funktionen: Zum einen verstärkt es die Expression von CREB-Zielgenen, indem es durch Acetylierung der Histone die Chromatinstruktur auflockert. Zum anderen rekrutiert es den RNA-Polymerase II-Komplex (Altarejos und Montminy, 2011). Bei Vertebraten werden neben CBP auch CREB-Co-Aktivatoren durch die CRTC-Familie gestellt (CRTC1, CRTC2, und CRTC3). Diese kommen im Zytoplasma vor und werden nur dann in den Zellkern transloziert, wenn sie über Calcineurin dephosphoryliert werden. Dieser Vorgang wird spezifisch durch die Anwesenheit von cAMP oder Kalzium ausgelöst. Im Zellkern bindet die CREB-bindende Domäne (CBD) der CRTCs die bZIP-Domäne von CREB, wodurch die Aktivität des Transkriptionsfaktors erhöht wird (Altarejos und Montminy, 2011).

Für die experimentelle Untersuchung wurden die Genprodukte von *dCBP* und *Crtc* unter Verwendung verschiedener RNAi-Linien in den $\Delta 7$ -Neuronen mittels R55G08-GAL4 herunterreguliert (Abbildung 19). Dabei zeigte sich für das dCBP-RNAi-Konstrukt mit der Nummer BDSC31728 kein signifikanter Unterschied im Verhalten im Vergleich zur GAL4-Kontrolle (Abbildung 19A). Der *Knock-Down* der *dCBP*-RNAi-Konstrukte mit den Nummern VDRC102885 und BDSC27724 führte zu einem Anstieg an erfolglosen Kletterversuchen auf 30% (Abbildung 19B), bzw. 60% (Abbildung 19C), unterschied sich jedoch nicht signifikant zu den getesteten UAS-Kontrollen. Den erhöhten Kletterinitiationen der UAS-Kontrollen liegt vermutlich eine sogenannte Leck-Expression zugrunde. Demnach reicht eine schwache

Transkriptionsrate durch den Basispromotor des UAS-Transgens aus, um die *dCBP* mRNA-Konzentration signifikant zu reduzieren, sodass ein Phänotyp im Verhalten auftritt. Erst durch Verwendung der VDRC-Nummer 46534 konnte eine $\Delta 7$ -Neuronen-spezifische Verschlechterung des Körpergrößengedächtnisses erzielt werden; die Leck-Expression war vernachlässigbar gering (Abbildung 19D). Für den *Knock-Down* des Co-Aktivators *Crtc* wurde die Linie BDSC42561 verwendet; die Kletterinitiationen der *Knock-Down*-Tiere unterschieden sich nicht von der GAL4-Kontrolle (Abbildung 19E). Jedoch führte der *Crtc-Knock-Down* mit der Linie BDSC28886 zu einem defekten Körpergrößengedächtnis, spezifisch für die $\Delta 7$ -Neurone (Abbildung 19F).

Zeigt die UAS-Kontrolle bereits ein gesteigertes Kletterverhalten (Leck-Expression), welches nicht unterschiedlich ist zum Kletterverhalten der *Knock-Down* Tiere, ist die Funktion der Co-Aktivatoren nicht auf die $\Delta 7$ -Neuronen begrenzt. Es kann den Co-Aktivatoren nur dann eine Rolle im Körpergrößengedächtnis zugesprochen werden, wenn der Verhaltensphänotyp (UAS-Kontrolle) durch Einkreuzen der Treiberlinie R55G08-GAL4 ($\Delta 7$ -Neurone) signifikant verstärkt wird. Dies ist wichtig zu unterscheiden, da das Körpergrößengedächtnis in den $\Delta 7$ -Neuronen lokalisiert ist.

Wie den Ergebnissen aus Abbildung 19 zu entnehmen ist, variiert die Stärke der Regulation zwischen den Konstrukten massiv (Schwankungen um bis zu 40% im Median nach *Knock-Down* von *dCBP* in den $\Delta 7$ -Neuronen, Schwankungen um bis zu 15% im Median nach *Knock-Down* von *Crtc* in den $\Delta 7$ -Neuronen). Der Ort der Integration nimmt dabei großen Einfluss auf die Expressionsstärke der Konstrukte. Die Linien BDSC31728, BDSC27724, und BDSC28886 (Chromosom III), sowie BL42561 und VDRC102885 (Chromosom II) wurden über die positionsgenaue Integrationsmethode nach Pfeiffer erstellt (Pfeiffer et al., 2008). Bei der Konzeption dieses Systems wurde darauf geachtet, dass ein Integrationsort ausgewählt wird, der möglichst nicht reguliert wird über ihn umgebende Promotoren und Enhancer. Im Gegensatz dazu integrierte das *dCBP*-Konstrukt der Linie VDRC46534 willkürlich in das Fliegen-genom (Dietzl et al., 2007). Gerät es dabei unter die Kontrolle eines starken, bzw. schwachen Enhancers, ist dies entscheidend für die Effizienz der RNA-Interferenz. Daneben hat sich herausgestellt, dass unabhängig vom Integrationsort

verschiedene RNAi-Konstrukte zum selben Gen unterschiedlich stark in ihrer Regulationsstärke ausfallen. Die RNAi-Konstrukte unterscheiden sich dahingehend, dass sie gegen distinkte kodierende Bereiche des Gens gerichtet sind; sie tragen somit unterschiedliche Sequenzen. Werden zur Analyse einer Genfunktion mehrere dieser Konstrukte eingesetzt, kann überprüft werden, ob ein RNAi-Konstrukt versehentlich die falsche Ziel-mRNA herunterreguliert hat. Dieses als *Off-Target* bezeichnete Phänomen ergibt sich, wenn die 20 bp-langen RNAi-Fragmente in ihrer Sequenz mehreren mRNAs als nur der Ziel-mRNA ähneln.

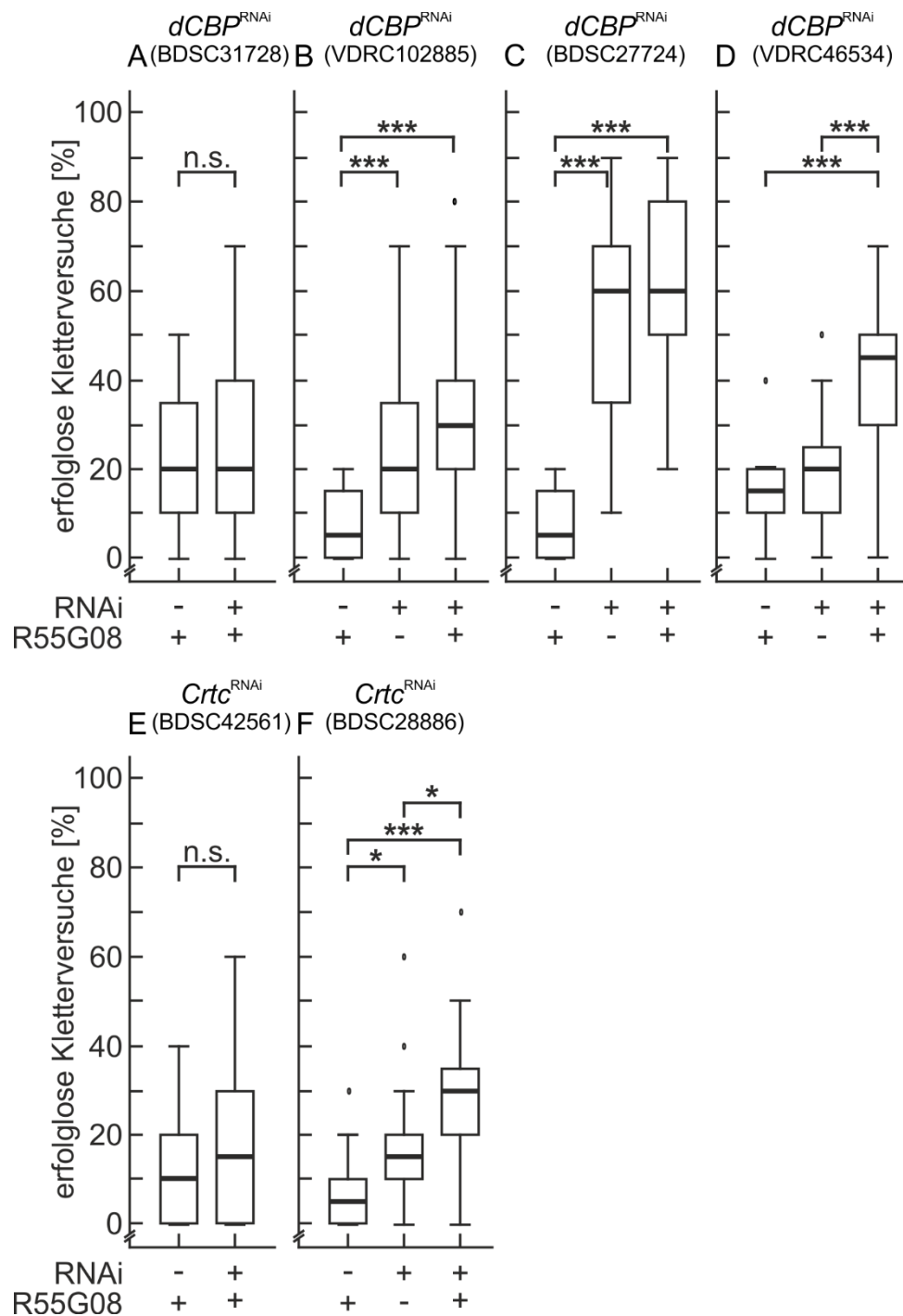


Abbildung 19: **Knock-Down der dCREB2 Co-Aktivatoren *dCBP* und *Crtc***. Unter Verwendung verschiedener RNAi-Konstrukte wurde die Funktion von *dCBP* und *CRTRC* im Körpergrößengedächtnis untersucht.

(A) Die Herunterregulierung von *dCBP* mittels des Konstruktes *dCBP*-RNAi (BDSC31728) in den $\Delta 7$ -Neuronen führt nicht zu einem Defekt in der Gedächtnisbildung.

(B-C) Der *Knock-Down* mit den *dCBP*-RNAi-Konstrukten VDRC102885 und BDSC27724 in den $\Delta 7$ -Neuronen resultiert in einem Anstieg an erfolglosen Kletterversuchen, welche sich aber nicht signifikant von den UAS-Kontrollen unterscheiden.

(D) Die Reduktion von *dCBP* (VDRC46534) in den $\Delta 7$ -Neuronen verhindert die Bildung eines Körpergrößengedächtnisses.

(E) Der *Knock-Down* von *Crtc* (BDSC42561) in den $\Delta 7$ -Neuronen bleibt ohne Effekt.

(F) Verglichen mit der UAS-Kontrolle, welche auch einen Phänotyp zeigt, verhindert die Reduktion von *CRTRC*

(BDSC28886) in den $\Delta 7$ -Neuronen spezifisch die Bildung eines Körpergrößengedächtnisses.

N = 20 für jede Gruppe, n = 10. Die Versuche wurden mit einer Lückengröße von 5,0 mm durchgeführt. Die statistische Auswertung ist dem Anhang, Tabelle 32 bis Tabelle 37 zu entnehmen. Nicht-parametrische Median-Darstellung entsprechend Abbildung 9.

Die *Knock-Down*-Experimente aus Abbildung 19B-D zeigen deutlich, dass der Co-Aktivatoren dCBP in Zentralnervensystem (ZNS) der Fliege benötigt wird; der Anteil erfolgloser Kletterversuche liegt bereits bei den UAS-Kontrollen erhöht vor (Leck-Expression). Darüber hinaus lässt der *Knock-Down* mit der Linie VDRC46534 vermuten, dass die $\Delta 7$ -Neurone dCBP für die Ausbildung eines Körpergrößengedächtnisses benötigen. Gleiches gilt für CRTC (Abbildung 19F); auch hier verhindert die Reduktion des Co-Aktivators in den $\Delta 7$ -Neuronen spezifisch die Bildung eines Körpergrößengedächtnisses. Zur Untermauerung dieses Ergebnisses wäre eine Analyse von weiteren Transgenen von Vorteil. Um nachfolgend der Frage nachzugehen, ob dCBP und CRTC auch während der Gedächtnisaufrechterhaltung ihre Funktion ausüben, wurden die Linien BDSC28886 und VDRC46534 ausgewählt. Fliegen des Genotyps R55G08-*Tub>GAL80^{ts}>dCBP^{RNAi}* (VDRC46534), deren Aufzucht unter hell/dunkel Bedingungen (LD) und 17°C (blaue Färbung der Box, Abbildung 20A) stattfand, wurden drei Tage nach Schlupf nach ihrem Körpergrößenvwissen befragt. Verwendet wurde eine 5,5 mm Lücke zur Kompensation der vergrößerten Körpergröße durch Aufzucht auf 17°C. Im Anschluss an den Test wurden dieselben Versuchstiere für einen, vier, bzw. sieben weitere Tage zur Induktion der RNAi einer Temperatur von 30°C ausgesetzt (rote Färbung der Boxen, Abbildung 20A). Mit diesem Testschema (siehe auch 2.4, Protokoll C) sollte geprüft werden, ob ein einmal konsolidiertes Gedächtnis durch eine sich anschließende Reduktion der beiden Co-Aktivatoren wieder vergessen werden kann. Dies würde sich durch einen Anstieg an initiierten Kletterversuchen (Tag 1 – 7) ausdrücken, verglichen mit dem Vortest (Tag 0). Es zeigte sich, dass im Vergleich zum gelernten Zustand (Tag 0) eine nachträgliche Reduktion von *dCBP* nicht zur Verschlechterung des Gedächtnisses führt. Auffallend ist ausschließlich ein signifikanter Abfall an Kletterinitiationen zwischen Induktionstag eins (Median: 50%) und vier (Median: 30%). Ein entsprechendes Experiment wurde auch mit dem Genotyp R55G08-*Tub>GAL80^{ts}>Crtc^{RNAi}* (BDSC28886) durchgeführt (Abbildung 20C). Auch hier führte der *Knock-Down* nicht zum Vergessen des

konsolidierten Körpergrößewissens. Zu beachten ist, dass der Versuch an Testtag 7 abgebrochen wurde, da die sich die Fliegen inaktiv verhielten und sie das zu detektierende Verhalten an der Lücke nicht ausführten.

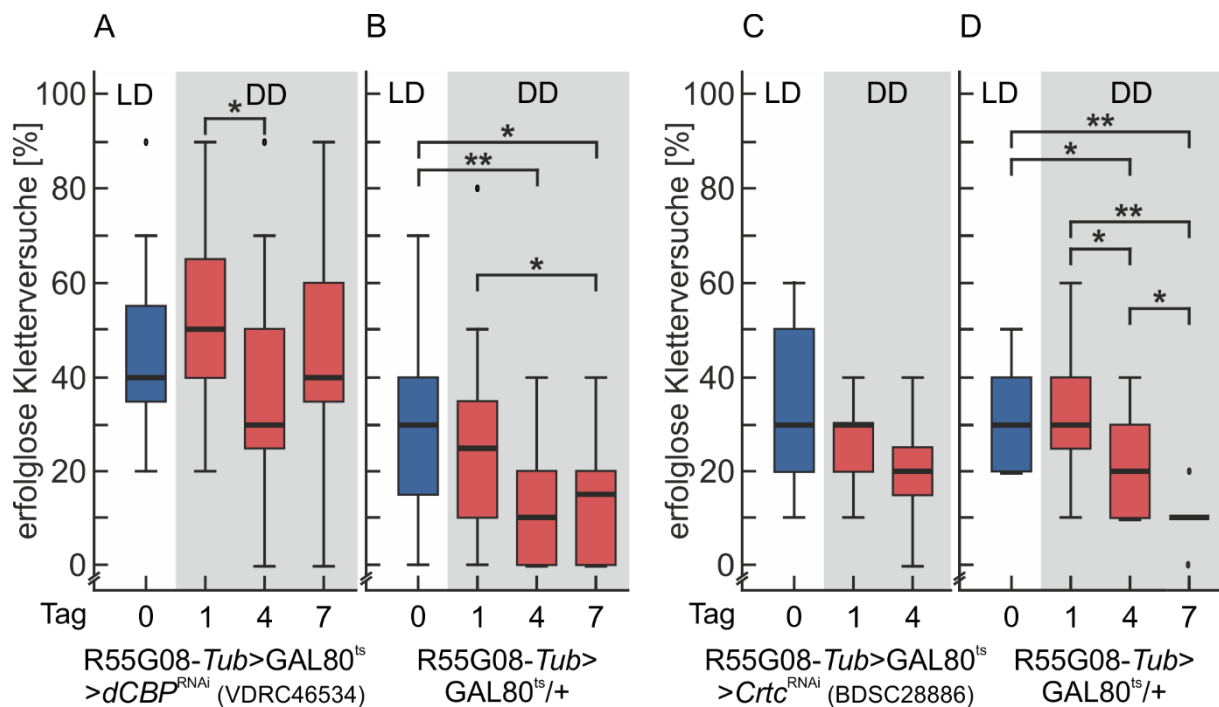


Abbildung 20: **Analyse der Funktion von dCBP und CRTC in der Gedächtnisaufrechterhaltung.** Die Versuchstiere wuchsen bei 17°C und unter hell/dunkel-Bedingungen (LD) auf, sodass es den Fliegen möglich sein sollte ein intaktes Körpergrößengedächtnis auszubilden (blaue Boxen). Unter Nutzung des temperatursensitiven GAL4-Repressors *Tub>GAL80^{ts}* konnte mittels Temperaturerhöhung (30°C) gezielt die RNAi gegen die dCREB2 Co-Aktivatoren induziert werden (rote Boxen). Das Körpergrößewissen der Fliegen wurde nach einem Tag, vier Tagen und sieben Tagen Hitzeinduktion abgefragt. Damit die Körpergröße nicht erneut gelernt werden konnte, erfolgte die Haltung dabei unter Lichtausschluss (DD).

(A) Im Vergleich zum gelernten Zustand (blaue Box) zeigt sich an Tag eins, vier und sieben kein statistisch signifikanter Unterschied an erfolglosen Kletterversuchen nach induziertem *Knock-Down* von *dCBP* (VDRC46534) in den $\Delta 7$ -Neuronen. N = 19, n = 10.

(B) Kontrollexperiment zu (A). Durch 4-, bzw. 7-tägige Hitzeinduktion reduzieren sich die Kletterversuche signifikant verglichen mit Testtag 0. Genotyp: R55G08-*Tub>GAL80^{ts}/+*. N = 20, n = 10.

(C) Eine eintägige, bzw. viertägige Reduktion des Co-Aktivatoren *Crtc* (BDSC28886) in den $\Delta 7$ -Neuronen bewirkt keine Verschlechterung des Körpergrößengedächtnisses. Der Test an Tag sieben wurde abgebrochen, da sich die Fliegen inaktiv zeigten und sie das zu detektierende Verhalten an der Lücke nicht ausführten. N = 15, n = 10.

(D) Kontrollexperiment zu (C). Verglichen mit der Ausgangssituation bewirkt die Hitzeinduktion einen Abfall der erfolglosen Kletterversuche an Tag vier und Tag 7. Genotyp: R55G08-*Tub>GAL80^{ts}/+*. N = 15, n = 10.

Das Temperaturregime von (A) und (B) betrug 17°C bis zum Test an Tag 0 und nachfolgend 30°C/25°C (14:10 Stunden Hell/Dunkel-Rhythmus) bis Test an Tag 7. Für (C) und (D) wurde die Temperatur nach Test an Tag 0 dauerhaft auf 30°C bis Test an Tag 7 heraufgesetzt. Die Versuche wurden mit einer Lückengröße von 5,5 mm durchgeführt. Die statistische Auswertung ist im Anhang, in Tabelle 38 bis Tabelle 41 zu finden. Nicht-parametrische Median-Darstellung entsprechend Abbildung 9.

Der Versuch zu Abbildung 20C wurde zeitlich vor dem Versuch zu Abbildung 20A ausgeführt. Ursprünglich wurde ein Temperaturregime gewählt, nach welchem die Versuchstiere nach Test an Tag 0 dauerhaft bis zum letzten Test auf 30°C

verweilten. Aufgrund der beobachteten Inaktivität der experimentellen Gruppe *R55G08-Tub>GAL80^{ts}>Crtc^{RNAi}* wurde nachfolgend für die Analyse des Genotyps *R55G08-Tub>GAL80^{ts}>dCBP^{RNAi}* eine nächtliche Temperaturabsenkung von 30°C auf 25°C eingerichtet, um einer Inaktivität vorzubeugen. Unabhängig des Temperaturschemas zeigt sich jedoch durch Analyse einer Treiberkontrolle (*R55G08-Tub>GAL80^{ts}/+*), dass eine andauernde Hitzeexposition von mindestens vier Tagen einen statistisch relevanten Abfall an initiierten Bein-über-Kopf-Suchschlägen verursacht (Abbildung 20B und D). Dies konnte auch kürzlich in einer Masterarbeit der AG Strauß bestätigt werden: Wurden erfahrene Fliegen einem Hitzestress von 30°C über 2 Nächte hinweg ausgesetzt, reduzierte dies deren Aktivität im Lückenüberwindungsparadigma beträchtlich (Bernhard, 2019). Dass die äußere Temperatur maßgeblich den Schlaf von Fliegen beeinträchtigt, ist aus der Literatur bekannt. So resultiert eine Temperaturerhöhung auf physiologisch warme 29°C über zwei bis drei Tage hinweg in einem erhöhten Tagesschlaf (Siesta) und reduziertem Nachtschlaf (Parisky et al., 2016). Der Tagesschlaf unterscheidet sich dabei jedoch in seiner Qualität vom Nachtschlaf und wird auch als leichter Schlaf bezeichnet. Mit dem Schlaf verändert sich auch die Aktivität der Fliegen. Bei genannten physiologischen Temperaturen ist das lokomotorische Verhalten der Fliegen unauffällig; erst bei Temperaturen von 30-31°C reagieren die Fliegen mit Immobilität. Steigt die Temperatur darüber hinaus auf ein gesundheitsschädliches Niveau an (über 30°C), reagieren die Fliegen mit Hyperaktivität, welche in einer Aktivitätsspitze am Nachmittag gipfelt (*afternoon activity peak, A Peak*) Diese TRP1-abhängige Steuerung der Aktivität unterliegt somit dem angewandten experimentellen Versuchsdesign (Roessingh und Stanewsky, 2017). Kommt es zum Schlafentzug, wird die synaptische Homöostase gestört und es kann zur Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktion führen (Helfrich-Förster, 2018).

Nach Auswertung der durchgeführten Experimente kann eine Rolle der Co-Aktivatoren im Körpergrößengedächtnis nachgewiesen werden. Es ist wahrscheinlich, dass eine mögliche Verschlechterung des Körpergrößengedächtnisses (mehr Kletterversuche) nach Induktion der RNAi überdeckt wird von der reduzierten Kletteraktivität nach Temperaturerhöhung. So zeigt ein Vergleich zwischen der Treiberkontrolle und dem Genotyp *R55G08-Tub>GAL80^{ts}>Crtc^{RNAi}*

keinen statistischen Unterschied zwischen den jeweiligen Versuchstagen (Abbildung 21A). Vergleicht man jedoch den Genotyp *R55G08-Tub>GAL80^{ts}>dCBP^{RNAi}* mit der entsprechenden Treiberkontrolle, ist auffällig, dass die Treiberkontrolle an Test Tag 4 und 7 deutlich absinkt mit den initiierten Kletterversuchen. Die experimentellen Tiere hingegen bleiben trotz des gleichen Temperaturregimes, nämlich der andauernden Temperaturerhöhung, mit ihren Kletterversuchen über die Tage hinweg konstant (Abbildung 21B). Ein statistischer Unterschied ergibt sich für alle Versuchstage. Das Ergebnis impliziert, dass die Induktion der RNAi nach der Gedächtnisbildung eine Auswirkung auf das Körpergrößengedächtnis während der Aufrechterhaltungsphase haben könnte. Um dCBP letztendlich eine Funktion in der Gedächtnisaufrechterhaltung zuschreiben zu können, bedarf es diesbezüglich jedoch der Analyse der UAS-Kontrolle, zum Ausschluss einer Leck-Expression. Zudem deutet der Unterschied an Test Tag 0 darauf hin, dass trotz des temperatursensitiven Repressors *Tub>GAL80^{ts}* die RNAi bei 17°C etwas induziert ist. So ist zu diesem Zeitpunkt eine nähere Spezifizierung zur Aktivität der CREB-Co-Aktivatoren in der Gedächtnisaufrechterhaltung unter Nutzung des temperatursensitiven Repressors *Tub>GAL80^{ts}* nicht möglich. Im Gegensatz zur Ungewissheit im Körpergrößengedächtnis, ist für das aversive olfaktorische Gedächtnis bereits bekannt, dass dCBP die Aktivität von dCREB2 spezifisch während der Bildung des Gedächtnisses steigert. 24 Stunden nach der Konditionierung hingegen wird die Funktion von dCBP von CRTC übernommen. CRTC stellt seine Funktion spätestens sieben Tage nach dem Training ein (späte Phase der Gedächtnisaufrechterhaltung), wenn auch dCREB2 nicht mehr benötigt wird (Hirano et al., 2016).

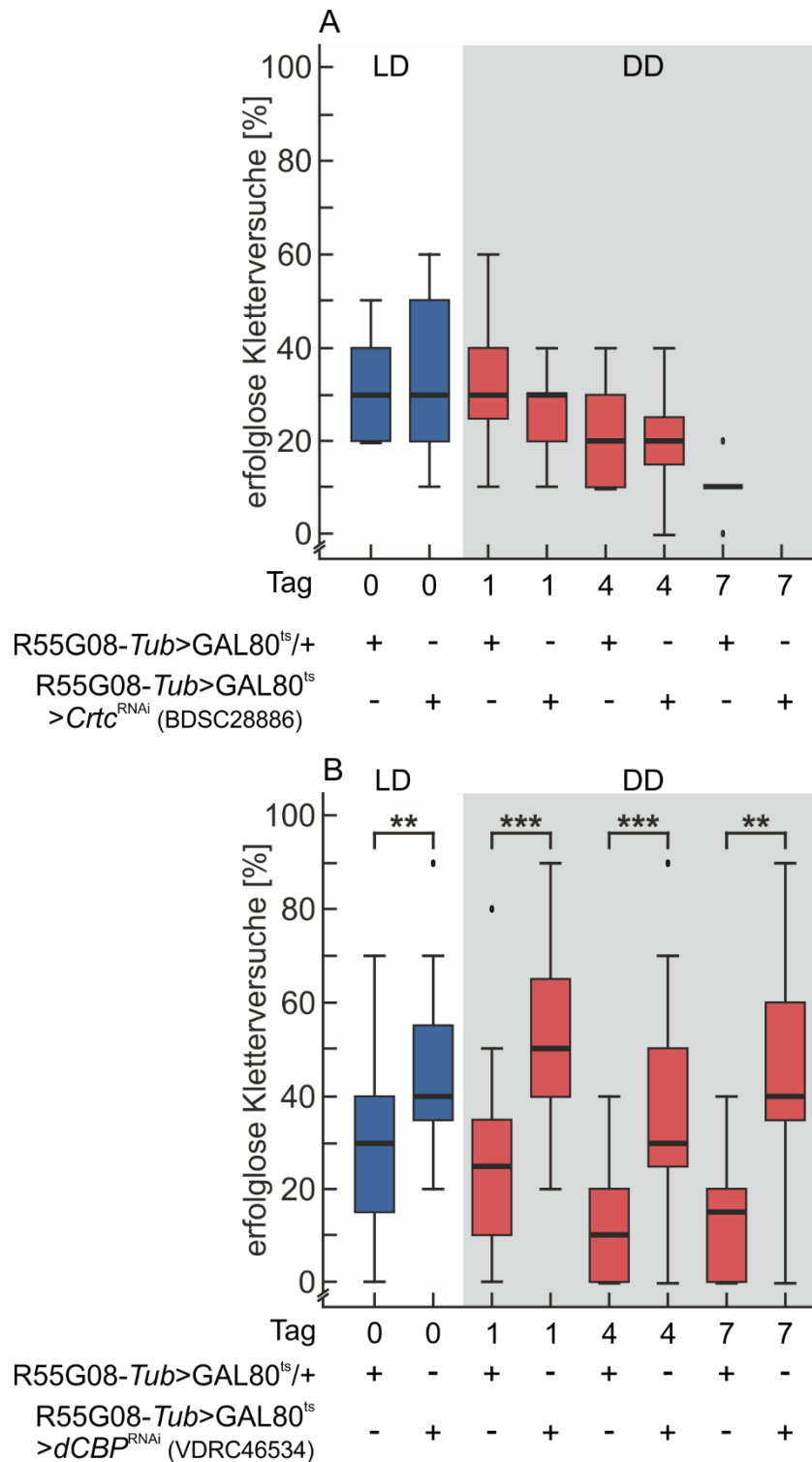


Abbildung 21: **Analyse der Funktion von dCBP und CRTC in der Gedächtnisaufrechterhaltung - Alternative Darstellung unter Berücksichtigung der Temperatur.**

(A) R55G08-*Tub>GAL80^{ts}>*Crtc*^{RNAi}: Paarvergleiche zwischen der experimentellen Gruppe und ihrer Treiberkontrolle an den jeweiligen Versuchstagen ergeben keine signifikanten Unterschiede.*

(B) R55G08-*Tub>GAL80^{ts}>*dCBP*^{RNAi}: Paarvergleiche zwischen der experimentellen Gruppe und ihrer Treiberkontrolle an den jeweiligen Versuchstagen ergeben signifikante Unterschiede. dCBP ist möglicherweise relevant für die Aufrechterhaltung des Körpergrößengedächtnisses.*

N und n siehe Abbildung 20. Die komplette Statistik ist der Tabelle 42 und der Tabelle 43 zu entnehmen. Nicht-

parametrische Median-Darstellung entsprechend Abbildung 9.

3.6 Epigenetische Mechanismen der Gedächtnisaufrechterhaltung

3.6.1 Screen epigenetischer Faktoren

Der dritte Themenkomplex dieser Arbeit zu den Aufrechterhaltungsprozessen des Körpergrößengedächtnisses in den $\Delta 7$ -Neuronen wurde mit der Analyse des Transkriptionsfaktors dCREB2 in Kapitel 3.4 eingeleitet. Es konnte gezeigt werden, dass dCREB2 sowohl während des Lernens, als auch während der frühen und späten Phase der Gedächtnisaufrechterhaltung aktiv ist. Angemerkt wurde bereits, dass sich das olfaktorische Gedächtnis dahingehend vom Körpergrößengedächtnis unterscheidet, dass in der späten Phase der Aufrechterhaltung keine Abhängigkeit von dCREB2 mehr besteht (Hirano et al., 2016). Die Arbeitsgruppe um Saito postulierte in ihrer Publikation distinkte Mechanismen der Transkriptions-Regulation für die Bildung und die Aufrechterhaltungs-Phasen des olfaktorischen Gedächtnisses. Dem zufolge besteht eine Abhängigkeit von dCREB2 und dCBP während der Gedächtnisbildung. In der frühen Phase der Aufrechterhaltung wird der Co-Aktivatoren gewechselt, sodass CRTC mit dCREB2 agiert (4-Tages Gedächtnis). Im Anschluss daran übernimmt der Transkriptionsfaktor Bx die regulatorische Funktion (7-Tages Gedächtnis). Auf Basis neuester Studien zu epigenetischen Transkriptions-Regulationen in Gedächtnisspeicherungsprozessen (siehe Kapitel 1.6) analysierte die japanische Arbeitsgruppe zudem die Funktion ausgewählter Histon Acetyltransferasen (Transkriptions-Förderer) in den Pilzkörpern. Ihrem Arbeitsmodell zufolge rekrutieren die Histon Acetyltransferasen Gcn5 und Tip60 während der frühen Gedächtnisaufrechterhaltung den Komplex dCREB2/CRTC zur Aktivierung der Genexpression der Transkriptionsfaktoren Bx (über Acetylierung von H3K9 in der Promotor-Region) und Smr (über Acetylierung von H4K16 in der Promotor-Region, jedoch CRTC-unabhängig). Für die späte Aufrechterhaltungs-Phase genügt die Funktion von Tip60 und Bx alleine (Hirano et al., 2016).

Gleichermaßen wird vermutet, dass eine dauerhafte Speicherung des Körpergrößenswissens über epigenetische Mechanismen erzielt werden kann; insbesondere, da das Körpergrößengedächtnis im Gegensatz zum olfaktorischen Gedächtnis langanhaltend, vermutlich lebenslang bestehen muss. Zur Analyse der aufgestellten These soll die Rolle epigenetischer Transkriptions-Regulatoren in den

$\Delta 7$ -Neuronen der Protozerebralbrücke untersucht werden. Die $\Delta 7$ -Neuronen wurden ausgewählt, da in diesen ein erhöhtes Level des sekundären Botenstoffs cAMP vorliegt, wodurch der Transkriptionsaktivator dCREB2 gezielt aktiviert werden kann; eine Voraussetzung zur Bildung des Langzeitgedächtnisses.

Bei der Auswahl der zu analysierenden epigenetischen Faktoren wurde auf eine publizierte Liste der Arbeitsgruppe um Yu zurückgegriffen (Kirilly et al., 2011). Die Autoren untersuchten in der zugehörigen Veröffentlichung die Rolle epigenetischer Faktoren in der Rückbildung von Axonen und Dendriten im Zentralnervensystem von *Drosophila* während der Metamorphose. Tabelle 7 umfasst die epigenetischen Kandidaten aus besagter Liste, deren Funktionen im Körpergrößengedächtnis untersucht wurden. Daneben wurde die Liste um weitere vielversprechende Kandidaten ergänzt.

Für die Analyse wurden die Faktoren über RNA-Interferenz in den $\Delta 7$ -Neuronen der PB (R55G08-GAL4) herunterreguliert; die *Knock-Down*-Fliegen wurden an der unüberwindbaren 5,0 mm breiten Lücke im Lückenüberwindungsparadigma getestet und mit der GAL4-Kontrolle verglichen. Hob sich die experimentelle Gruppe statistisch von der heterozygoten GAL4-Kontrolle ab (exzessives Kletterverhalten), wurde eine heterozygote UAS-Kontrolle durchgeführt. Unterschieden sich UAS-Kontrolle und *Knock-Down* nicht signifikant voneinander, liegt dies begründet in der Leck-Expression der UAS-Kontrolle (siehe 3.5); es kann somit nicht eindeutig bestimmt werden, wo im Gehirn der Fliege der epigenetische Faktor seine Funktion ausübt. Konnte aber ein $\Delta 7$ -spezifischer Phänotyp festgestellt werden (die experimentellen Tiere heben sich signifikant von den UAS-RNAi Kontrollen ab), war der entsprechende epigenetische Faktor Kandidat für weiterführende Analysen. Diese bestanden zum einen aus der Auswertung weiterer RNAi-Linien des identifizierten Kandidaten. Ferner wurden die visuellen und motorischen Fähigkeiten der Fliegen an der überwindbaren 3,5 mm breiten Lücke überprüft. Auch wurden die Beinlängen vermessen, um eine Korrelation zwischen den initiierten Suchschlägen an der 5,0 mm breiten Lücke und der tatsächlichen Körpergröße zu ziehen. Die Auswertung zur Kletterleistung an der 3,5 mm breiten Lücke und den Beinlängen ist dem Anhang zu entnehmen (siehe 9.6.2 und 9.6.3). Im Anschluss an die Auswertung der Verhaltenstests sollte erfasst werden, ob die

Induktion der RNAi über die komplette Entwicklung hinweg die Morphologie der Protozerebralbrücke beeinträchtigte. So ist eine intakte Protozerebralbrücke Voraussetzung für das Erlernen der Körpergröße. Zur Beantwortung dieser Frage wurde das Zellmuster der $\Delta 7$ -Neurone visualisiert über Expression von prä- (Synaptotagmin::eGFP) und postsynaptischen Markern (DenMark, magenta) (Nicolai et al., 2010). Über eine Zählung der Zellkörper und einen Vergleich mit der Kontrolle (R55G08>*DenSyt*) sollte dann überprüft werden, ob morphologische Entwicklungsdefekte, bzw. ein Verlust an Neuronen der PB durch die RNA-Interferenz verursacht wurden (siehe Anhang, 9.6.4, Abbildung 26).

Die epigenetischen Faktoren aus Tabelle 7 gehören vier verschiedenen Kategorien an: den Histon Acetyltransferasen (HATs), den Histon Deacetylasen (HDACs), den Histon Methyltransferasen, sowie verschiedenen *Chromatin Remodelling* Komplexen. Auf die Funktion der Histon Acetyltransferasen wurde bereits unter 1.6 eingegangen; sie zählen zu den Transkription-Förderern, indem sie die Chromatinstruktur auflockern. Gegensätzlich dazu sorgen Histon Deacetylasen für die Entfernung von Acetylresten von den Lysinresten der Histone. Eine Bindung zwischen dem daraufhin positiv geladenen Lysinrest des Histons und dem Phosphatrückgrad der DNA führt zur stärkeren Verpackung des Chromatins; die Transkription wird erschwert. Werden Histone wiederum von Methyltransferasen mono-, di-, oder trimethyliert, kann dies sowohl die Transkription fördern, als auch unterbinden; entscheidend ist hierbei die Position der Methylierung (Day und Sweatt, 2011). *Chromatin Remodelling* Komplexe haben generell die Aufgabe unter ATP-Hydrolyse den Verpackungsgrad des Chromatins zu modifizieren; Gen-Transkription, DNA Reparatur, Replikation und Rekombination werden so ermöglicht (Clapier und Cairns, 2009).

Über den Screen wurden insgesamt 79 Transgene für 61 Gene getestet. Davon traten bei drei Genen (*Gcn5*, *Gug*, *Hat1*) nach Kreuzung (R55G08>UAS-RNAi) bei den experimentellen Tieren massive motorische Defekte auf, sodass die Tiere nicht im Lückenüberwindungsparadigma getestet werden konnten. Die Defekte äußerten sich darin, dass die Fliegen nicht in der Lage waren, die Wand des Haltungsgefäßes zu erklimmen. Zudem fielen sie oft auf den Rücken und konnten sich danach nicht mehr aufrichten, sodass sie schnell verstarben. Von den insgesamt

61 Genen trat bei 22 Genen ein Kletterphänotyp (übermäßiges Kletterverhalten) für die heterozygote RNAi-Kontrolle auf (siehe unspezifischer Phänotyp, Tabelle 7). Bei RNA-Interferenz gegen elf Gene war die experimentelle Gruppe (R55G08>UAS-RNAi) signifikant schlechter, d.h. sie zeigten mehr Kletterinitiationen als die UAS-Kontrolle. Sie sind in Tabelle 7 fett markiert hervorgehoben. Bei diesen elf $\Delta 7$ -spezifischen Kandidaten handelt es sich um Mle, Msl-1, Msl-2, Mof, Pc, Pcl, Ptip, Set1, Sirt6, Tip60 und Top2. Diese experimentellen Fliegen wurden an der 3,5 mm Lücke auf ihre visuellen und motorischen Fähigkeiten geprüft – es konnten keine Einschränkungen festgestellt werden. Auch eine Körpergrößen-abhängige Betrachtung der initiierten Kletterinitiationen beeinflusste die Interpretation des exzessiven Verhaltens der *Knock-Down*-Tiere an der unüberwindbaren Lücke nicht negativ. Zudem zeigten alle Genotypen eine intakte Morphologie der $\Delta 7$ -Neurone für das Erlernen der Körpergröße, d.h. sie besaßen eine Anzahl von etwa 18-23 Zellkörpern pro Hemisphäre und sind damit von den Kontrolltieren (R55G08>*DenSyt*) nicht zu unterscheiden. Es ist anzumerken, dass laut Veröffentlichung von Franconville weniger, nämlich 16 Zellen pro Hemisphäre für den Treiber R55G08-GAL4 gezählt wurden (Franconville et al., 2018). Die Auswertung und Diskussion der Kontrollexperimente (Test an der 3,5 mm breiten Lücke, Beinlängenvergleich, immunhistochemische Färbung des $\Delta 7$ -Zellmusters) sind dem Anhang, den Kapiteln 9.6.2 - 9.6.4 zu entnehmen.

Einige der identifizierten Kandidaten sind Komponenten zweier bekannter Komplexe, die im Folgenden näher dargestellt werden sollen: die *Polycomb Group* (PcG) Proteine und der *Male Specific Lethal* Komplex (MSL Komplex).

Tabelle 7: Liste getesteter epigenetischer Faktoren.

Epigenetische Faktoren wurden über RNA-Interferenz in den $\Delta 7$ -Neuronen herunterreguliert. Das Körpergrößenwissen der *Knock-Down*-Fliegen wurde im Lückenüberwindungsparadigma an einer 5,0 mm Lücke abgefragt und mit der heterozygoten GAL4-Kontrolle verglichen. Sofern sich das Verhalten der Gruppen statistisch voneinander unterschied, wurde eine heterozygote UAS-Kontrolle durchgeführt. Ein $\Delta 7$ -spezifischer Phänotyp wurde verzeichnet, sofern sich die experimentellen Tiere im Verhalten statistisch von der UAS-Kontrolle abhoben (exzessives Kletterverhalten, fett markiert). Unterschieden sich diese nicht, können Verhalten und Region der Expression einander nicht eindeutig zugeordnet werden (unspezifisch). Die Beschreibung des Phänotyps „nein*“ bedeutet, dass sich die Daten der GAL4-Kontrolle und der *Knock-Down*-Fliegen statistisch voneinander unterschieden (*Art4*^{RNAi}: p=0,04, *enok*^{RNAi}: p=0,05, *Sin3A*^{RNAi}: p=0,04). Eine UAS-Kontrolle wurde dennoch nicht erhoben, da beim nachfolgenden Vergleich dreier Gruppen inkl. Korrekturverfahren der signifikante Unterschied mathematisch herausgerechnet werden würde.

Verzeichnet wurden die Bestandsnummer, der Genname (Abk./vollständig), die biochemische Funktion des Faktors nach Flybase (Thurmond et al., 2018) und der Phänotyp. Die statistische Auswertung ist in den entsprechenden Tabellen des Abschnittes 9.6 im Anhang zu finden.

Bestandsnummer	Genname [Abk.]	Genname [vollständig]	Biochemische Funktion nach Flybase	Phänotyp	Statistik
BDSC #31347	<i>Ada2b</i>	<i>transcriptional Adaptor 2b</i>	<i>Chromatin Remodeling</i> -Aktivität, trägt zur Histon Acetylierung bei	nein	Tabelle 44
BDSC #28905	<i>Ada3</i>	<i>transcriptional Adaptor 3</i>	<i>Chromatin Remodeling</i> -Aktivität, trägt zur Histon Acetylierung bei	unspezifisch	Tabelle 45
BDSC #32451				unspezifisch	Tabelle 46
BDSC #31348	<i>Art1</i>	<i>Arginine methyltransferase 1</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität	nein	Tabelle 47
BDSC #31349	<i>Art4</i>	<i>Arginine methyltransferase 4</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität	nein*	Tabelle 48
BDSC #31050	<i>ash1</i>	<i>absent, small, or homeotic discs 1</i>	Histon Methyltransferasae-Aktivität, Bindung von Histon Acetyltransferasen	nein	Tabelle 49
BDSC #35388	<i>ash2</i>	<i>absent, small, or homeotic discs 2</i>	DNA- und Protein-Bindung, trägt zur Histon Methylierung bei (H3K4), Komponente der Trithorax Gruppen-Proteine	nein	Tabelle 50
BDSC #31048	<i>Bin1</i>	<i>Bicoid interacting protein 1</i>	Protein-Bindung, Rekrutierung des Sin3A/Rpd3-Histon Deacetylierungs-Komplexes	nein	Tabelle 51
BDSC #28918	<i>Caf1-180</i>	<i>Chromatin assembly factor 1, p180 subunit</i>	Histon-Chaperon, trägt zum Zusammenbau von Histonen und DNA bei	nein	Tabelle 52
BDSC #34925	<i>CG1894</i>		Histon Acetyltransferase-Aktivität (H4K16)	nein	Tabelle 53
BDSC #34665	<i>Chd1</i>	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1</i>	<i>Chromatin Remodeling</i> -Aktivität, Helikase-Aktivität	nein	Tabelle 54

BDSC #27027	<i>chm</i>	<i>chameau</i>	Histon Acetyltransferase-Aktivität (H3/H4)	unspezifisch	Tabelle 55
BDSC #32484				unspezifisch	Tabelle 56
BDSC #51155	<i>Chrac-16</i>	<i>Chromatin accessibility complex 16kD protein</i>	<i>Chromatin Remodeling</i> -Aktivität	nein	Tabelle 57
BDSC #31352	<i>egg</i>	<i>eggless</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K9)	nein	Tabelle 58
BDSC #29518	<i>enok</i>	<i>enoki mushroom</i>	Histon Acetyltransferase-Aktivität (H3/H4)	nein*	Tabelle 59
BDSC #40917				nein	Tabelle 60
BDSC #31618	<i>esc</i>	<i>extra sexcombs</i>	Enzym-Aktivator-Aktivität, trägt als Komponente des Polycomb Repressor Komplexes 2 (PRC2) zur Methylierung von Histonen bei (H3K27/H3K9)	nein	Tabelle 61
BDSC #31617	<i>E(z)</i>	<i>Enhancer of zeste</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K27/H3K9), Komponente des PRC2	unspezifisch	Tabelle 62
BDSC #31630	<i>G9a</i>		Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K9)	unspezifisch	Tabelle 63
BDSC #33981	<i>Gcn5</i>		Histon Acetyltransferase-Aktivität (H3/H4)	motorischer Defekt	nicht testbar
BDSC #31327	<i>gpp</i>	<i>grappa</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K79)	nein	Tabelle 64
BDSC #32961	<i>Gug</i>	<i>Grunge</i>	Histon Deacetylase-Aktivität	motorischer Defekt	nicht testbar
BDSC #34730	<i>Hat1</i>	<i>Histon Acetyltransferase 1</i>	Histon Acetyltransferase-Aktivität (H4)	motorischer Defekt	nicht testbar
BDSC #31616	<i>HDAC1</i>	<i>Histone deacetylase 1</i>	Histon Deacetylase-Aktivität	nein	Tabelle 65
BDSC #31633	<i>HDAC3</i>	<i>Histone deacetylase 3</i>	Histon Deacetylase-Aktivität (H3/H4)	nein	Tabelle 66
BDSC #28549	<i>HDAC4</i>	<i>Histone deacetylase 4</i>	Histon Deacetylase-Aktivität	nein	Tabelle 67
BDSC #31053	<i>HDAC6</i>	<i>Histone deacetylase 6</i>	Histon Deacetylase-Aktivität	nein	Tabelle 68
BDSC #32480	<i>HDAC11</i>	<i>Histone deacetylase 11</i>	Histon Deacetylase-Aktivität	nein	Tabelle 69
BDSC #34908	<i>kis</i>	<i>kismet</i>	ATPase-Aktivität, Helikase-Aktivität, trägt zum <i>Chromatin Remodeling</i> bei	nein	Tabelle 70
BDSC #28944	<i>lid</i>	<i>little imaginal discs</i>	Histon Demethylase-Aktivität (H3K4/H4R3), trägt zur Histon Acetylierung bei	nein	Tabelle 71
BDSC #35470	<i>LKRSDH</i>	<i>Lysine ketoglutarate reducta-se/saccharopine dehydrogenase</i>	Oxidoreduktase-Aktivität, Regulation der Histon-Methylierung	nein	Tabelle 72

BDSC #34864	<i>mle</i>	<i>maleless</i>	Helikase-Aktivität, Komponente des <i>Male Specific Lethal</i> Komplexes (MSL Komplex)	$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 73
BDSC #33698	<i>mof</i>	<i>males absent on the first</i>	Histon Acetyltransferase-Aktivität (H4K16), Komponente des MSL Komplexes	$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 74
BDSC #36870				$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 75
BDSC #58281				$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 76
BDSC #31401				unspezifisch	Tabelle 77
BDSC #39012	<i>msl-1</i>	<i>male-specific lethal 1</i>	DNA-, Chromatin-, Protein-Bindung, Komponente des MSL Komplexes	$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 78
BDSC #35272	<i>msl-3</i>	<i>male-specific lethal 3</i>	Bindung von DNA und methylierter Histone, Komponente des MSL Komplexes	$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 79
BDSC #34033	<i>NSD</i>	<i>Nuclear receptor binding SET domain protein</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K36)	unspezifisch	Tabelle 80
BDSC #31110	<i>Pc</i>	<i>Polycomb</i>	DNA-, Chromatin, Histon-Bindung (methyliert), Komponente des PRC1	$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 81
BDSC #33964				unspezifisch	Tabelle 82
BDSC #31189	<i>Pcl</i>	<i>Polycomblike</i>	DNA-, Chromatin-, Protein-Bindung, Transkriptions-faktor-Aktivität, Komponente des Esc/E(z)-Komplexes mit Methyltransferase-Aktivität, Komponente der Polycomb Gruppen-Proteine	$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 83
BDSC #33945				unspezifisch	Tabelle 84
BDSC #31609	<i>pho</i>	<i>pleiohomeotic</i>	DNA-, Chromatin-, Protein-Bindung, Komponente des Pho Repressor Komplexes, Rekrutierung der PRC	nein	Tabelle 85
BDSC #35322	<i>PR-Set7</i>	<i>PR/SET domain containing protein 7</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität (H4K20)	unspezifisch	Tabelle 86
BDSC #67346				unspezifisch	Tabelle 87
BDSC #31611	<i>Psc</i>	<i>Posterior sex combs</i>	DNA-, Chromatin-Bindung, Komponente der RING-assoziierten Faktoren, Ubiquitinierung von H2AK119, Komponente der Polycomb Gruppen-Proteine	nein	Tabelle 88
BDSC #35269	<i>Ptip</i>	<i>PAX transcription activation domain interacting protein</i>	Trägt zur Methylierung von Histon H3K4 bei	unspezifisch	Tabelle 89
BDSC #31741				$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 90
BDSC #31718	<i>Rtf1</i>	<i>Rtf1</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K4)	nein	Tabelle 91

BDSC #33974	<i>RYBP</i>	<i>Ring and YY1 Binding Protein</i>	DNA-Bindung, involviert in Ubiquitinierungs-Prozesse, interagiert mit der Proteinen der Polycomb- und Trithorax-Gruppe	unspezifisch	Tabelle 92
BDSC #31612	<i>Sce</i>	<i>Sex combs extra</i>	Protein-Bindung, Komponente der RING-assoziierten Faktoren, Ubiquitinierung von H2AK119, Komponente der Polycomb Gruppen-Proteine	nein	Tabelle 93
BDSC #31614	<i>Scm</i>	<i>Sex comb on midleg</i>	Protein-Bindung, Bindet den PRC1	nein	Tabelle 94
BDSC #33704	Set1	SET domain containing 1	Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K4)	$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 95
VDR #10833				$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 96
BDSC #40931				unspezifisch	Tabelle 97
BDSC #31355	<i>Set2</i>	<i>SET domain containing 2</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K36)	nein	Tabelle 98
BDSC #28677	<i>Sfmbt</i>	<i>Scm-related gene containing four mbt domains</i>	Protein-, Chromatin-, Histon-Bindung (methyliert), Komponente des Pho Repressor Komplexes, Rekrutierung der PRC	unspezifisch	Tabelle 99
BDSC #32368	<i>Sin3A</i>		Coregulatorische Aktivität der Transkription, trägt zur Histon Deacetylierung bei	nein*	Tabelle 100
BDSC #32481	<i>Sirt1</i>	<i>Sirtuin 1</i>	Histon Deacetylase-Aktivität	unspezifisch	Tabelle 101
BDSC #53697				nein	Tabelle 102
BDSC #31613	<i>Sirt2</i>	<i>Sirtuin 2</i>	Histon Deacetylase-Aktivität	unspezifisch	Tabelle 103
BDSC #36868				unspezifisch	Tabelle 104
BDSC #31638	<i>Sirt4</i>	<i>Sirtuin 4</i>	Histon Deacetylase-Aktivität	nein	Tabelle 105
BDSC #31399	Sirt6	Sirtuin 6	Histon Deacetylase-Aktivität	unspezifisch	Tabelle 106
BDSC #34530				$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 107
BDSC #31093	<i>Sirt7</i>	<i>Sirtuin 7</i>	NAD ⁺ -Bindung, gehört zur Familie der Sirtuine (Histon Deacetylase-Aktivität)	nein	Tabelle 108
BDSC #33400	<i>Su(var)205</i>	<i>Suppressor of variegation 205</i>	Chromatin- und Protein-Bindung, Komponente des Heterochromatins	unspezifisch	Tabelle 109
BDSC #31191	<i>Su(z)12</i>	<i>Suppressor of zeste 12</i>	Protein-, Chromatin-, DNA-Bindung, Komponente des PRC 2 mit Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K27me3)	unspezifisch	Tabelle 110

BDSC #35243	Tip60	Tat interactive protein 60kDa	Histon Acetyltransferase-Aktivität	unspezifisch	Tabelle 111
BDSC #28563				$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 112
BDSC #35416	Top2	Topoisomerase 2	DNA Topoisomerase-Aktivität: DNA Replikation, Transkription, Rekombination, Reparatur und <i>Chromatin Remodeling</i>	unspezifisch	Tabelle 113
BDSC #31342				$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 114
BDSC #31637	<i>tou</i>	<i>toutatis</i>	DNA-, Protein-, Transkriptionsfaktor-Bindung, trägt zum <i>Chromatin Remodeling</i> bei	nein	Tabelle 115
BDSC #29563	<i>trr</i>	<i>trithorax-related</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K4)	nein	Tabelle 116
BDSC #31092	<i>trx</i>	<i>trithorax</i>	Histon Methyltransferase-Aktivität (H3K4)	unspezifisch	Tabelle 117
BDSC #31938	YL-1		Histon Acetyltransferase-Aktivität	nein	Tabelle 118
NIG-FLY #4621R-2				unspezifisch	Tabelle 119

3.6.2 PcG Proteine

Während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* wird die Identität der einzelnen Körpersegmente entlang der anteroposterioren Körperachse final über die Hox-Gene festgelegt. Damit die Aufrechterhaltung der segmentalen Identitäten auch bis zum adulten Stadium garantiert ist, wird die Aktivität der *Polycomb Group* (PcG) Proteine, sowie der *Trithorax Group* (TrxG) Proteine benötigt. Während die TrxG Proteine über vielfältige Mechanismen für eine positive Regulation der Hox Gene sorgen, regulieren PcG Proteine die Genexpression der Hox Gene über epigenetische Stilllegung. PcG Proteine agieren in mehreren Komplexen mit unterschiedlichen Funktionen: dem *Polycomb Repressor* Komplex (PRC) 1, dem PRC 2, der Polycomb repressiven Deubiquitinase (PR-Dub), den dRING-assoziierten Faktoren (dRAF), sowie dem Pho repressiven Komplex (PhoRC). Durch intensive Forschung über die letzten zwei Jahrzehnte hinweg konnte ein frühes Modell der PRC-Funktion und Rekrutierung vervollständigt, zum Teil auch revidiert werden. Die neusten Forschungsergebnisse sollen nachfolgend kurz dargestellt werden (Dorafshan et al., 2017; Kassis et al., 2017).

Der PRC 1 besteht aus den vier Komponenten Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Posterior sex combs (Psc) und Sex combs extra (Sce). Pc besitzt eine Chromo-Domäne, mit der es methylierte Histone, insbesondere H3K27me3 (siehe PRC2), binden kann. Ph wiederum enthält eine Protein-Interaktions-Domäne, deren Mutation zum Verlust der repressiven Aktivität des PRC1 führt. Psc und Sce agieren sowohl im PRC1, also auch zusammen mit der Lysine (K)-specific demethylase 2 (Kdm2) im dRAF-Komplex. Psc inhibiert dabei eine Umorganisation des Chromatins und sorgt für eine intensive Verpackung dessen. Sce ist in der Lage den Lysinrest 118 des Histons H2A zu ubiquitinieren, eine Eigenschaft die im frühen Modell der PRC-Funktion als essentiell für die Repression galt. Nach neusten Erkenntnissen ist dies nicht der Fall, zumal der PR-DUB eine Deubiquitinierung dieses Lysinrestes ausführen kann (siehe PR-DUB). Der PRC2 umfasst die Komponenten Enhancer of zeste (E(z)), Extra sex combs (Esc), Suppressor of zeste 12 (Su(z)12) und Chromatin assembly factor 1, p55 subunit (Caf1-55). Die Hauptaufgabe des PRC2 ist die Trimethylierung des Lysins 27 des Histon 3 (H3K27me3). Diese wird vermittelt über die enzymatische Aktivität von E(z), bedarf aber der zwingenden Unterstützung durch die Faktoren Esc und Su(z)12. *In vitro* Versuche konnten für Caf1-55 bislang keine Funktion in der Methylierung nachweisen. Den PRC2-assoziierten Faktoren

Jing und Jarid2 (Säuger-Homolog: Aebp2) wird in Vertebraten eine PRC2-stabilisierende Funktion zugesprochen; für *Drosophila* ist bislang keine Funktion bekannt. Zu Polycomblike (Pcl) wird spekuliert, dass es entweder die Methyltransferase-Aktivität des PRC2 stimuliert oder für die Rekrutierung von PRC2 zuständig ist. Darüber hinaus wird Sex comb on midleg (Scm) eine zentrale Rolle in der Repression der Hox Gene zugesprochen. Der Faktor ist in der Lage monomethylierte Lysinreste, den PRC1, den PRC2, als auch den PhoRC zu binden und damit die Komplexe miteinander zu verbinden. Die Komponenten Additional sex combs (Asx) und Calypso des PR-DUB sorgen gemeinschaftlich für die Deubiquitinierung von Lysin 119 und Lysin 118 des Histons 2A. Der PhoRC besitzt mit Pleiohomeotic (Pho) eine Komponente mit DNA-bindender Domäne und sorgt über direkte und indirekte Interaktion mit PRC1 für dessen Rekrutierung zur DNA. Generell ist man sich einig, dass die PcG-Komplexe mit Hilfe von DNA-bindenden Proteinen an ihre sogenannten *Polycomb Resonance Elements* (PREs) binden. Dort werden die Komplexe über verschiedene Protein-Interaktionen stabilisiert und an ihre Zielgene rekrutiert. Für eine erfolgreiche Repression der Hox Gene ist die Trimethylierung von H3K27 entscheidend (Kassis et al., 2017).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass PcG Proteine entsprechend ihrer Funktion in der Embryonalentwicklung auch für Gedächtnis-Aufrechterhaltungsprozesse relevant sein könnten. Beispielsweise könnten die Komponenten dafür sorgen, dass Gene, die während des naiven Zustandes oder während des Lernens genutzt wurden, bei der Beibehaltung des Gedächtnisses stillgelegt werden, um weitere plastische Veränderungen zu verhindern. So könnten im Sinne einer dynamischen Transkriptions-Regulation während der Aufrechterhaltungsphase die Expression anderer, synaptischer Gene gezielt gefördert werden. Dafür spricht eine kontinuierliche Abhängigkeit vom Transkriptionsaktivator dCREB2 (siehe 3.4).

Um herauszufinden, ob Proteine der PcG bei der Bildung/Aufrechterhaltung des Körpergrößengedächtnisses eine Rolle spielen, wurden einige der Komponenten in den $\Delta 7$ -Neuronen der PB herunterreguliert (Tabelle 7). In Tabelle 8 werden sie ihren jeweiligen Komplexen zugeordnet, inkl. Angabe des hervorgerufenen Verhaltensphänotyps. Darüber hinaus ist in Abbildung 22 das Kletterverhalten der analysierten PcG Komponenten dargestellt (A-B: Genotypen mit $\Delta 7$ -spezifischem

Phänotyp, C-F: Genotypen mit unspezifischem Phänotyp, G-K: Genotypen ohne Phänotyp).

Tabelle 8: **Übersicht zu den PcG Komplexen**, inkl. Zuordnung der Komplex-Komponenten und Angabe des Phänotyps nach *Knock-Down* der jeweiligen Komponenten in den $\Delta 7$ -Neuronen der PB bei Test an einer 5,0 mm Lücke im Lückenüberwindungsparadigma (siehe Tabelle 7). Die statistische Auswertung ist den angegebenen Tabellen zu entnehmen.

Komplex	Komponente	Phänotyp im Lückenüberwindungsparadigma	Statistik
PRC1	Pc	$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 81
	Ph	<i>nicht getestet</i>	
	Psc/ Su(z)2	nein	Tabelle 88
	Sce	nein	Tabelle 93
PRC2	Su(z)12	unspezifisch	Tabelle 110
	E(z)	unspezifisch	Tabelle 62
	Caf1-55	<i>nicht getestet</i>	
	Esc	nein	Tabelle 61
PRC2-assozierte Faktoren	Pcl	$\Delta 7$ -spezifisch	Tabelle 83
	Jing	<i>nicht getestet</i>	
	Jarid2	<i>nicht getestet</i>	
dRAF	Psc/ Su(z)2	s.o.	Tabelle 88
	Sce	s.o.	Tabelle 93
	Kdm2	<i>nicht getestet</i>	
PhoRC	Sfmbt	unspezifisch	Tabelle 99
	Pho/ Phol	nein	Tabelle 85
PR-DUB	Asx	<i>nicht getestet</i>	
	Calypso	<i>nicht getestet</i>	
Scm		nein	Tabelle 94
RYBP		unspezifisch	Tabelle 92

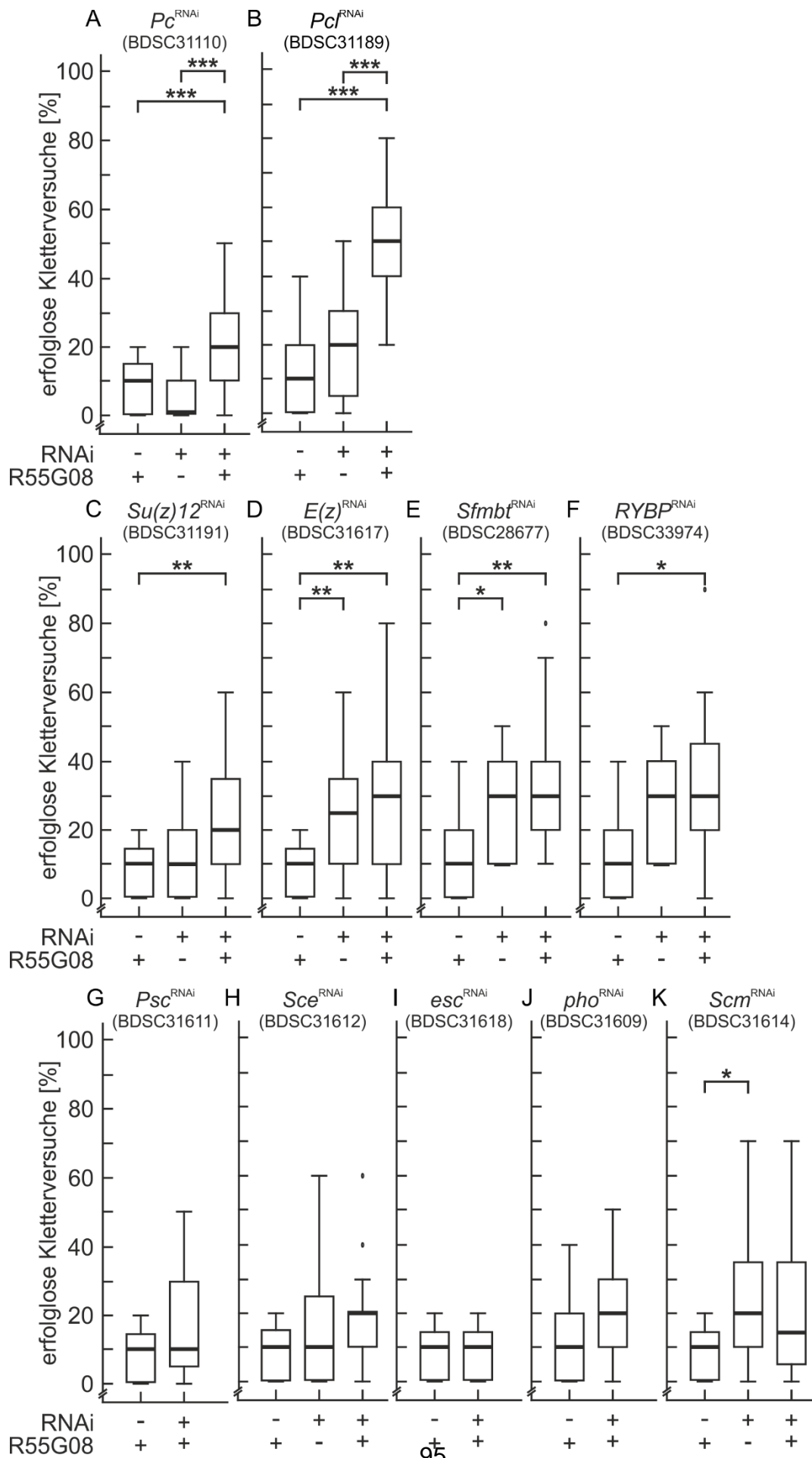


Abbildung 22: **Erfolgreiche Kletterversuche der PcG-Mitglieder nach *Knock-Down* in den $\Delta 7$ -Neuronen der PB.**

(A-B) Die Reduktion von *Pc* (BDSC 31110) und *Pcl* (BDSC 31189) in den $\Delta 7$ -Neuronen verhindert die Bildung eines Körpergrößengedächtnisses.

(C-F) Die Genotypen R55G08>*Su(z)12*^{RNAi} (BDSC 31191), R55G08>*E(z)*^{RNAi} (BDSC 31617), R55G08>*Sfmbt*^{RNAi} (BDSC 28677) und R55G08>*RYBF*^{RNAi} (BDSC 33974) verhalten sich nicht unterschiedlich zu ihren UAS-Kontrollen.

(G-K) Die Herunterregulierung der Konstrukte *Psc*-RNAi (BDSC 31611), *Sce*-RNAi (BDSC 31612), *esc*-RNAi (BDSC 31618), *pho*-RNAi (BDSC 31609) und *Scm*-RNAi (BDSC 31614) bewirkt keinen Defekt in der Gedächtnisbildung.

5,0 mm Lücke, N = 20 pro Gruppe, n = 10. Die statistische Auswertung ist im Anhang, 9.6.1, zu finden. Nicht-parametrische Median-Darstellung entsprechend Abbildung 9.

Von den elf getesteten PcG Faktoren zeigen zwei einen $\Delta 7$ -spezifischen (A-B), vier einen unspezifischen (C-F) und fünf keinen Phänotyp (G-K). Eine Funktion der PcG Proteine in der Gedächtnisformierung (Bildung oder Aufrechterhaltung ist bislang nicht zu unterscheiden) scheint demnach wahrscheinlich, eine weiterführende Untersuchung der Faktoren lohnenswert (siehe Kapitel 4.4, GeneSwitch). Aus der Literatur ist bisweilen noch keine Funktion der PcG Proteine in Bildungs- bzw. Aufrechterhaltungsprozessen von Langzeitgedächtnissen bekannt. Jedoch belegt eine neuste Studie eine entwicklungsunabhängige Funktion für Proteine der Pc-Gruppe. Die Arbeitsgruppe um Liu konnte für Muskelgewebe und für das Gehirn von *Drosophila* nachweisen, dass mit dem Alter die Trimethylierung von H3K27 zunimmt (vorgenommen über den PRC2), was zu einer Reduktion der Lebensdauer führt. Grundlage dafür ist die transkriptionale Herunterregulierung glykolytischer Gene. Dieser wird entgegengewirkt, sofern Komponenten des PRC2 Komplexes heterozygot mutiert vorliegen, die Trimethylierung nimmt ab und die Lebensdauer erhöht sich dadurch (Ma et al., 2018).

3.6.3 MSL-Komplex

Im Gegensatz zu Weibchen (XX), besitzen hemizygoter *Drosophila* Männchen kein homologes Paar an Geschlechtschromosomen (XY). Damit bei Männchen dennoch eine ausreichende Genexpression X-chromosomaler Gene garantiert ist, greifen diese auf den Mechanismus der Dosiskompensation zurück. Dabei wird die Transkription des männlichen X-Chromosoms durch die Aktivität des MSL-Komplexes um etwa das Doppelte gesteigert. Der MSL-Komplex besteht aus fünf Proteinen, Maleless (Mle), Males Absent on the First (Mof), Male-Specific Lethal (Msl)-1, MSL-2, und MSL-3, und zwei nicht-kodierenden RNA, rna on X (roX)1 und

roX2. Für die Initiation der Dosiskompensation fügen sich die einzelnen Komponenten an den sogenannte *High Affinity Sites* (HASs), die auch als *Chromatin Entry Sites* (CESs) bezeichnet werden, zum MSL-Komplex zusammen. Der Kern-Komplex besteht zunächst aus einem Oktamer (je zwei der Komponenten Msl-1, Msl-2, Msl-3 und Mof). Der Einbau von roX1 und 2 wird katalysiert über die RNA Helikase-Aktivität von Mle. Für die Bindung an die HATs/CES wird die Aktivität von Msl-2, Co-Faktoren, roX1 und roX2 diskutiert (Keller und Akhtar, 2015; Vensko und Stone, 2015). Ausgehend von den HATs/CESs ist der Komplex in der Lage aktiv transkribierte Regionen zu erkennen, sich nachfolgend über das gesamte X-Chromosom auszubreiten und die Transkription dieser Gene heraufzuregulieren. Aktiv transkribierte Regionen können über Trimethylierung von Lysinrest 36 an Histon 3 (H3K36me3) gekennzeichnet sein, welche durch die Komponente Msl-3 erkannt wird. Die Heraufregulierung der Genexpression der aktiv transkribierten Regionen erfolgt über die Histon Acetyltransferase-Aktivität von Mof an Lysinrest 16 des Histons 4 (H4K16). Einer mehr als zweifachen Erhöhung der Transkriptionsrate kann durch die Ubiquitin Ligase-Funktion der Komponente Msl-2 vorgebeugt werden. Ubiquitiniert diese die Komponente Msl-1, kommt es zur proteosomalen Degradation und damit zur Beendigung der Transkriptionserhöhung (Keller und Akhtar, 2015). Diese direkte Art der Dosiskompensation ist dominierend in der Literatur zu finden (Keller und Akhtar, 2015; Schunter et al., 2017), eine indirekte Regulation der Dosiskompensation über den MSL-Komplex wurde 2013 (Sun et al., 2013) postuliert und bedarf weiterer Aufklärung.

In der Einleitung wurde ausführlich darauf eingegangen, dass das Erlernen der Körpergröße einer aktiven cAMP/PKA/dCREB2-Signalkaskade in den $\Delta 7$ -Neuronen bedarf. Es ist bekannt, dass die Gene *rutabaga* (AC), *dunce* (PDE) und *dCREB2* auf dem X-Chromosom lokalisiert sind (Thurmond et al., 2018). Wie im vorherigen Absatz geschildert, hat Mof als Histon Acetyltransferase die Aufgabe, die Transkription X-chromosomaler Gene von *Drosophila* Männchen heraufzuregulieren. Der epigenetische Faktor Mof wurde im Zuge des Screens (Tabelle 7) als Kandidat für einen Regulator des Körpergrößengedächtnisses ($\Delta 7$ -spezifischer Phänotyp) identifiziert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass in $R55G08 > mof^{RNAi}$ -Männchen X-chromosomale Gene für das Lernen nicht ausreichend transkribiert werden. Zur Untermauerung dieser Aussage, wurden weitere Komponenten des MSL-Komplexes über RNA-Interferenz in den $\Delta 7$ -Neuronen herunterreguliert. Äquivalent dazu wurden

Weibchen mit reduzierten Leveln der MSL-Komponenten in den $\Delta 7$ -Neuronen am Lückenüberwindungsparadigma getestet.

Abbildung 23A-D ist zu entnehmen, dass bei *Knock-Down* der MSL-Komplex Komponenten *mof*, *mle*, *msh-1* und *msh-3* in *Drosophila*-Männchen ein $\Delta 7$ -spezifischer Phänotyp auftritt, mit erfolglosen Kletterinitiationen von jeweils 50%, 40%, 20% und 40%. Dies ist mit Ausnahme von Msh-3 bei den Weibchen nicht zu detektieren (Abbildung 23E-H). Die *Knock-Down*-Fliegen verhalten sich nicht unterschiedlich zu ihren GAL4- (E) oder UAS-Kontrollen (F, G). Dass die Kletterinitiationen der Weibchen tendenziell leicht erhöht ausfallen liegt darin begründet, dass Weibchen im Vergleich zu Männchen generell eine leicht vergrößerte Körpergröße besitzen und damit mehr Kletterinitiationen wagen. Zu Msh-3 schreiben Keller und Akhtar in ihrer Studie, dass, sofern H4K16 nicht acetyliert vorliegt, Msh-3 einen Komplex mit der DNA und monomethyliertem Lysin 20 des Histons 4 (H4K20me) eingehen kann. Sie stellen in Aussicht, dass Msh-3 mit dieser Eigenschaft ausserhalb des MSL-Komplexes eine zusätzliche Funktion ausüben könnte. Näheres dazu ist jedoch nicht bekannt (Keller und Akhtar, 2015). Männchen und Weibchen des Genotyps $R55G08 > msh-2^{RNAi}$ wurden nicht getestet und miteinander verglichen, da für *Drosophila*-Weibchen bekannt ist, dass die Translation der *msh-2*-mRNA natürlicherweise unterbunden wird (Keller und Akhtar, 2015). Darüber hinaus muss erwähnt werden, dass Mof auch außerhalb der Dosiskompensation agiert. Es ist bekannt, dass die HAT gemeinschaftlich mit dem sogenannten *Nonspecific Lethal* (NSL)-Komplex für eine Genom-weite (Autosomen und Gonosomen betreffende) Aktivierung der Transkription von Haushaltsgenen des Zellkerns und mitochondrialer Gene in Männchen, sowie Weibchen sorgt (Raja et al., 2010; Schunter et al., 2017). Ein $\Delta 7$ -spezifischer Phänotyp wurde für die Weibchen jedoch nicht festgestellt. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Ergebnisse aus Abbildung 23 die These stützen, dass die Männchen durch den *Knock-Down* der Komplex-Komponenten nicht ausreichend Genprodukte X-chromosomaler Gene produzieren können, um ihre Körpergröße erlernen zu können.

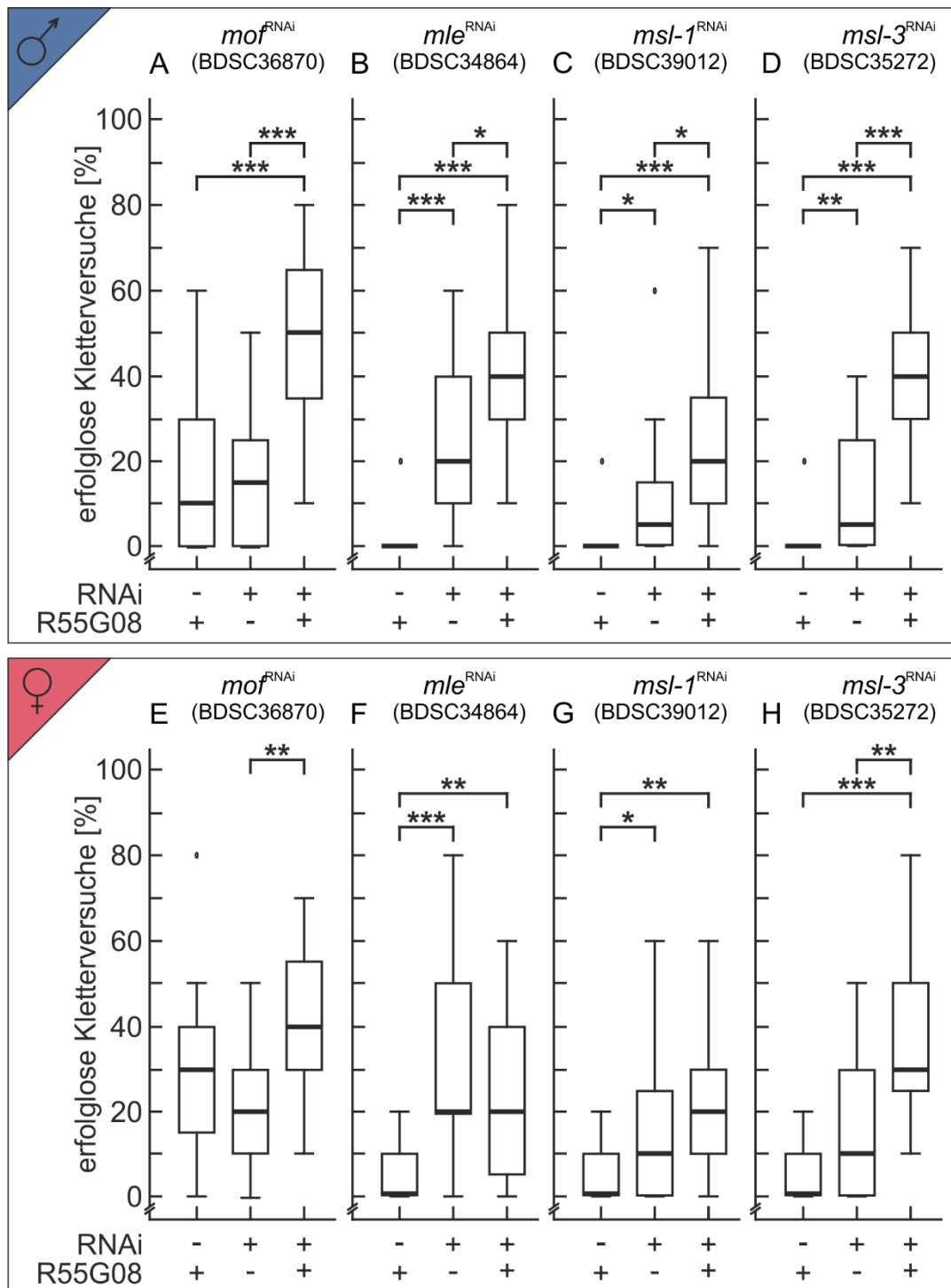


Abbildung 23: **Knock-Down der Komponenten des MSL-Komplexes** in den $\Delta 7$ -Neuronen, aufgetrennt nach Männchen und Weibchen.

(A-D) Die Herunterregulierung der Konstrukte *mor*^{RNAi} (BDSC 36870), *mle*^{RNAi} (BDSC 34864), *msl-1*^{RNAi} (BDSC 39012) und *msl-3*^{RNAi} (BDSC 35272) in den $\Delta 7$ -Neuronen führt zu einem $\Delta 7$ -spezifischen Defekt in der Gedächtnisbildung. Es wurden ausschließlich Männchen getestet.

(E-H) Die Weibchen der Genotypen R55G08>*mor*^{RNAi} (BDSC 36870), R55G08>*mle*^{RNAi} (BDSC 34864), R55G08>*msl-1*^{RNAi} (BDSC 39012), und R55G08>*msl-3*^{RNAi} (BDSC 35272) verhalten sich nicht unterschiedlich zu ihren GAL4- (E), bzw. UAS-Kontrollen (F-H).

N = 20 für jede Gruppe, n = 10. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. Die statistische Auswertung ist im Anhang, 9.6.1 und 9.6.5, zu finden. Nicht-parametrische Mediantdarstellung entsprechend Abbildung 9.

Die Aussage, dass bei R55G08>*mof*^{RNAi}-Männchen die X-chromosomalen Genprodukte nicht für die Phase des Lernens ausreichen, soll mit dem nachfolgenden spatio-temporalen Experiment gestützt werden. Parallel dazu kann mit diesem Versuch beurteilt werden, ob das exzessive Kletterverhalten Ursache eines Entwicklungsdefektes ist. Dazu werden die in 2.4A und B beschriebenen Protokolle angewandt. Protokoll A dient als Kontrolle; naive und nicht-induzierte (Dunkelaufzucht bei 17°C) Männchen des Genotyps R55G08-*Tub*>GAL80^{ts}>*mof*^{RNAi}, werden an Test Tag 0 initial getestet (50% erfolglose Kletterversuche) und in einem optimalen Streifenzyylinder für 20 Minuten trainiert (Abbildung 24A). Nach 24 Stunden (Tag 1) üben diese Kontroll-Fliegen mit 30% signifikant weniger Kletterinitiationen an der 5,5 mm breiten Lücke aus als zum vorherigen Test. Ein intaktes Körpergrößengedächtnis konnte ausgebildet werden. Es ist auffällig, dass sieben Tage nach Training die Kletterinitiationen weiter auf 20% absinken. Es wird angenommen, dass es trotz 17°C-Haltung zu einer leichten UAS-Induktion kommt, wodurch weniger Mof zur Heraufregulierung der X-chromosomalen und für das Lernen benötigten Gene zur Verfügung steht und das Lernen somit verzögert stattfindet. Zudem reduziert die verringerte Temperatur die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese, die für die Konsolidierung essentiell ist. Das Protokoll B unterscheidet sich zum Protokoll der Kontrolle dahingehend, dass die Männchen vor dem initialen Test für drei Tage auf 30°C und in Dunkelheit gestellt werden. Durch diese Induktion der RNAi bis zum Zeitpunkt des Trainings wird Mof reduziert. Fliegen, denen Mof während des Trainings und der Konsolidierung fehlt, sind im Gegensatz zur Kontrolle nicht in der Lage ihre Körpergröße zu lernen (Tag 0: 50%, Tag 1: 50%, Tag 4: 40% erfolglose Kletterversuche; Abbildung 24B). Unerwarteter Weise unterscheidet sich das Verhalten der Tiere am letzten Test Tag signifikant zu dem an den restlichen Tagen (30% erfolglose Kletterversuche). Als Ursache dessen wird angenommen, dass die Versuchstiere, trotz Dunkelhaltung während der kompletten Testreihe, durch den visuellen Eingang während der Tests an der Lücke an Tag 1 und 4 ihre Kletterleistung verbesserten. Zu diesen Zeitpunkten war Mof wieder verfügbar (17°C-Haltung nach dem Training). Dass naive Fliegen ihre Körpergrößeneinschätzung verbessern, nachdem sie 24 Stunden zuvor zehn Anläufe an eine Lücke (unabhängig der Breite) absolvierten, ist bereits von Krause bekannt. Der kurze visuelle Eingang ist jedoch nur für die Ausbildung eines partiellen Körpergrößengedächtnisses ausreichend (Krause, 2015). Eine Möglichkeit, um ein

Erlernen außerhalb des 24 Stunden-Zeitfensters nach dem Training zu unterbinden, wäre eine konstante Haltung der Fliegen auf 30°C nach der initialen 30°C-Induktionsphase. Wie die spatio-temporalen Experimente mit den Faktoren dCBP und CRTC aus Kapitel 3.5 jedoch zeigen, beeinträchtigt dies die Aktivität der Fliegen massiv und lässt daher keine Aussage zu. Abschließend lässt sich sagen, dass die spatio-temporalen Experimente die Hypothese stützen, dass der epigenetische Faktor Mof für das Erlernen der Körpergröße gebraucht wird, mutmaßlich über die Transkriptionssteigerung der Gene *rut*, *dnc* und *dCREB2*.

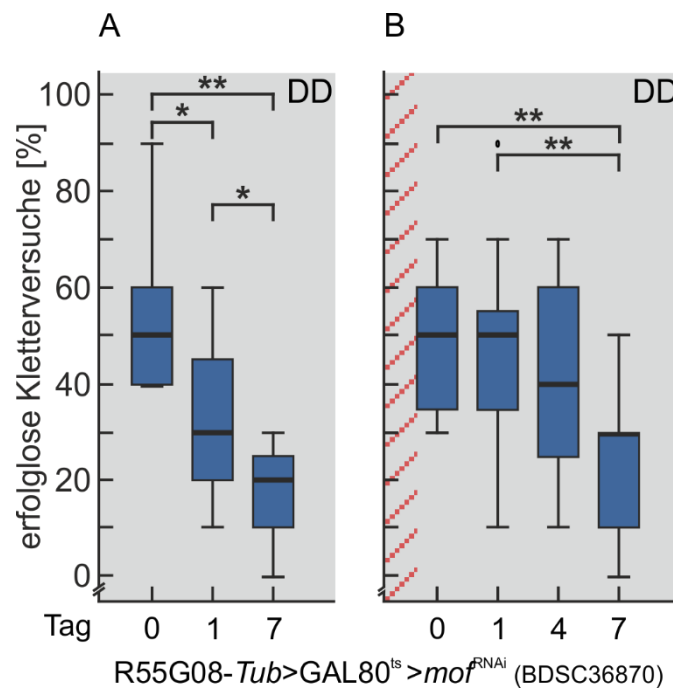


Abbildung 24: **Spatio-temporale Induktion von *mof*^{RNAi} in den $\Delta 7$ -Neuronen.**

(A) Entwicklung, Aufzucht und Haltung erfolgten bei 17°C (blaue Boxen) und in Dunkelheit (grauer Hintergrund) zur Vorbeugung einer RNAi-Induktion (siehe Protokoll 2.4A). Mit diesem Kontrollexperiment wurde nachgewiesen, dass naive Fliegen des Genotyps R55G08-*Tub*>GAL80^{ts}>*mof*^{RNAi} (Tag 0), die ein optimales Training absolvieren, nach 24 Stunden (Tag 1) erfolgreich ein Gedächtnis zur Körpergröße ausbilden können. Die ausgeführten Kletterinitiationen reduzieren sich nach weiteren sechs Tagen nochmals (Tag 7). N = 15 pro Gruppe, n = 10.

(B) Entwicklung, Aufzucht und Haltung erfolgten bei 17°C und in Dunkelheit. Damit den Fliegen des Genotyps R55G08-*Tub*>GAL80^{ts}>*mof*^{RNAi} zum Zeitpunkt des Trainings (im Anschluss an den initialen Test an Tag 0) kein Mof zur Verfügung stand, wurde die RNAi ausschließlich drei Tage vor dem naiven Test induziert (rote Schraffur, 30°C, Dunkelheit, siehe Protokoll 2.4B). N = 15 pro Gruppe, n = 10. Fehlte während des Lernens Mof, waren die Fliegen nicht in der Lage ein Körpergrößengedächtnis auszubilden.

Männchen wurden an einer 5,5 mm Lücke getestet. Verwendung der BDSC-Linie #36870. Nicht-parametrische Mediarstellung entsprechend Abbildung 9. Die statistische Auswertung kann dem Anhang, Tabelle 152 und Tabelle 153 entnommen werden.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit bildet den momentanen Abschluss einer Reihe an Studien (Pick und Strauss, 2005; Kienitz, 2010; Krause, 2015), die sich mit dem Kletterverhalten von *Drosophila melanogaster* an Lücken definierter Breiten beschäftigten. Nachdem anfänglich festgestellt werden konnte, dass eine Korrelation zwischen der eigenen Körpergröße und den ausgeführten Suchschlägen zur gegenüberliegenden Lückenseite besteht (Pick und Strauss, 2005; Kienitz, 2010), postulierte Krause, dass die besagte Korrelation auf der Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses basiert: dem Körpergrößengedächtnis (Krause, 2015). Er analysierte den für das Lernen benötigten biochemischen Signalweg (cAMP/PKA/dCREB2) und ordnete dessen Aktivität der Protozerebralbrücke innerhalb des Zentralkomplexes zu. Final wurde ein Modell erarbeitet, nach welchem eine Körpergrößeneichung über Verrechnung der individuellen Schrittlänge, bzw. – Frequenz mit der generierten Bewegungsparallaxe vorgenommen wird. Erweitert und präzisiert werden konnte der Informationsstand zur biochemischen Basis (dCREB2/dCBP/CRTC) und der neuronalen Verschaltung ($\Delta 7$ -/PFN-Neurone) mit der hier vorliegenden Arbeit. Zudem wurden erste Schritte in die Beantwortung der Frage unternommen, wie ein einmal geeichtes Gedächtnis auf Dauer erhalten bleibt (dCREB2/Epigenetik). Eine solch detaillierte Ausarbeitung eines nahezu lebenslangen Gedächtnisses in *Drosophila* ist bislang einmalig.

4.1 „Lebenslange“ Gedächtnisse bei Insekten

Uns Menschen ist es möglich, selbst im hohen Alter Erlebnisse unserer Kindheit zu erinnern. Ist die Ausbildung eines solchen lebenslangen Gedächtnisses spezifisch für uns Menschen oder ist es auch Insekten möglich, ein solch langfristig persistierendes Gedächtnis auszubilden? Eine japanische Arbeitsgruppe postulierte ein lebenslanges olfaktorisches Gedächtnis für die Heuschreckenart *Gryllus bimaculatus*. Dabei durchliefen Heuschrecken-Nymphen (3. und 4. Nymphenstadium) eine operante Konditionierung (Matsumoto und Mizunami, 2002a). Die operante Konditionierung beruht auf dem Prinzip, dass, sofern dem eigenen Verhalten ein bestimmter Reiz folgt, die Wahrscheinlichkeit das Verhalten zukünftig erneut auszuführen steigt (bei einem appetitiven Reiz), bzw. sinkt (aversiver Reiz) (Schermer, 2006). Die Wasser-deprivierten Tiere durften an fünf

aufeinanderfolgenden Tagen für je 30 Minuten eine Umgebung explorieren, die je zwei Duftquellen enthielt. Die Tiere stellten während dieser Zeit eine Assoziation her zwischen einem Pfefferminz-Duft, welcher mit Wasser belohnt wurde, und einem Vanille-Duft, der mit Salzwasser bestraft wurde. Noch zehn Wochen später, als adultes Tier, war es den Heuschrecken möglich, den Pfefferminz-Duft gegenüber dem Vanille-Duft zu präferieren. Ein zeitlich späterer Test scheint nicht möglich; nach zehn Wochen waren bereits 40% der ausgewählten Heuschrecken verstorben (Matsumoto und Mizunami, 2002a). Führte die Arbeitsgruppe hingegen eine klassische Konditionierung (Paarung von Pfefferminz-Duft mit Wasser [P+] und Paarung von Vanille-Duft mit Salzwasser [V-]) bei adulten Heuschrecken durch, testeten sie die Gedächtnisleistung maximal vier Tage später. Ob auch hier von einer lebenslangen Speicherung ausgegangen werden kann, wurde nicht berichtet (Matsumoto und Mizunami, 2002b). Auch bewies die japanische Arbeitsgruppe, dass Schaben ein Langzeitgedächtnis ausbilden können. Dies besteht über vier Wochen hinweg, sofern die Schaben ein olfaktorisch operantes Training (P+ gegen V-) absolvierten. Die Autoren gehen davon aus, dass das olfaktorische Gedächtnis über mehrere Monate Bestand haben könnte; getestet wurde dies jedoch nicht (Sakura und Mizunami, 2001). Daneben beschrieb Menzel schon 1968 ein Langzeitgedächtnis bei der Honigbiene *Apis mellifica* für Spektralfarben. Er zeigte, dass trainierte Honigbienen eine mit Zuckerwasser-assoziierte Spektralfarbe gegenüber einer zweiten Spektralfarbe 13 Tage nach dem Training noch präferierten. Ob dieses Gedächtnis theoretisch länger Bestand haben könnte, konnte nicht überprüft werden. Nach 14 Tagen waren etwa 90% der Tiere gestorben, die eingesperrt innerhalb des Bienenstocks gehalten wurden. Zudem suchten immer weniger Bienen die Apparatur auf und trafen weniger Entscheidungen, je länger der Versuchstag vom Training entfernt lag (Menzel, 1968). In seiner Dissertation zeigte Krause, dass *Drosophila* ein Körpergrößengedächtnis mit einer Beibehaltungsdauer von mindestens 21 Tagen ausbilden kann (Krause, 2015). Mit dieser Aufrechterhaltungsspanne hebt sich das Körpergrößengedächtnis innerhalb der *Drosophila*-Forschung deutlich von den bislang bekannten Langzeitgedächtnissen ab. Es wird vermutet, dass es lebenslang Bestand hat.

4.2 Körpergrößengedächtnisse bei Insekten

Dem Namen nach handelt es sich bei dem Körpergrößengedächtnis also um ein LTM, welches spezifisch für die Körpermitte der Fliege ist. Folglich stellte sich die Frage, ob der Mechanismus des Körpergrößens-Erlernens und der Speicherung bereits von anderen Insekten bekannt ist. Diesbezüglich gibt lediglich eine einzelne Studie einer israelischen Arbeitsgruppe Auskunft, innerhalb welcher die Körpergrößenswahrnehmung bei Heuschrecken beschrieben ist (Ben-Nun et al., 2013). Heuschrecken durchlaufen als hemimetabolen Insekten während der Entwicklung Stadien des Wachstums und der Häutung, wodurch sie das Wissen über ihre Körpergröße fortlaufend aktualisieren müssen. Dies verhält sich gegensätzlich zu *Drosophila*, welches als holometaboles Insekt die Stadien der Larve und der Puppe durchlebt, um nachfolgend als fertig entwickelte Fliege zu schlüpfen. Nach dem Schlupf ist die Körpergröße festgelegt und verändert sich nicht mehr. Für die Tauflye ist es somit ausreichend, ihre Körpergröße einmal zu erlernen und ein lebenslanges Gedächtnis darüber auszubilden (Krause, 2015). Die Autoren der Heuschrecken-Studie gehen davon aus, dass frisch-gehäutete adulte Heuschrecken, durch eine mind. dreistündige Erfahrung innerhalb einer dreidimensionalen Lückenbestückten Umgebung, eine korrekte Körpergrößenswahrnehmung entwickeln und das Wissen darüber abrufen können. Im Vergleich dazu war von Krause aus seiner Dissertation bekannt, dass visuell naive Fliegen, die für zwanzig Minuten in einem optimalen Streifenzyylinder trainiert wurden, am Folgetag in der Lage sind eine korrekte Einschätzung ihrer Reichweite an einer Lücke vorzunehmen (Krause, 2015). Mit der vorliegenden Arbeit konnte die Frage beantwortet werden, wann nach Abschluss der Lernphase die Fliege in der Lage ist, ihr Körpergrößenswissen auch abzurufen. Eine Reduktion des exzessiven Kletterverhaltens beginnt 12 Stunden nach der Lernphase, 14 Stunden nach Training ist das Gedächtnis intakt (entsprechend der 24-Stunden Kontrolle, Abbildung 16). Demnach unterscheidet sich das Körpergrößengedächtnis von *Drosophila* (12-14 Stunden) bzgl. des Gedächtnisabrufes deutlich von dem der Heuschrecken (mind. 3 Stunden). Zur Studie von Ben-Nun und Kollegen soll angemerkt werden, dass die Autoren die Erfahrung an der Lücke als Notwendigkeit zum Erlernen der Körpermitte angeben. Auf Basis der in der Studie genannten Angaben kann es den Autoren jedoch nicht möglich sein diese Aussage zu treffen. Es ist nicht zu unterscheiden, ob das Erlernen der Größe auf der Erfahrung an der Lücke basiert oder ob die visuell

strukturierte Umgebung innerhalb des dreidimensionalen Käfigs Voraussetzung für das Erlernen der Körpereichweite war. Als Kontrolle wurden Heuschrecken in einer zweidimensionalen Umgebung gehalten, in der sie sich frei bewegen konnten. Weitere Angaben zur genauen Haltung während der Trainingsphase wären notwendig. Darüber hinaus beschreiben Ben-Nun und Kollegen, dass die Heuschrecken eine visuelle Einschätzung zur gegenüberliegenden Lückenseite über seitliche Kopfbewegungen vornehmen (Ben-Nun et al., 2013). Wie zuvor beschrieben, ist bekannt, dass *Drosophila* zur Einschätzung der Entfernung beim Laufen latero-laterale Kopfbewegungen nutzt (Pick und Strauss, 2005), die aber durch die Mechanik der tripodalen Gangs zustande kommen. Der Kopf gleicht dann durch Gegendrehungen den Winkel aus, so dass der Blick in Laufrichtung bleibt. Zudem verlangt die Gedächtnisbildung zur Körpergröße bei *Drosophila* visuelle Eingänge, zur Generierung von Bewegungsparallaxe während des Laufens (Krause, 2015). Sind darüber hinaus Gemeinsamkeiten zwischen dieser Arbeit und der Studie von Ben-Nun festzustellen? Ben-Nun und Kollegen konnten über Injektion des Proteinbiosynthese-Inhibitors Anisomycin beweisen, dass die Gedächtnisbildung bei Heuschrecken Proteinbiosynthese benötigt (Ben-Nun et al., 2013). Wird die Synthese neuer Proteine während der Konsolidierung behindert, bleiben langfristige Veränderungen der Synapse aus; die gelernte Information kann nicht in ein Langzeitgedächtnis überführt werden. Gleiches konnte in dieser Arbeit für *Drosophila* bei Verfütterung des Proteinbiosynthese-Inhibitors Cycloheximid direkt nach dem optimalen Training festgestellt werden. Die exzessiven Kletterinitiationen waren am Folgetag nicht reduziert (Abbildung 17).

Demnach kann sowohl für *Drosophila*, als auch für Heuschrecken ein Langzeitgedächtnis zur Körpergröße beschrieben werden. Über eine mutmaßlich lebenslange Beibehaltung des Heuschrecken-Gedächtnisses nach Erreichen des adulten Stadiums, wurde jedoch nicht berichtet. Ben-Nun und Kollegen verglichen in ihrer Publikation frisch gehäutete Heuschrecken mit maximal sieben Tage alten Tieren (Ben-Nun et al., 2013).

4.3 Regulation der Transkription

Krause beschreibt in seiner Dissertation, dass die Etablierung des Körpergrößengedächtnisses von der Aktivität der cAMP/PKA/dCREB2-Signalkaskade in

den latero-lateralen Neuronen der PB abhängig ist. Diese Neurone sind somit der Ort der aktiven Transkription von Genen, deren Produkte die Stärkung und Modulierung der Synapse bewirken und das Erlernen der Körpergrößeninformation und dessen Speicherung vornehmen. Wie zuvor genannt, konnte durch die Verfütterung von Cycloheximid direkt im Anschluss an das optimale Training naiver Fliegen die Ausbildung des Körpergrößengedächtnisses unterbunden werden. Darüber hinaus sind Fliegen, denen 24 Stunden nach der Lernphase der Translationshemmer verfüttert wurde, ebenfalls nicht in der Lage ihre Körperreichweite an der Lücke korrekt einzuschätzen. Folglich benötigt die Bildung und Aufrechterhaltung eines Körpergrößengedächtnisses eine kontinuierliche Synthese neuer Proteine (> 24 Stunden). Aus einer Vertebraten-Studie ist ähnliches bekannt (Bambah-Mukku et al., 2014). Während des Trainings sollten Mäuse eine dunkel-gehaltene Kammer mit einem elektrischen Fußschock assoziieren; dem gegenüber stand eine hellerleuchtete, nicht-bestrafte Kammer. Beim Test zwei, bzw. sieben Tage nach Training zeigten wildtypische, unbehandelte Tiere ein Vermeidungsverhalten bzgl. der bestrafte Seite (erhöhte Latenz bis zum Eintritt); d. h. die Mäuse hatten entgegen ihrer Natur die helle, nicht-bestrafte Seite zu präferieren gelernt (*Inhibitory Avoidance* [IA]-Paradigma). Injizierten die Autoren jedoch direkt vor/direkt nach dem Training den Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin, vermieden die Tiere zwei, bzw. sieben Tage nach Training die bestrafte Seite nicht; ein Gedächtnis konnte nicht ausgebildet werden. Wurde Anisomycin 24 Stunden nach dem Training injiziert (siehe Körpergrößengedächtnis), war das Gedächtnis nach zwei Tagen zwar reduziert, unterschied sich aber nicht von der Kontrolle. Jedoch zeigten die Tiere sieben Tage nach Training einen massiven Gedächtnisdefekt. Keine Gedächtnisdefekte konnten beobachtet werden, wenn zwischen dem Training und der Injektion zwei Tage vergangen waren. Daraus erschließt sich, dass mindestens 24 Stunden lang, aber nicht länger als 48 Stunden eine Neusynthese von Proteinen für die Gedächtnisausbildung benötigt wird (Bambah-Mukku et al., 2014).

Das in dieser Arbeit mittels Cycloheximid herausgefundene Ergebnis einer andauernden Proteinbiosynthese wird von einem zweiten Ergebnis bestärkt. Es konnte gezeigt werden, dass Fliegen mit zuvor intaktem Körpergrößengedächtnis dann vermehrt klettern (d.h. eine reduzierte Gedächtnisleistung zeigen), wenn im Alter von drei Tagen, wie auch im Alter von sieben Tagen durch temperaturbedingte Expression der dominant negativen dCREB2-Isoform dCREB2-b die Aktivität von

dCREB2 reduziert wird (Abbildung 18). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die Expression von dCREB2-Zielgenen kontinuierlich aufrechterhalten werden muss, um ein intaktes Körpergrößengedächtnis zu garantieren. Aus der Vertebraten- und der *Drosophila*-Forschung sind zwei Beispiele bekannt, wie über einen autoregulatorischen Rückkopplungs-Mechanismus die Expression/Aktivität von CREB hochgehalten werden kann (Bambah-Mukku et al., 2014; Miyashita et al., 2018). So zeigt die Studie von Bambah-Mukku und Kollegen zum Vermeidungsverhalten der Maus, dass es durch das IA-Training zu einer Freisetzung des *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) kommt, welcher nach Bindung an seinen *Tropomyosin-Related Kinase B* (TrkB)-Rezeptor die Expression von CREB aktiviert. CREB wiederum induziert die Expression seines Zielgens *CCAAT/Enhancer Binding Protein* (C/EBP), woraufhin C/EBP β die BDNF-Expression fördert. Die Autoren der Vertebraten-Studie zu BDNF grenzen die Aktivität des autoregulatorischen Rückkopplungs-Mechanismus jedoch auf die ersten beiden Tage nach der Trainingsphase ein (Bambah-Mukku et al., 2014). Bei *Drosophila* konnte ein solcher Rückkopplungs-Mechanismus in den α/β -Neurone der Pilzkörper identifiziert werden (Miyashita et al., 2018). So kommt es während der olfaktorischen Intervall-Konditionierung (*spaced training*) zur Phosphorylierung der *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK), höchstwahrscheinlich über den cAMP/PKA- und den *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)-Signalweg. Die phosphorylierte ERK (pERK) phosphoryliert daraufhin dCREB2, wodurch dieser die Expression von c-Fos induziert. Parallel phosphoryliert pERK c-Fos, woraufhin c-Fos mit Jun zusammen den Transkriptionsfaktor AP-1 bildet. AP-1 wiederum ist in der Lage die dCREB2-Expression zu steuern. Die Autoren postulieren diesen Mechanismus für den Zeitraum der Gedächtnisbildung. Zudem ergänzen sie, dass der c-Fos/dCREB2-Zyklus beim Gedächtnisabruf 24 Stunden nach Training benötigt wird (Miyashita et al., 2018). Für das olfaktorische LTM konnte fortführend über die Studie von Hirano (2016) bestimmt werden, dass diese dCREB2-abhängige Aufrechterhaltung des Gedächtnisses auf eine frühe Phase (bis vier Tage nach Training) begrenzt ist. Ab Tag 4 (späte Phase) wird die Funktion von dCREB2 von einem anderen Transkriptionsfaktor, Bx, abgelöst (siehe auch Kapitel 3.6.1) (Hirano et al., 2016). Dies unterscheidet sich zum Körpergrößengedächtnis, bei welchem dCREB2 dauerhaft aktiv ist (Abbildung 18) und ein Wechsel der Transkriptionsfaktoren nach heutigem Kenntnisstand nicht durchgeführt zu werden scheint. Eine Klärung der

Funktion von Bx im Aufrechterhaltungsprozess der Körpergrößeninformation scheint dennoch angeraten. Auch wäre es interessant der Frage nachzugehen, ob die beschriebenen Rückkopplungs-Mechanismen der Vertebraten- und der *Drosophila*-Studie für das Körpergrößengedächtnis, insbesondere für den Konsolidierungs- und Aufrechterhaltungsprozess, von Relevanz sein könnten. Eine Analyse der beteiligten Komponenten (BDNF-Ortholog: *Drosophila* Neurotrophin 1) wäre lohnenswert.

Neben der zeitlich unterschiedlich lang benötigten Aktivität des Transkriptionsaktivators dCREB2, konnte zwischen dem olfaktorischen und dem Körpergrößengedächtnis eine Gemeinsamkeit hinsichtlich der dCREB2-Co-Aktivatoren ausgemacht werden. In beiden Gedächtnissen führt die RNAi von *dCPB* und *Crtc* zu einem Gedächtnisverlust (Abbildung 19). Spezifiziert ist dies bereits für das olfaktorische LTM mit einer dCBP-Funktion während der Bildung und einer CRTC-Funktion während der ersten vier Tage der Aufrechterhaltung. Im Körpergrößengedächtnis ist dCBP mutmaßlich zum Zeitpunkt der Aufrechterhaltungsphase aktiv (Abbildung 21); ein abschließender Test muss diesbezüglich jedoch noch durchgeführt werden. Auch steht eine zeitliche Einordnung der Funktion von CRTC noch aus (siehe dazu auch GeneSwitch und konditionale Mutagenese über CRISPR/Cas9, 4.4).

Mit der Dissertation von Krause und der vorliegenden Arbeit konnte über Verhaltensversuche also gezeigt werden, dass regulatorische Veränderungen innerhalb der $\Delta 7$ -Neurone der PB im Zuge der Gedächtnisformierung zur Körperreichweite stattfinden. Mit einem immunhistochemischen Experiment könnte dies weiter gefestigt werden. Dazu würde ein Stamm verwendet werden, welcher von der Arbeitsgruppe von Tabata etabliert wurde und der Identifizierung dCREB2-exprimierender Neurone dient (Yamazaki et al., 2018). Bei diesem Stamm steht der Transkriptionsfaktor GAL4 unter der Kontrolle der *cAMP response element* (CRE)-Sequenz, also der Sequenz an welche dCREB2 spezifisch bindet (Yamazaki et al., 2018). Diese Zellen können über die Expression eines Reporters visualisiert werden. Vergleiche man die Intensitäten der Reporter-Expression innerhalb der $\Delta 7$ -Neurone vor und 24 Stunden nach dem Training mit optimaler Bewegungsparallaxe, könnte ein Rückschluss auf die Aktivität von dCREB2 in der Gedächtnisformierung gezogen und die Verhaltensversuche auf eine weitere Art untermauert werden.

4.4 Epigenetische Regulation

In der Einleitung wurden verschiedene Mechanismen vorgestellt, die potentiell die Aufrechterhaltung von Langzeitgedächtnissen steuern (Kapitel 1.6). Zum einen können dauerhaft aktive Kinasen post-translational phosphorylierte Proteine permanent aktiv halten. Daneben sorgt der „*Synaptic-Tagging-and-Capture*“-Mechanismus für die Markierung der am Lernen beteiligten Synapsen und einer lokalen Translation synaptischer Proteine zur Ausbildung und Aufrechterhaltung des Gedächtnisses. Auch miRNAs regulieren als post-transkriptionale Regulatoren die Genexpression, indem sie Ziel-mRNAs binden und folglich deren Translation stilllegen. In dieser Arbeit wurde jedoch der Fokus auf epigenetische Mechanismen als Regulatoren der Gedächtnisaufrechterhaltung gelegt. Orientiert wurde sich an einer Publikation von Kirilly (Kirilly et al., 2011), in welcher die Rolle epigenetischer Faktoren in der Rückbildung von Axonen und Dendriten im Zentralnervensystem von *Drosophila* während der Metamorphose untersucht wurde. Die Liste der epigenetischen Faktoren der Publikation wurde daraufhin in dieser Arbeit genutzt. Über einen RNAi-Screen sollten die epigenetischen Kandidaten identifiziert werden, die bei Herunterregulation in den $\Delta 7$ -Neuronen der PB einen exzessiven Kletterphänotyp im Lückenüberwindungsparadigma hervorbringen, d. h. ihre Körperreichweite nicht gelernt haben. Die $\Delta 7$ -Neurone wurden ausgewählt, da in diesen die Aktivität des Transkriptionsfaktors dCREB2 zur Gedächtnisausbildung notwendig ist (Krause, 2015) und wie hier gezeigt, auch zur Aufrechterhaltung genutzt wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Transkription von dCREB2-Zielgenen zur Aufrechterhaltung des Gedächtnisses durch die Aktivität der epigenetischen Faktoren moduliert wird.

Über einen Screen wurden 22 epigenetische Kandidaten ermittelt, deren heterozygote UAS-Kontrollen bereits unverhältnismäßig viele Kletterinitiationen ausführten, d.h. nicht in der Lage waren ihre Körpergröße zu erlernen. Welche Neurone dabei betroffen sind, ist unbekannt. Durch Einkreuzen der Treiberlinie wurde der Phänotyp der UAS-Kontrollen nicht signifikant schlechter (Leckexpression); dies spricht möglicherweise gegen eine Rolle dieser Kandidatengene in den $\Delta 7$ -Neuronen. Folglich kann bislang nicht differenziert werden, ob die Funktion eines Kandidaten nicht ausschließlich auf die $\Delta 7$ -Neuronen der PB begrenzt ist, oder ob ein möglicher $\Delta 7$ -spezifischer Effekt überdeckt wurde durch die hohe Effizienz der RNAi-Konstrukte, bei welchen die Leckexpression

alleine einen Phänotyp hervorbrachte. Zukünftig könnte auf die konditionale Mutagenese über CRISPR/Cas9 zurückgegriffen werden, um den Einfluss von epigenetischen Faktoren bei der Gedächtnisaufrechterhaltung zu untersuchen (Port et al., 2014; Xue et al., 2014). Bei dieser Methode wird die Endonuklease Cas9 (UAS-Cas9) im Muster des GAL4-Treibers exprimiert. Gleichzeitig wird die *guide* RNA (gRNA), welche Cas9 Gen-spezifisch zur DNA rekrutiert, ubiquitär exprimiert. Dadurch kommt es zu einer gewebsspezifischen Ausschaltung des Gens von Interesse. Die Autoren dieser Studie versprechen, dass diese Methode schneller und effizienter agiert als bekannte RNAi-Ansätze. Auch können Konstrukte erstellt werden, die mehr als eine gRNA enthalten. So können Doppelstrangbrüche in verschiedenen Sequenzbereichen desselben Gens erzeugt werden (Port et al., 2014; Xue et al., 2014). Kombiniert mit *Tub>GAL80^{ts}* kann vermieden werden, dass schon während der Entwicklung die Gene deletiert werden. Mit dieser Methode könnte sowohl der Screen fortgeführt, als auch die identifizierten Kandidaten weiter evaluiert werden.

Neben den 22 epigenetischen Faktoren mit Leckexpression wurden insgesamt elf Kandidaten erfolgreich mit einem $\Delta 7$ -spezifischen Gedächtnis-Phänotyp identifiziert. Dabei handelt es sich um die epigenetischen Regulatoren: Mle, Msl-1, Msl-2, Mof, Pc, Pcl, Ptip, Set1, Sirt6, Tip60 und Top2. Über eine Anfärbung der Axone und Dendriten (*R55G08>DenSyt*) der *Knock-Down*-Fliegen und einer Zählung der zugehörigen Zellkörper konnten entwicklungsbedingte morphologische Defekte der Protozerebralbrücke ausgeschlossen werden (Abbildung 26). Um anschließend herauszufinden, ob die Faktoren entweder während der Lern- und Konsolidierungsphase, oder während der Gedächtnisaufrechterhaltung aktiv sind, wurde zur zeitlichen Auftrennung das TARGET-System herangezogen (*Tub>GAL80^{ts}*) (McGuire et al., 2004). Unglücklicherweise stellte sich heraus, dass Fliegen, die zur Induktion der RNAi über mehrere Tage hinweg auf 30°C gehalten werden, temperaturbedingt inaktiv werden und ihre Kletterinitiationen an der Lücke reduzieren (Bernhard, 2019). Es ist anzunehmen, dass der Effekt der genetischen Manipulation dadurch verdeckt blieb. Im Rahmen dieser Arbeit war es folglich nicht möglich herauszufinden, ob explizit die Phase der Gedächtnisaufrechterhaltung der Aktivität spezifischer epigenetischer Faktoren bedarf. Zukünftig wäre die Anwendung der GeneSwitch-Methode eine Alternative, bei der die temporale Kontrolle der UAS-Aktivierung über die Verfütterung eines Steroidhormons gewährleistet wird

(Osterwalder et al., 2001; Roman et al., 2001; Nicholson et al., 2008). Dazu wurde ein chimäres GAL4-Konstrukt entwickelt, welches eine DNA-bindende Domäne trägt, sowie zusätzlich eine Steroidhormon-Rezeptor Transkription-aktivierende Domäne. Das Fusionsprotein aus GAL4 und Progesteron-Rezeptor wird dann aktiv, wenn Mifepriston (RU486), ein Antagonist des Progesteron-Rezeptors, verfüttert wird. Die Expression des UAS-Konstrukts wird daraufhin induziert (Osterwalder et al., 2001; Roman et al., 2001; Nicholson et al., 2008). Der Vorteil der Methode besteht darin, dass alle verfügbaren UAS-Konstrukte eingesetzt werden können. Um diese spatio-temporal und $\Delta 7$ -spezifisch induzieren zu können, ist allerdings die Konstruktion einer solchen $\Delta 7$ -spezifischen GeneSwitch-GAL4-Linie zuvor erforderlich.

Über den Screen konnten erfolgreich epigenetische Kandidaten als Regulatoren des Körpergrößengedächtnisses identifiziert werden. Mit einer weiterführenden Analyse sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit der Lern-, bzw. Trainingsvorgang naiver Fliegen das epigenetische Markierungsmuster gedächtnisrelevanter (dCREB2-) Gene verändert und um welche Ziel-Gene es sich dabei handelt. Notwendig dafür ist eine Zelltyp-spezifische Analyse der Genexpression und Histon-Modifikationen adulter Neurone. Diesbezüglich wurde eine Methode entwickelt, die sowohl in Mäusen (Mo et al., 2015), dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Steiner und Henikoff, 2015) und *Drosophila* (Henry et al., 2012; Jones et al., 2018) eingesetzt werden kann. Für *Drosophila* erschien die Veröffentlichung 2012 von einer Arbeitsgruppe des Janelia Research Campus (Henry et al., 2012). Ihnen war es gelungen, das Expressionsprofil und die Histon-Signatur dreier verschiedener Neuronen-Populationen (pan-neuronal, Kenyon-Zellen der Pilzkörper, oktopaminerge Neurone) zu identifizieren und voneinander zu unterscheiden. Die sogenannte INTACT (*I*solation of *N*uclei *T*agged in a *S*pecific *C*ell *T*ype)-Methode basiert auf der Expression eines mit GFP oder td-Tomato markierten Proteins der *SUN Domain* Familie, welches in der inneren Membran des Zellkerns lokalisiert ist. Das Protein steht unter UAS-Kontrolle und kann bei Kreuzung mit einer GAL4-tragenden Fliege in jeder Zelle von Interesse exprimiert werden. Zur Bestimmung des Transkriptionsprofils kann die Kern-RNA der markierten Zellkerne dann sequenziert werden (RNAseq); zur Analyse des Histonprofils können DNA-Chromatin-Interaktionen der Nukleosome der markierten Zellkerne über ChIPseq (*Chromatin-Immunoprecipitation DNA sequencing*) festgehalten werden. Mit der

INTACT-Methode ist also generell eine Zelltyp-spezifische Analyse des Transkriptionsprofils und des epigenetischen Markierungs-Musters möglich.

Die Methode wurde genutzt von der Arbeitsgruppe um Saitoe in der olfaktorischen Konditionierung zur Beantwortung exakt der Frage, die auch für das Körpergrößengedächtnis von Bedeutung ist, nämlich ob naive Fliegen nach einer Konditionierung ein verändertes Genexpressionsmuster besitzen und ob dieses einer epigenetischen Regulation unterliegt (Hirano et al., 2016). Für die ChIPseq-Analyse wurden Antikörper verwendet gegen einen Marker für transkriptionale Elongation (Ser2-phosphorylierte RNA Polymerase II, PolII S2P), die Transkriptionsfaktoren dCREB2 und CRTC, sowie die Histon-Markierungen H3K9ac (spezifisch für die HAT Gcn5) und H4K16ac (spezifisch für die HAT Tip60). Über die Anwendung von ChIPseq (Bestimmung der Chromatin-DNA-Interaktionen) nach olfaktorischer Konditionierung (naive gegen trainiert) genetisch manipulierter Fliegen (GeneSwitch: *Knock-Down* gegen Kontrolle) konnten so Zielgene von dCREB2 (und CRTC) über Unterschiede im Histon-Acetylierungsmuster identifiziert werden. Dies spricht für einen epigenetischen Mechanismus in der Gedächtnisbildung und Beibehaltung. Es konnte ein Arbeitsmodell etabliert werden, welches bereits unter 3.6.1 vorgestellt wurde. Es weist einen Wechsel der transkriptionalen Kontrolle zwischen der Gedächtnisformierung, der frühen und einer späten Gedächtnisaufrechterhaltungs-Phase nach, unter Beteiligung der epigenetischen Faktoren Gcn5 und Tip60 (Hirano et al., 2016). Die Ergebnisse von Hirano bekräftigen die Identifizierung von Tip60 als einen Regulator des Körpergrößengedächtnisses. Gcn5 war ebenso Bestandteil der gelisteten Faktoren, jedoch aufgrund von auffälligen motorischen Defekten im Lückenüberwindungsparadigma nicht testbar (siehe 3.6.1). Demnach scheint der Faktor zumindest eine Gedächtnisbildungs-unabhängige Funktion zu besitzen. Hirano zeigt in einem seiner Experimente ebenfalls eine Auffälligkeit zu Gcn5. Demnach reguliert Gcn5 bereits die basale Expression der beiden für den Aufrechterhaltungsprozess benötigten Transkriptionsfaktoren Bx und Smr in naiven Fliegen, jedoch über eine andere Funktion als der Histon Acetyltransferase-Aktivität. Diese wird erst während der Gedächtnisbeibehaltung genutzt (Hirano et al., 2016). Eine spatio-temporale Analyse über die GeneSwitch-Methode ist für die weitere Aufschlüsselung der Funktion beider HATs in der Gedächtnisbildung zur Körpergröße zukünftig zu empfehlen. Neben diesen beiden HATs untersuchte Hirano auch die HATs Mof, Chameau und Trithorax bei der olfaktorischen Gedächtnis-

bildung, jedoch ohne eine Beteiligung derer in der Gedächtnisformierung oder Aufrechterhaltung festzustellen. Hier grenzt sich das Körpergrößengedächtnis wiederum vom olfaktorischen Gedächtnis ab. Es konnte gezeigt werden, dass Mof mit Mle, Msl-1 und Msl-3 als MSL-Komplex das Körpergrößengedächtnis regulieren, mutmaßlich über die Transkriptionsförderung der X-chromosomalen Gene *rut* (AC), *dnc* (PDE) und *dCreb2* (dCREB2). Diese Regulation ist explizit für die Lern- und Konsolidierungsphase nachgewiesen worden (siehe 3.6.3). Ob diese Faktoren darüber hinaus eine Funktion während der Aufrechterhaltung ausüben, bleibt noch zu analysieren.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die INTACT-Methode für eine $\Delta 7$ -spezifische Analyse der Genexpression und Histon-Modifikationen vor und nach einem Training zur Bildung des Körpergrößengedächtnisses in Betracht gezogen. Jedoch ist INTACT stark limitiert, sofern pro Gehirn nur einige wenige Zellen (1-10 Neurone) markiert vorliegen, für die Ausführung der ChIPseq-Analyse jedoch 10^5 - 10^6 Zellen notwendig sind (Henry et al., 2012). Dies trifft auf die $\Delta 7$ -Neurone zu, die laut Franconville 16 Zellen per Hemisphäre besitzen (Franconville et al., 2018), nach eigener Zählung aber 18-23 Zellen umfassen. Weiter erschwert werden würde eine mögliche Auswertung eines $\Delta 7$ -Zell-spezifischen Transkription- und Histon-Profiles durch die Tatsache, dass der verwendete $\Delta 7$ -Treiber R55G08-GAL4 neben dem spezifischen PB-Muster zusätzlich eine starke Expression in den optischen Loben besitzt. Bei Auswertung der Profile könnten so $\Delta 7$ -spezifische Unterschiede vor und nach dem Lernen von dem Profil der optischen Loben überdeckt, möglicherweise verfälscht werden. Die INTACT-Methode kam daher für die Analyse des Körpergrößengedächtnisses nicht zum Einsatz.

4.5 Funktionelle und strukturelle Plastizität

Krause konnte herausfinden, dass die Aktivität der cAMP/PKA-Signalkaskade in den $\Delta 7$ -Neuronen der PB während des Erlernens der Körperreichweite zur Aktivierung des Transkriptionsaktivators dCREB2 benötigt wird (Krause, 2015). Mit dieser Arbeit ließ sich nachweisen, dass dCREB2 über den Vorgang des Lernens und der Konsolidierung hinaus für die Aufrechterhaltung des Körpergrößengedächtnisses sorgt. Parallel dazu konnte über einen Screen epigenetischer Faktoren eine Rolle derer im Körpergrößengedächtnis (Lernen/Aufrechterhaltung)

nachgewiesen werden. Basierend auf dem Modell des Körperreichweitenlernens von Krause sollen die beschriebenen Mechanismen zu einer Stärkung der Synapse führen. Dem unterliegt, dass eine höhere Transmitterausschüttung gewährleistet wird, bzw. dass in die Postsynapse mehr Rezeptoren eingebaut werden. Dies wird bezeichnet als funktionelle Plastizität. Darüber hinaus kann die synaptische Plastizität um eine strukturelle Komponente erweitert werden. Von struktureller Plastizität wird im Allgemeinen gesprochen, wenn morphologische Veränderungen der Synapse vorgenommen werden. Diese umfassen eine Neubildung von Synapsen, deren Vergrößerung, bzw. Verkleinerung, eine Synapsen-Stabilisierung, sowie deren Ab- oder Umbau (Caroni et al., 2012; Bernardinelli et al., 2014). Von Barth und Heisenberg wurde 1997 beschrieben, dass sich die strukturelle synaptische Plastizität adulter Fliegen erfahrungsbedingt ändern kann. Sie zeigten, dass der Umfang der Calices der Pilzkörper, sowie des Zentralkomplexes durch visuellen Eingang modifiziert werden kann. So ist das Wachstum der Calices etwa 6-12 Stunden nach Schlupf lichtabhängig, das Wachstum des Zentralkomplexes etwa 3-9 Stunden nach Schlupf. Darüber hinaus moduliert die Populationsdichte innerhalb des Haltungsgefäßes die Größe der Calices (Barth und Heisenberg, 1997). Ein weiteres Beispiel für strukturelle synaptische Veränderungen wurde 2001 von der Arbeitsgruppe um Ferrús beschrieben. So wiesen Fliegen, die über vier Tage hinweg einem bestimmten Duft (Benzaldehyd, bzw. Isoamylacetat) exponiert waren, einen reduzierten Umfang definierter Glomeruli in den Antennalloben auf. Innerhalb dieser Glomeruli schien eine Reduktion der Synapsen stattgefunden zu haben. Diese strukturellen synaptischen Veränderungen prägten sich auch im Verhalten aus. So vermieden die Fliegen den ursprünglich aversiven Duft nach der viertägigen Exposition nicht mehr (Devaud et al., 2001). Welche Art synaptischer Modulationen (funktionell und/oder strukturell) durch das Erlernen der Körpergrößeninformation vorgenommen wird, ist bislang nicht bekannt und gilt es zukünftig noch zu beantworten. Die Notwendigkeit der Proteinbiosynthese selbst 24 Stunden nach der Trainingsphase deutet zumindest darauf hin, dass strukturelle Veränderungen alleine die Gedächtnisaufrechterhaltung nicht gewährleisten können. Ebenso deutet die dauerhafte Notwendigkeit der dCREB2-Aktivität darauf hin, dass eine funktionelle Komponente bei der Beibehaltung des Gedächtnisses weiterhin benötigt wird.

Eine Möglichkeit experimentell herauszufinden, ob es durch optimale Parallaxenerfahrung zu einer Neubildung von Synapsen kommt, ist die Nutzung der

sogenannten *synaptic tagging with recombination* (STaR)-Methode (Chen et al., 2014). Die Methode basiert darauf, die T-Bars der Präsynapsen sichtbar zu machen. Bei T-Bars handelt es sich um elektronendichte Strukturen in T-Form, welche in den aktiven Zonen von *Drosophila* befindlich sind und mehrere Moleküle an Bruchpilot (BRP) beinhalten. So können bei Antikörperfärbung gegen Bruchpilot die präsynaptischen aktiven Zonen als Punkte über konfokale Mikroskopie abgebildet werden. Die Arbeitsgruppe um Zipursky stellte ein Fusionskonstrukt dieses präsynaptischen Markers und GFP her und integrierte dies, unter Kontrolle der endogenen regulatorischen Mechanismen, ins Genom der Fliege. Es kommt dann zur Expression des Fusionsproteins BRP::GFP, sobald zusätzlich eine Flippase in den Zellen von Interesse exprimiert wird; die Zelle selbst fluoresziert rot. Bei ausbleibender Flippase-Aktivität wird Bruchpilot wildtypisch exprimiert, ohne Markierung der aktiven Zone und der Zelle selbst. Im Gegensatz zur Expression eines UAS-*brp*-GFP-Konstruktes, bei der es zu Verklumpungen der BRP::GFP-Proteine kommt, werden bei der STaR-Methode (entsprechend der endogenen Regulation) die Präsynapsen punktuell angefärbt und sind voneinander zu differenzieren. Eine Zählung der einzelnen Punkte konnte von der Arbeitsgruppe daraufhin für die Zellen von Interesse vorgenommen werden (Chen et al., 2014). Demnach wäre es möglich, mit dieser Methode die aktiven Zonen vor und nach dem Erlernen der Körpergröße zu zählen. Kommen jedoch so viele Präsynapsen innerhalb eines Neuropils vor, dass benachbarte Punkte nicht voneinander zu unterscheiden sind, wird die Methode unbrauchbar (Chen et al., 2014). Gegebenenfalls ließen sich die Präsynapsen jedoch über die sogenannte Expansionsmikroskopie (Chen et al., 2015) voneinander getrennt visualisieren. Bei dieser Methode wird das Präparat (Gehirn der Fliege) in ein Expansions-Gel eingebettet, woaufhin es sich um etwa die vierfache Größe aufbläht. Die Autoren geben an, dass durch diese physikalische Vergrößerung eine laterale Auflösung von 70 μm erzielt werden kann. Alternativ zu diesem Ansatz, könnte statt der GAL4-getriebenen Flippase, eine Flippase genutzt werden, deren Expression über Hitzeschock induziert wird. Wird für die Hitzeinduktion der richtige Zeitpunkt während der Entwicklung abgepasst, kann dadurch ein einzelnes $\Delta 7$ -Neuron der PB angefärbt werden (rote Fluoreszenz), welches mutmaßlich ausreichend wenig und distinkte Präsynapsen (BRP::GFP) zum Zählen besitzt. Nach Auswertung genügender Präparate mit einzeln gefärbten Neuronen des naiven, bzw. trainierten Zustands

könnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob es durch das Training/Erlernen der Körperreichweite zu einer Neubildung an Synapsen kam.

Neben der STaR-Methode könnte die Nutzung von *targeted* GRASP (t-GRASP) (Shearin et al., 2018) zur Analyse der strukturellen Plastizität des Körpergrößengedächtnisses in Betracht gezogen werden. t-GRASP unterscheidet sich von der in dieser Arbeit angewandten nSyb-GRASP-Methode dahingehend, dass es zum einen nicht aktivitätsabhängig ist. Zum anderen werden beide splitGFP-Fragmente an Proteinfragmente fusioniert, die spezifisch für die Prä-, als auch für die Postsynapse/Dendriten sind. Dadurch wird ein höchst Synapsen-spezifisches GRASP-Signal generiert, ohne gleichzeitige Reduktion der Signalstärke. Für diese Methode erfolgte die Fusion von spGFP₁₁ präsynaptisch an Cacophony (pre-t-GRASP), spGFP₁₋₁₀ wurde postsynaptisch an *mouse* Telencephanlin (post-t-GRASP) fusioniert (Shearin et al., 2018). Bei der Anwendung von t-GRASP für die Identifizierung neuer Synapsen nach Erlernen der Körperreichweite, müsste das GRASP-Signal zwischen naiven und trainierten Fliegen miteinander verglichen werden. Da t-GRASP höchstspezifisch Synapsen markiert, steht eine Zunahme des GRASP-Signals stellvertretend für eine Zunahme der Anzahl und Größe an Synapsen.

Um darüber hinaus herauszufinden, ob im Zuge des Erlernens der Körpergrößeninformation synaptische Kontakte mit neuen Partnern eingegangen werden, könnte die transTango-Methode (Talay et al., 2017) erneut verwendet werden. Anders als das vorherige Ziel der Arbeit, nämlich postsynaptische Neurone zu den $\Delta 7$ -Neuronen zu identifizieren, läge das Augenmerk auf einem strukturellen Vergleich des postsynaptischen Musters. Dazu würde das Expressionsmuster der $\Delta 7$ -postsynaptischen Neurone von Fliegen, die dauerhaft in Dunkelheit gehalten werden, verglichen werden mit dem Expressionsmuster von Fliegen, die unter normalen Hell/Dunkelbedingungen ihre Körpergröße erlernen konnten. Es wäre vorstellbar, dass zum postsynaptischen Muster der Hell/Dunkelgruppe im Vergleich zur Dunkelgruppe lernbedingt weitere postsynaptische Partner/Zelltypen dazukommen. Gleichmaßen wäre es möglich, dass es aufgrund einer lernbedingten Vergrößerung der Synapsen bei der Hell/Dunkelgruppe zu einer intensiveren Färbung des postsynaptischen Musters (vermehrte Expression des postsynaptischen Markers) kommen könnte. Die beiden letztgenannten Verfahren

wurden im Rahmen dieser Arbeit im Labor der AG Strauß bereits etabliert; mit deren Anwendung könnte ein schneller erster Einblick zur strukturellen Plastizität gewonnen werden.

5 Zusammenfassung

Eine Fliege, die ein Gedächtnis über ihre Körperreichweite besitzt, richtet ihr Verhalten an einer Lücke entlang ihres Weges danach aus. D. h. sie kann einschätzen, ob eine Lücke definierter Größe von ihr zu überwinden ist. Der Bildung dieses Gedächtnisses unterliegt die Generierung von Bewegungsparallaxe während des Laufens innerhalb einer strukturierten Umgebung. Während des Lernens wird dabei die cAMP-Kaskade innerhalb der $\Delta 7$ -Neurone der Protozerebralbrücke (PB) benötigt, welche eine Aktivierung des Transkriptionsaktivators dCREB2 vornimmt. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität von dCREB2 in den Neuronen reduziert, die die PB mit dem Fächerförmigen Körper und den Noduli (PFN) verknüpfen. Die Bedeutsamkeit des Körpergrößengedächtnisses ergibt sich daraus, dass es als das am längsten andauernde Gedächtnis innerhalb der Spezies bekannt ist.

In dieser Arbeit wurde eine Netzwerk-Analyse vorgenommen, der zufolge die $\Delta 7$ -Neurone auf die PFN-Neurone projizieren und mit diesen synaptische Kontakte ausbilden. Zudem konnte durch einen Vergleich mit publizierten Zelltypen der Protozerebralbrücke der für das Körpergrößengedächtnis relevante PFN-Zelltyp weiter eingegrenzt werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass eine Fliege ihre Körperreichweite nicht während einer kritischen Lebensphase erlernen muss; der Lernvorgang kann auch im Alter von 8-9 Tagen vorgenommen werden. Ist die Körpergröße einmal unter kontrollierten Bedingungen erlernt worden, dauert es etwa 12 – 14 Stunden, bevor diese Information von der Fliege abgerufen werden kann. Auch zeigte sich, dass die Aktivität von dCREB2 in den $\Delta 7$ -Neuronen über die Phase des Körperreichweitenlernens hinaus für die Gedächtnisaufrechterhaltung benötigt wird. Die Verfütterung eines Proteinbiosynthese-Inhibitors bestätigt zudem die Notwendigkeit einer Protein-Neusynthese auch nach Abschluss der Konsolidierung. Ergänzend zur dauerhaften dCREB2-Aktivität scheint es wahrscheinlich, dass die Expression von dCREB2-Zielgenen in den $\Delta 7$ -Neuronen durch epigenetische Modifikationen kontrolliert wird. Über einen RNAi-Screen zeigten elf Kandidaten, zuzüglich der beiden dCREB2-Co-Aktivatoren dCBP und CRTC, unverhältnismäßig viele Kletterinitiationen an nicht zu überwindenden Lücken ($\Delta 7$ -spezifischer Kletterphänotyp). Eine synergistische Aktivität des Transkriptionsfaktors und der epigenetischen Modulatoren zur Gedächtnisaufrechterhaltung scheint aktuell wahrscheinlich.

6 Summary

A fly, memorizing its body reach, adjusts its behavior at a gap according to the own body size. Therefore, this fly will not try surmounting a gap that exceeds its reach by far. Formation of such a body-size memory is achieved by connecting parallax-motion experience with locomotion while walking in a visually structured environment. Regarding the biochemical pathway, learning and consolidation is mediated by activation of the cAMP/PKA signalling cascade and the transcription factor dCREB2 in $\Delta 7$ -neurons of the protocerebral bridge (PB). Conversely, neurons, that connect the PB with the fan-shaped body and the noduli (PFN), require low activity of dCREB2. Once formed, body-size memory is the most enduring memory known to date in *Drosophila melanogaster*.

In the present study, a network-analysis was performed, showing that $\Delta 7$ -neurons project to and build synaptic contacts with PFN-neurons. Additionally, the actual PFN-cell types responsible for acquiring body-size memory could be further defined by comparing them to published cell types of the protocerebral bridge. Moreover, it could be shown that learning the individual body reach is independent of a sensitive period in a fly's life. Thus, learning is not restricted to the immediate post-hatching period, but possible even 8 - 9 days thereafter. Once consolidated, body-size memory can be retrieved 12 – 14 hours after learning. Investigating mechanisms guaranteeing maintenance of the learned information, data were collected showing that dCREB2-activity in $\Delta 7$ -neurons is required on a sustained basis, outlasting even the early maintenance period. Supportingly, feeding the protein synthesis inhibitor Cycloheximid revealed that synthesis of new proteins is required even after consolidation. With an alternative approach focusing on maintenance mechanisms, it was asked, whether the expression of dCREB2-target genes in $\Delta 7$ -neurons is continuously achieved by epigenetic modification. An RNAi-screen unraveled that eleven candidates, in addition to the dCREB2-co-activators dCBP und CRTC, exhibited a $\Delta 7$ -specific climbing phenotype. Those flies showed extensive leg-over-head strokes at an unsurmountable gap. However, whether the function of the epigenetic factors are required during learning and consolidation or memory maintenance needs to be analyzed. According to the results of the study, it is likely that dCREB2 and the epigenetic modulators act synergistically to achieve memory maintenance.

7 Literatur

Abel, T., und Kandel, E. (1998). Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Research Reviews* 26, 360-378.

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., und Galle, R.F., et al. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.

Altarejos, J.Y., und Montminy, M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12, 141-151.

Angilletta, Jr., Michael J., Steury, T.D., und Sears, M.W. (2004). Temperature, Growth Rate, and Body Size in Ectotherms: Fitting Pieces of a Life-History Puzzle. *Integrative and Comparative Biology* 44, 498-509.

Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R.M., Iyer, N.A., Ngo, T.-T.B., Dionne, H., Abbott, L.F., Axel, R., und Tanimoto, H., et al. (2014). The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife* 3, e04577.

Asok, A., Leroy, F., Rayman, J.B., und Kandel, E.R. (2019). Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in Neurosciences* 42, 14-22.

Bambah-Mukku, D., Travaglia, A., Chen, D.Y., Pollonini, G., und Alberini, C.M. (2014). A Positive Autoregulatory BDNF Feedback Loop via C/EBP β Mediates Hippocampal Memory Consolidation. *The Journal of Neuroscience* 34, 12547-12559.

Barth, M., und Heisenberg, M. (1997). Vision Affects Mushroom Bodies and Central Complex in *Drosophila melanogaster*. *Learning & Memory* 4, 219-229.

Bear, M.F., Engel, A.K., Held, A., Connors, B.W., Niehaus-Osterloh, M., und Paradiso, M.A. (2018). *Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie* (Springer Berlin Heidelberg).

Bellen, H.J., und Yamamoto, S. (2015). Morgan's Legacy: Fruit Flies and the Functional Annotation of Conserved Genes. *Cell* 163, 12-14.

Ben-Nun, A., Guershon, M., und Ayali, A. (2013). Self body-size perception in an insect. *Die Naturwissenschaften* 100, 479-484.

- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
- Bernardinelli, Y., Nikonenko, I., und Muller, D. (2014). Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroanatomy* 8, 123.
- Bernhard, L. (2019). Modulation der Aktivität durch stressbedingten Schlafentzug in verschiedenen Verhaltensparadigmen von *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit.
- Billeter, J.-C., und Wolfner, M.F. (2018). Chemical Cues that Guide Female Reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Chemical Ecology* 44, 750-769.
- Bökel, C. (2008). EMS Screens. In *Drosophila: Methods and Protocols*, C. Dahmann, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 119–138.
- Brand, A.H., und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Buchanan, S.M., Kain, J.S., und Bivort, B.L. de (2015). Neuronal control of locomotor handedness in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 6700-6705.
- Burne, T., Scott, E., van Swinderen, B., Hilliard, M., Reinhard, J., Claudianos, C., Eyles, D., und McGrath, J. (2011). Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish? *Molecular Psychiatry* 16, 7-16.
- Caroni, P., Donato, F., und Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nature Reviews. Neuroscience* 13, 478-490.
- Chen, F., Tillberg, P.W., und Boyden, E.S. (2015). Expansion microscopy. *Science* 347, 543-548.
- Chen, Y., Akin, O., Nern, A., Tsui, C.Y.K., Pecot, M.Y., und Zipursky, S.L. (2014). Cell-type Specific Labeling of Synapses *in vivo* through Synaptic Tagging with Recombination (STaR). *Neuron* 81, 280-293.
- Clapier, C.R., und Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual Review of Biochemistry* 78, 273-304.
- Colomb, J., Kaiser, L., Chabaud, M.-A., und Preat, T. (2009). Parametric and genetic analysis of *Drosophila* appetitive long-term memory and sugar motivation. *Genes, Brain, and Behavior* 8, 407-415.

- Davis, R.L. (2005). OLFACTORY MEMORY FORMATION IN *DROSOPHILA*: From Molecular to Systems Neuroscience. *Annual Review of Neuroscience* 28, 275-302.
- Day, J.J., und Sweatt, J.D. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 70, 813-829.
- Devaud, J.-M., Acebes, A., und Ferrús, A. (2001). Odor Exposure Causes Central Adaptation and Morphological Changes in Selected Olfactory Glomeruli in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 21, 6274.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., und Scheiblauer, S., et al. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448, 151-156.
- Donlea, J.M., Pimentel, D., und Miesenböck, G. (2014). Neuronal Machinery of Sleep Homeostasis in *Drosophila*. *Neuron* 81, 860-872.
- Donlea, J.M., Pimentel, D., Talbot, C.B., Kempf, A., Omoto, J.J., Hartenstein, V., und Miesenböck, G. (2018). Recurrent Circuitry for Balancing Sleep Need and Sleep. *Neuron* 97, 378-389.e4.
- Dorafshan, E., Kahn, T.G., und Schwartz, Y.B. (2017). Hierarchical recruitment of Polycomb complexes revisited. *Nucleus* 8, 496-505.
- Drier, E.A., Tello, M.K., Cowan, M., Wu, P., Blace, N., Sacktor, T.C., und Yin, J.C.P. (2002). Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nature Neuroscience* 5, 316-324.
- Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology* 55, 51-86.
- Dudai, Y., Jan, Y.N., Byers, D., Quinn, W.G., und 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.
- Eiglsperger, B. (2001). Differenziertes Raumwahrnehmen im plastischen Gestaltungsprozess: eine Untersuchung zur Anwendung des "Cognitive-apprenticeship-Ansatzes" beim Modellieren eines Selbstporträts (Utz, Wiss).
- Fiumara, F., Rajasethupathy, P., Antonov, I., Kosmidis, S., Sossin, W.S., und Kandel, E.R. (2015). MicroRNA-22 Gates Long-Term Heterosynaptic Plasticity in *Aplysia*

through Presynaptic Regulation of CPEB and Downstream Targets. *Cell Reports* 11, 1866-1875.

Franconville, R., Beron, C., und Jayaraman, V. (2018). Building a functional connectome of the *Drosophila* central complex. *eLife* 7, e37017.

Gargano, J.W., Martin, I., Bhandari, P., und Grotewiel, M.S. (2005). Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental Gerontology* 40, 386-395.

Glanzman, D.L. (2010). Common mechanisms of synaptic plasticity in vertebrates and invertebrates. *Current Biology* 20, R31-6.

Goodwin, S.F., Del Vecchio, M., Velinzon, K., Hogel, C., Russell, S.R.H., Tully, T., und Kaiser, K. (1997). Defective Learning in Mutants of the *Drosophila* Gene for a Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience* 17, 8817-8827.

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

Gratz, S.J., Rubinstein, C.D., Harrison, M.M., Wildonger, J., und O'Connor-Giles, K.M. (2015). CRISPR-Cas9 Genome Editing in *Drosophila*. *Current Protocols in Molecular Biology* 111, 31.2.1-20.

Griffith, L.C., Verselis, L.M., Aitken, K.M., Kyriacou, C.P., Danho, W., und Greenspan, R.J. (1993). Inhibition of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase in *Drosophila* Disrupts Behavioral Plasticity. *Neuron* 10, 501-509.

Groth, A.C. (2004). Construction of Transgenic *Drosophila* by Using the Site-Specific Integrase From Phage phiC31. *Genetics* 166, 1775-1782.

Guo, F., Holla, M., Díaz, M.M., und Rosbash, M. (2018). A Circadian Output Circuit Controls Sleep-Wake Arousal in *Drosophila*. *Neuron* 100, 624-635.e4.

Hamada, F.N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S.R., Ghezzi, A., Jegla, T.J., und Garrity, P.A. (2008). An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* 454, 217-220.

Hanai, S., Hamasaka, Y., und Ishida, N. (2008). Circadian entrainment to red light in *Drosophila*: requirement of *Rhodopsin 1* and *Rhodopsin 6*. *Neuroreport* 19, 1441-1444.

- Hanesch, U., Fischbach, K.-F., und Heisenberg, M. (1989). Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research* 257, 343-366.
- Heigwer, F., Port, F., und Boutros, M. (2018). RNA Interference (RNAi) Screening in *Drosophila*. *Genetics* 208, 853-874.
- Heinze, S., und Homberg, U. (2007). Maplike Representation of Celestial *E*-Vector Orientations in the Brain of an Insect. *Science* 315, 995-997.
- Heisenberg, M., und Wolf, R. (1984). *Vision in Drosophila: Genetics of Microbehavior* (Springer-Verlag).
- Helfrich-Förster, C. (2018). Sleep in Insects. *Annual Review of Entomology* 63, 69-86.
- Henry, G.L., Davis, F.P., Picard, S., und Eddy, S.R. (2012). Cell type-specific genomics of *Drosophila* neurons. *Nucleic Acids Research* 40, 9691-9704.
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience* 3, 1-11.
- Hirano, Y., Ihara, K., Masuda, T., Yamamoto, T., Iwata, I., Takahashi, A., Awata, H., Nakamura, N., Takakura, M., und Suzuki, Y., et al. (2016). Shifting transcriptional machinery is required for long-term memory maintenance and modification in *Drosophila* mushroom bodies. *Nature Communications* 7, 13471.
- Horiuchi, J. (2019). Recurrent loops: Incorporating prediction error and semantic/episodic theories into *Drosophila* associative memory models. *Genes, Brain, and Behavior*, e12567.
- Hotta, Y., und Benzer, S. (1976). Courtship in *Drosophila* mosaics: sex-specific foci for sequential action patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 4154-4158.
- International Human Genome Sequencing Consortium, Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., und Doyle, M., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

- Iwai, Y., Usui, T., Hirano, S., Steward, R., Takeichi, M., und Uemura, T. (1997). Axon Patterning Requires D N-cadherin, a Novel Neuronal Adhesion Receptor, in the *Drosophila* Embryonic CNS. *Neuron* 19, 77-89.
- Javois, L.C. (1994). *Immunocytochemical Methods and Protocols* (Humana Press).
- Jenett, A., Rubin, G.M., Ngo, T.-T.B., Shepherd, D., Murphy, C., Dionne, H., Pfeiffer, B.D., Cavallaro, A., Hall, D., und Jeter, J., et al. (2012). A GAL4-Driver Line Resource for *Drosophila* Neurobiology. *Cell Reports* 2, 991-1001.
- Jones, S.G., Nixon, K.C.J., Chubak, M.C., und Kramer, J.M. (2018). Mushroom Body Specific Transcriptome Analysis Reveals Dynamic Regulation of Learning and Memory Genes After Acquisition of Long-Term Courtship Memory in *Drosophila*. *G3* 8, 3433-3446.
- Kacsoh, B.Z., Lynch, Z.R., Mortimer, N.T., und Schlenke, T.A. (2013). Fruit Flies Medicate Offspring After Seeing Parasites. *Science* 339, 947-950.
- Kandel, E.R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* 294, 1030-1038.
- Kandel, E.R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular Brain* 5, 1-12.
- Kandel, E.R., Dudai, Y., und Mayford, M.R. (2014). The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell* 157, 163-186.
- Kassis, J.A., Kennison, J.A., und Tamkun, J.W. (2017). Polycomb and Trithorax Group Genes in *Drosophila*. *Genetics* 206, 1699-1725.
- Keller, C.I., und Akhtar, A. (2015). The MSL complex: juggling RNA-protein interactions for dosage compensation and beyond. *Current Opinion in Genetics & Development* 31, 1-11.
- Kienitz, B. (2010). *Motorisches Lernen in *Drosophila melanogaster**. Zugl.: Mainz, Univ., Diss., 2010 (Aachen: Shaker).
- Kirilly, D., Wong, J.J.L., Lim, E.K.H., Wang, Y., Zhang, H., Wang, C., Liao, Q., Wang, H., Liou, Y.-C., und Wang, H., et al. (2011). Intrinsic Epigenetic Factors Cooperate with the Steroid Hormone Ecdysone to Govern Dendrite Pruning in *Drosophila*. *Neuron* 72, 86-100.

- Konopka, R.J., und Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 2112-2116.
- Kramer, J.M., Kochinke, K., Oortveld, M.A.W., Marks, H., Kramer, D., Jong, E.K. de, Asztalos, Z., Westwood, J.T., Stunnenberg, H.G., und Sokolowski, M.B., et al. (2011). Epigenetic regulation of learning and memory by *Drosophila* EHMT/G9a. *PLoS Biology* 9, e1000569.
- Krause, T. (2015). Physiologie eines erlernten Körpermodells bei *Drosophila melanogaster*. Dissertation.
- Krause, T., Spindler, L., Poeck, B., und Strauss, R. (2019). *Drosophila* Acquires a Long-Lasting Body-Size Memory from Visual Feedback. *Current Biology* 29, 1833-1841.
- Krüttner, S., Traunmüller, L., Dag, U., Jandrasits, K., Stepien, B., Iyer, N., Fradkin, L.G., Noordermeer, J.N., Menseh, B.D., und Keleman, K. (2015). Synaptic Orb2A Bridges Memory Acquisition and Late Memory Consolidation in *Drosophila*. *Cell Reports* 11, 1953-1965.
- Kuntz, S., Poeck, B., und Strauss, R. (2017). Visual Working Memory Requires Permissive and Instructive NO/cGMP Signaling at Presynapses in the *Drosophila* Central Brain. *Current Biology* 27, 613-623.
- Lagasse, F., Devaud, J.-M., und Mery, F. (2009). A Switch from Cycloheximide-Resistant Consolidated Memory to Cycloheximide-Sensitive Reconsolidation and Extinction in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 29, 2225-2230.
- Lai, S.-L., und Lee, T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nature Neuroscience* 9, 703-709.
- Lamaze, A., Krätschmer, P., Chen, K.-F., Lowe, S., und Jepson, J.E.C. (2018). A Wake-Promoting Circadian Output Circuit in *Drosophila*. *Current Biology* 28, 3098-3105.e3.
- LeDoux, J. (2003). The Emotional Brain, Fear, and the Amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology* 23, 727-738.
- Lee, D. (2015). Global and local missions of cAMP signaling in neural plasticity, learning, and memory. *Frontiers in Pharmacology* 6, 161.

- Levenson, J.M., und Sweatt, J.D. (2006). Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 1009-1016.
- Levin, L.R., Han, P.-L., Hwang, P.M., Feinstein, P.G., Davis, R.L., und Reed, R.R. (1992). The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺ calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* 68, 479-489.
- Li, W., Cressy, M., Qin, H., Fulga, T., van Vactor, D., und Dubnau, J. (2013). MicroRNA-276a functions in ellipsoid body and mushroom body neurons for naive and conditioned olfactory avoidance in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 33, 5821-5833.
- Li, W., und Dubnau, J. (2012). A prion-mediated mechanism for memory proposed in *Drosophila*. *Neuron* 76, 260-262.
- Li, W., Ohlmeyer, J.T., Lane, M.E., und Kalderon, D. (1995). Function of Protein Kinase A in Hedgehog Signal Transduction and *Drosophila* Imaginal Disc Development. *Cell* 80, 553-562.
- Lin, C.-Y., Chuang, C.-C., Hua, T.-E., Chen, C.-C., Dickson, B.J., Greenspan, R.J., und Chiang, A.-S. (2013). A Comprehensive Wiring Diagram of the Protocerebral Bridge for Visual Information Processing in the *Drosophila* Brain. *Cell Reports* 3, 1739-1753.
- Liu, G., Seiler, H., Wen, A., Zars, T., Ito, K., Wolf, R., Heisenberg, M., und Liu, L. (2006). Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* 439, 551-556.
- Luan, H., Peabody, N.C., Vinson, C.R., und White, B.H. (2006). Refined Spatial Manipulation of Neuronal Function by Combinatorial Restriction of Transgene Expression. *Neuron* 52, 425-436.
- Ma, Z., Wang, H., Cai, Y., Wang, H., Niu, K., Wu, X., Ma, H., Yang, Y., Tong, W., und Liu, F., et al. (2018). Epigenetic drift of H3K27me3 in aging links glycolysis to healthy longevity in *Drosophila*. *eLife* 7, e35368.
- Macpherson, L.J., Zaharieva, E.E., Kearney, P.J., Alpert, M.H., Lin, T.-Y., Turan, Z., Lee, C.-H., und Gallio, M. (2015). Dynamic labelling of neural connections in multiple

colours by trans-synaptic fluorescence complementation. *Nature Communications* 6, 10024.

Malik, B.R., und Hodge, J.J.L. (2014). *CASK and CaMKII function in Drosophila memory*. *Frontiers in Neuroscience* 8, 178.

Matsumoto, Y., Matsumoto, C.S., und Mizunami, M. (2018). *Signaling Pathways for Long-Term Memory Formation in the Cricket*. *Frontiers in Psychology* 9, 1014.

Matsumoto, Y., und Mizunami, M. (2002a). *Lifetime olfactory memory in the cricket Gryllus bimaculatus*. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 188, 295-299.

Matsumoto, Y., und Mizunami, M. (2002b). *Temporal determinants of long-term retention of olfactory memory in the cricket Gryllus bimaculatus*. *Journal of Experimental Biology* 205, 1429-1437.

Matsumoto, Y., Sandoz, J.-C., Devaud, J.-M., Lormant, F., Mizunami, M., und Giurfa, M. (2014). *Cyclic nucleotide-gated channels, calmodulin, adenylyl cyclase, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II are required for late, but not early, long-term memory formation in the honeybee*. *Learning & Memory* 21, 272-286.

McBride, S.M.J., Giuliani, G., Choi, C., Krause, P., Correale, D., Watson, K., Baker, G., und Siwicki, K.K. (1999). *Mushroom Body Ablation Impairs Short-Term Memory and Long-Term Memory of Courtship Conditioning in Drosophila melanogaster*. *Neuron* 24, 967-977.

McCormick, D.A., Clark, G.A., Lavond, D.G., und Thompson, R.F. (1982). *Initial localization of the memory trace for a basic form of learning*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 2731-2735.

McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., und Davis, R.L. (2003). *Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in Drosophila*. *Science* 302, 1765-1768.

McGuire, S.E., Mao, Z., und Davis, R.L. (2004). *Spatiotemporal Gene Expression Targeting with the TARGET and Gene-Switch Systems in Drosophila*. *Science's Signal Transduction Knowledge Environment* 2004, pl6.

Menzel, R. (1968). *Das Gedächtnis der Honigbiene für Spektralfarben*. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 60, 82-102.

- Miller, C.A., und Sweatt, J.D. (2007). Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron* 53, 857-869.
- Miyashita, T., Kikuchi, E., Horiuchi, J., und Saitoe, M. (2018). Long-Term Memory Engram Cells Are Established by c-Fos/CREB Transcriptional Cycling. *Cell Reports* 25, 2716-2728.e3.
- Miyashita, T., Oda, Y., Horiuchi, J., Yin, J.C.P., Morimoto, T., und Saitoe, M. (2012). Mg²⁺ Block of *Drosophila* NMDA Receptors Is Required for Long-Term Memory Formation and CREB-Dependent Gene Expression. *Neuron* 74, 887-898.
- Mo, A., Mukamel, E.A., Davis, F.P., Luo, C., Henry, G.L., Picard, S., Urich, M.A., Nery, J.R., Sejnowski, T.J., und Lister, R., et al. (2015). Epigenomic Signatures of Neuronal Diversity in the Mammalian Brain. *Neuron* 86, 1369-1384.
- Mummery-Widmer, J.L., Yamazaki, M., Stoeger, T., Novatchkova, M., Bhalerao, S., Chen, D., Dietzl, G., Dickson, B.J., und Knoblich, J.A. (2009). Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* 458, 987-992.
- Neuser, K., Triphan, T., Mronz, M., Poeck, B., und Strauss, R. (2008). Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* 453, 1244-1247.
- Ni, J.-Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L.-P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H.-S., Tao, R., Handler, D., und Karpowicz, P., et al. (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nature Methods* 8, 405-407.
- Nicholson, L., Singh, G.K., Osterwalder, T., Roman, G.W., Davis, R.L., und Keshishian, H. (2008). Spatial and Temporal Control of Gene Expression in *Drosophila* Using the Inducible GeneSwitch GAL4 system. I. Screen for Larval Nervous System Drivers. *Genetics* 178, 215-234.
- Nicolaï, L.J.J., Ramaekers, A., Raemaekers, T., Drozdzecki, A., Mauss, A.S., Yan, J., Landgraf, M., Annaert, W., und Hassan, B.A. (2010). Genetically encoded dendritic marker sheds light on neuronal connectivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 20553-20558.
- Nicolas, G. (1989). Immediate And Latent Effects Of Carbon Dioxide On Insects. *Annual Review of Entomology* 34, 97-116.

- Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L., und Hardesty, B. (1971). The Mechanism by which Cycloheximide and Related Glutarimide Antibiotics Inhibit Peptide Synthesis on Reticulocyte Ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* 246, 174-181.
- Ofstad, T.A., Zuker, C.S., und Reiser, M.B. (2011). Visual place learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 474, 204-207.
- O'Kane, C.J., und Gehring, W.J. (1987). Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9123.
- Omoto, J.J., Nguyen, B.-C.M., Kandimalla, P., Lovick, J.K., Donlea, J.M., und Hartenstein, V. (2018). Neuronal Constituents and Putative Interactions Within the *Drosophila* Ellipsoid Body Neuropil. *Frontiers in Neural Circuits* 12, 103.
- Osterwalder, T., Yoon, K.S., White, B.H., und Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12596-12601.
- Ota, K.T., Pierre, V.J., Ploski, J.E., Queen, K., und Schafe, G.E. (2008). The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learning & Memory* 15, 792-805.
- Pan, Y., Zhou, Y., Guo, C., Gong, H., Gong, Z., und Liu, L. (2009). Differential roles of the fan-shaped body and the ellipsoid body in *Drosophila* visual pattern memory. *Learning & Memory* 16, 289-295.
- Parisky, K.M., Agosto Rivera, J.L., Donelson, N.C., Kotecha, S., und Griffith, L.C. (2016). Reorganization of Sleep by Temperature in *Drosophila* Requires Light, the Homeostat, and the Circadian Clock. *Current Biology* 26, 882-892.
- Pech, U., Dipt, S., Barth, J., Singh, P., Jauch, M., Thum, A.S., Fiala, A., und Riemensperger, T. (2013). Mushroom body miscellanea: transgenic *Drosophila* strains expressing anatomical and physiological sensor proteins in Kenyon cells. *Frontiers in Neural Circuits* 7, 147.
- Perazzona, B., Isabel, G., Preat, T., und Davis, R.L. (2004). The Role of cAMP Response Element-Binding Protein in *Drosophila* Long-Term Memory. *The Journal of Neuroscience* 24, 8823-8828.

- Perisse, E., Yin, Y., Lin, A.C., Lin, S., Huetteroth, W., und Waddell, S. (2013). Different Kenyon Cell Populations Drive Learned Approach and Avoidance in *Drosophila*. *Neuron* 79, 945-956.
- Perkins, L.A., Holderbaum, L., Tao, R., Hu, Y., Sopko, R., McCall, K., Yang-Zhou, D., Flockhart, I., Binari, R., und Shim, H.-S., et al. (2015). The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation. *Genetics* 201, 843-852.
- Perry, S., Kiragasi, B., Dickman, D., und Ray, A. (2017). The Role of Histone Deacetylase 6 in Synaptic Plasticity and Memory. *Cell Reports* 18, 1337-1345.
- Pfeiffer, B.D., Jenett, A., Hammonds, A.S., Ngo, T.-T.B., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J.W., Wan, K.H., und Laverty, T.R., et al. (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9715-9720.
- Pfeiffer, B.D., Ngo, T.-T.B., Hibbard, K.L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J.W., und Rubin, G.M. (2010). Refinement of Tools for Targeted Gene Expression in *Drosophila*. *Genetics* 186, 735-755.
- Pick, S., und Strauss, R. (2005). Goal-driven behavioral adaptations in gap-climbing *Drosophila*. *Current Biology* 15, 1473-1478.
- Poeck, B., Triphan, T., Neuser, K., und Strauss, R. (2008). Locomotor Control by the Central Complex in *Drosophila*—An Analysis of the *tay bridge* Mutant. *Developmental Neurobiology* 68, 1046-1058.
- Port, F., Chen, H.-M., Lee, T., und Bullock, S.L. (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E2967-76.
- Potter, C.J., und Luo, L. (2011). Using the Q system in *Drosophila melanogaster*. *Nature Protocols* 6, 1105-1120.
- Pulver, S.R., und Berni, J. (2012). The Fundamentals of Flying: Simple and Inexpensive Strategies for Employing *Drosophila* Genetics in Neuroscience Teaching Laboratories. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education* 11, A139-A148.
- Quinn, W.G., Harris, W.A., und Benzer, S. (1974). Conditioned Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 708-712.

- Raja, S.J., Charapitsa, I., Conrad, T., Vaquerizas, J.M., Gebhardt, P., Holz, H., Kadlec, J., Fraterman, S., Luscombe, N.M., und Akhtar, A. (2010). The Nonspecific Lethal Complex Is a Transcriptional Regulator in *Drosophila*. *Molecular Cell* 38, 827-841.
- Rajasethupathy, P., Fiumara, F., Sheridan, R., Betel, D., Puthanveetil, S.V., Russo, J.J., Sander, C., Tuschl, T., und Kandel, E. (2009). Characterization of Small RNAs in *Aplysia* Reveals a Role for miR-124 in Constraining Synaptic Plasticity Through CREB. *Neuron* 63, 803-817.
- Ramos-Vara, J.A. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 42, 405-426.
- Renn, S.C.P., Armstrong, J.D., Yang, M., Wang, Z., An, X., Kaiser, K., und Taghert, P.H. (1999). Genetic Analysis of the *Drosophila* Ellipsoid Body Neuropil: Organization and Development of the Central Complex. *Journal of Neurobiology* 41, 189-207.
- Ries, A.-S., Hermanns, T., Poeck, B., und Strauss, R. (2017). Serotonin modulates a depression-like state in *Drosophila* responsive to lithium treatment. *Nature Communications* 8, 15738.
- Roessingh, S., und Stanewsky, R. (2017). The *Drosophila* TRPA1 Channel and Neuronal Circuits Controlling Rhythmic Behaviours and Sleep in Response to Environmental Temperature. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 2028.
- Roman, G., Endo, K., Zong, L., und Davis, R.L. (2001). P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12602-12607.
- Rubin, G.M. (2000). A Brief History of *Drosophila*'s Contributions to Genome Research. *Science* 287, 2216-2218.
- Rubin, G.M., und Spradling, A.C. (1982). Genetic Transformation of *Drosophila* with Transposable Element Vectors. *Science* 218, 348.
- Sakai, T., und Kitamoto, T. (2006). Differential Roles of Two Major Brain Structures, Mushroom Bodies and Central Complex, for *Drosophila* Male Courtship Behavior. *Journal of Neurobiology* 66, 821-834.

- Sakura, M., und Mizunami, M. (2001). Olfactory Learning and Memory in the Cockroach *Periplaneta americana*. *Zoological Science* 18, 21-28.
- Schermer, F.J. (2006). Lernen und Gedächtnis (Kohlhammer).
- Schratt, G. (2009). Fine-tuning neural gene expression with microRNAs. *Current Opinion in Neurobiology* 19, 213-219.
- Schunter, S., Villa, R., Flynn, V., Heidelberger, J.B., Classen, A.-K., Beli, P., und Becker, P.B. (2017). Ubiquitylation of the acetyltransferase MOF in *Drosophila melanogaster*. *PloS One* 12, e0177408.
- Seino, S., und Shibasaki, T. (2005). PKA-Dependent and PKA-Independent Pathways for cAMP-Regulated Exocytosis. *Physiological Reviews* 85, 1303-1342.
- Shearin, H.K., Quinn, C.D., Mackin, R.D., Macdonald, I.S., und Stowers, R.S. (2018). t-GRASP, a targeted GRASP for assessing neuronal connectivity. *Journal of Neuroscience Methods* 306, 94-102.
- Simpson, J.H. (2009). Chapter 3 Mapping and Manipulating Neural Circuits in the Fly Brain. In *Advances in Genetics : Genetic Dissection of Neural Circuits and Behavior* (Academic Press), pp. 79–143.
- Siomava, N., Wimmer, E.A., und Posnien, N. (2016). Size relationships of different body parts in the three dipteran species *Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata* and *Musca domestica*. *Development Genes and Evolution* 226, 245-256.
- Spradling, A.C., und Rubin, G.M. (1982). Transposition of Cloned P Elements into *Drosophila* Germ Line Chromosomes. *Science* 218, 341-347.
- Steiner, F.A., und Henikoff, S. (2015). Cell Type-Specific Affinity Purification of Nuclei for Chromatin Profiling in Whole Animals. In *The Nucleus*, R. Hancock, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 3–14.
- Strauss, R. (2002). The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Current Opinion in Neurobiology* 12, 633-638.
- Strauss, R., und Heisenberg, M. (1993). A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *The Journal of Neuroscience* 13, 1852-1861.
- Sun, L., Fernandez, H.R., Donohue, R.C., Li, J., Cheng, J., und Birchler, J.A. (2013). Male-specific lethal complex in *Drosophila* counteracts histone acetylation and does

not mediate dosage compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E808-17.

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

Talay, M., Richman, E.B., Snell, N.J., Hartmann, G.G., Fisher, J.D., Sorkaç, A., Santoyo, J.F., Chou-Freed, C., Nair, N., und Johnson, M., et al. (2017). Transsynaptic Mapping of Second-Order Taste Neurons in Flies by *trans*-Tango. *Neuron* 96, 783-795.e4.

Tan, F.H.P., und Azzam, G. (2017). *Drosophila melanogaster*: Deciphering Alzheimer's Disease. *The Malaysian Journal of Medical Sciences* 24, 6-20.

Tang, W.-J., Krupinski, J., und Gilman, A.G. (1991). Expression and Characterization of Calmodulin-activated (Type I) Adenylylcyclase. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 8595-8603.

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

Thran, J., Poeck, B., und Strauss, R. (2013). Serum Response Factor-Mediated Gene Regulation in a *Drosophila* Visual Working Memory. *Current Biology* 23, 1756-1763.

Thurmond, J., Goodman, J.L., Kaufman, T.C., Strelets, V.B., Calvi, B.R., Millburn, G., Antonazzo, G., Attrill, H., Marygold, S.J., und Trovisco, V., et al. (2018). FlyBase 2.0: the next generation. *Nucleic Acids Research* 47, D759-D765.

Tian, L., Hires, S.A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M.E., Chalasani, S.H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S.A., und Schreiter, E.R., et al. (2009). Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods* 6, 875-881.

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

- Tully, T., Bourchouladze, R., Scott, R., und Tallman, J. (2003). TARGETING THE CREB PATHWAY FOR MEMORY ENHANCERS. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 267-277.
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C., und Del Vecchio, M. (1994). Genetic Dissection of Consolidated Memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 35-47.
- Ueno, K., Suzuki, E., Naganos, S., Ofusa, K., Horiuchi, J., Saitoe, M., und Griffith, L.C. (2017). Coincident postsynaptic activity gates presynaptic dopamine release to induce plasticity in *Drosophila* mushroom bodies. *eLife* 6, e21076.
- Vensko, S.P., und Stone, E.A. (2015). Recent progress and open questions in *Drosophila* dosage compensation. *Fly* 9, 29-35.
- Wilson, R.I., und Laurent, G. (2005). Role of GABAergic Inhibition in Shaping Odor-Evoked Spatiotemporal Patterns in the *Drosophila* Antennal Lobe. *The Journal of Neuroscience* 25, 9069-9079.
- Wolff, T., Iyer, N.A., und Rubin, G.M. (2015). Neuroarchitecture and Neuroanatomy of the *Drosophila* Central Complex: A GAL4-Based Dissection of Protocerebral Bridge Neurons and Circuits. *The Journal of Comparative Neurology* 523, 997-1037.
- Wolff, T., und Rubin, G.M. (2018). Neuroarchitecture of the *Drosophila* Central Complex: A Catalog of Nodulus and Asymmetrical Body Neurons and a Revision of the Protocerebral Bridge Catalog. *The Journal of Comparative Neurology* 526, 2585-2611.
- Wu, J.-K., Tai, C.-Y., Feng, K.-L., Chen, S.-L., Chen, C.-C., und Chiang, A.-S. (2017). Long-term memory requires sequential protein synthesis in three subsets of mushroom body output neurons in *Drosophila*. *Scientific Reports* 7, 7112.
- Xia, S., Miyashita, T., Fu, T.-F., Lin, W.-Y., Wu, C.-L., Pyzocha, L., Lin, I.-R., Saitoe, M., Tully, T., und Chiang, A.-S. (2005). NMDA Receptors Mediate Olfactory Learning and Memory in *Drosophila*. *Current Biology* 15, 603-615.
- Xue, Z., Wu, M., Wen, K., Ren, M., Long, L., Zhang, X., und Gao, G. (2014). CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in *Drosophila*. *G3* 4, 2167-2173.

Yamazaki, D., Hiroi, M., Abe, T., Shimizu, K., Minami-Ohtsubo, M., Maeyama, Y., Horiuchi, J., und Tabata, T. (2018). Two Parallel Pathways Assign Opposing Odor Valences during *Drosophila* Memory Formation. *Cell Reports* 22, 2346-2358.

Yin, J.C.P., Wallach, J.S., Del Vecchio, M., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G., und Tully, T. (1994). Induction of a Dominant Negative CREB Transgene Specifically Blocks Long-Term Memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 49-58.

Young, J.M., und Armstrong, J.D. (2010). Structure of the Adult Central Complex in *Drosophila*: Organization of Distinct Neuronal Subsets. *The Journal of Comparative Neurology* 518, 1500-1524.

Yu, D., Akalal, D.-B.G., und Davis, R.L. (2006). *Drosophila* alpha/beta Mushroom Body Neurons Form a Branch-Specific, Long-Term Cellular Memory Trace After Spaced Olfactory Conditioning. *Neuron* 52, 845-855.

Zars, T., Wolf, R., Davis, R., und Heisenberg, M. (2000). Tissue-Specific Expression of a Type I Adenylyl Cyclase Rescues the *rutabaga* Mutant Memory Defect: In Search of the Engram. *Learning & Memory* 7, 18-31.

8 Verzeichnisse

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prä- und postsynaptische Mechanismen der klassischen Konditionierung.	9
Abbildung 2: Das GAL4/UAS-System.	12
Abbildung 3: Der Zentralkomplex inkl. akzessorischer Neuropile.	16
Abbildung 4: Das Kletterverhalten einer wildtypischen männlichen <i>Drosophila</i> .	19
Abbildung 5: Modell des Körperreichweitenlernens.	23
Abbildung 6: Der Aufbau der Kletterapparatur.	37
Abbildung 7: Training naiver Fliegen.	39
Abbildung 8: Graphische Darstellung spatio-temporaler Versuchsreihen.	41
Abbildung 9: Charakterisierung der $\Delta 7$ -Neurone der Protozerebralbrücke.	53
Abbildung 10: Visualisierung des postsynaptischen PFN-Musters der $\Delta 7$ -Neurone.	54
Abbildung 11: Detektion synaptischer Kontakte zwischen $\Delta 7$ - und PFN-Neuronen.	59
Abbildung 12: Detektion synaptischer Kontakte zwischen PFN- und $\Delta 7$ -Neuronen.	60
Abbildung 13: Charakterisierung des potentiellen PFN-Treibers R84A01-GAL4.	64
Abbildung 14: Funktionale Verknüpfung zwischen $\Delta 7$ -Neuronen und PFN-Neuronen.	66
Abbildung 15: Das Erlernen der Körpergröße kennt keine kritische Phase.	67
Abbildung 16: Der Abruf der Körpergröße ist erst 12 Stunden (h) nach dem Lernen möglich.	69
Abbildung 17: Die Konsolidierung und Aufrechterhaltung der Körpergröße ist Proteinbiosynthese-abhängig.	71
Abbildung 18: dCREB2-Aktivität wird in den $\Delta 7$ -Neuronen für die Konsolidierung und Gedächtnisaufrechterhaltung der Körpergröße benötigt.	73
Abbildung 19: <i>Knock-Down</i> der dCREB2 Co-Aktivatoren <i>dCBP</i> und <i>Crtc</i> .	77
Abbildung 20: Analyse der Funktion von dCBP und CRTC in der Gedächtnisaufrechterhaltung.	79
Abbildung 21: Analyse der Funktion von dCBP und CRTC in der Gedächtnisaufrechterhaltung - Alternative Darstellung unter Berücksichtigung der Temperatur.	82
Abbildung 22: Erfolgreiche Kletterversuche der PcG-Mitglieder nach <i>Knock-Down</i> in den $\Delta 7$ -Neuronen der PB.	96
Abbildung 23: <i>Knock-Down</i> der Komponenten des MSL-Komplexes	99
Abbildung 24: Spatio-temporale Induktion von <i>mor</i> ^{RNAi} in den $\Delta 7$ -Neuronen.	101
Abbildung 25: Validierung der Linie R55G08- <i>Tub</i> > <i>GAL80</i> ^{ts} über PCR.	154
Abbildung 26: Immunhistochemische Analyse von Entwicklungsdefekten nach RNA-Interferenz.	192

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fliegenstämme	30
Tabelle 2: PCR-Programm	44
Tabelle 3: Primersequenzen für GAL4 und GAL80	44
Tabelle 4: Liste primärer und sekundärer Antikörper	46
Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Chemikalien der PCR und IHC	49
Tabelle 6: Analyse alternativer PFN-Treiber.	63
Tabelle 7: Liste getesteter epigenetischer Faktoren.	87
Tabelle 8: Übersicht zu den PcG Komplexen	94
Tabelle 9: Statistische Auswertung zu Abbildung 9B.	147
Tabelle 10: Statistische Auswertung zu Abbildung 9C.	147
Tabelle 11: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, 007Y> <i>dnc</i> ^{RNAi} .	147
Tabelle 12: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, 007Y> <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} .	147
Tabelle 13: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, 007Y> <i>dCreb2-a</i> .	148
Tabelle 14: Statistische Auswertung zu Tabelle 6 & Abbildung 13, R84A01> <i>dnc</i> ^{RNAi} .	148
Tabelle 15: Statistische Auswertung zu Tabelle 6 & Abbildung 13, R84A01> <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} .	148
Tabelle 16: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, R52B10> <i>dnc</i> ^{RNAi} .	148
Tabelle 17: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, R52B10> <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} .	149
Tabelle 18: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, R15D05> <i>dnc</i> ^{RNAi} .	149
Tabelle 19: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, R15D05> <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} .	149
Tabelle 20: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, R44B10> <i>dnc</i> ^{RNAi} .	150
Tabelle 21: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, R44B10> <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} .	150
Tabelle 22: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, R16D01> <i>dCreb2-a</i> .	150
Tabelle 23: Statistische Auswertung zu Abbildung 13, R84A01> <i>mC</i> [*] .	150
Tabelle 24: Statistische Auswertung zu Abbildung 15.	151
Tabelle 25: Statistische Auswertung zu Abbildung 16.	151
Tabelle 26: Statistische Auswertung zu Abbildung 17A.	152
Tabelle 27: Statistische Auswertung zu Abbildung 17B.	152
Tabelle 28: Statistische Auswertung zu Abbildung 18A.	152
Tabelle 29: Statistische Auswertung zu Abbildung 18B.	153
Tabelle 30: Statistische Auswertung zu Abbildung 18C.	153
Tabelle 31: Statistische Auswertung zu Abbildung 18D.	153
Tabelle 32: Statistische Auswertung zu Abbildung 19A.	154
Tabelle 33: Statistische Auswertung zu Abbildung 19B.	154
Tabelle 34: Statistische Auswertung zu Abbildung 19C.	155
Tabelle 35: Statistische Auswertung zu Abbildung 19D.	155
Tabelle 36: Statistische Auswertung zu Abbildung 19E.	155
Tabelle 37: Statistische Auswertung zu Abbildung 19F.	155
Tabelle 38: Statistische Auswertung zu Abbildung 20A.	156
Tabelle 39: Statistische Auswertung zu Abbildung 20B.	156
Tabelle 40: Statistische Auswertung zu Abbildung 20C.	156

Tabelle 41: Statistische Auswertung zu Abbildung 20D.	157
Tabelle 42: Statistische Auswertung zu Abbildung 21A	157
Tabelle 43: Statistische Auswertung zu Abbildung 21B	157
Tabelle 44: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Ada2b</i> ^{RNAi} (BDSC #31347).	158
Tabelle 45: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Ada3</i> ^{RNAi} (BDSC #28905).	158
Tabelle 46: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Ada3</i> ^{RNAi} (BDSC #32451).	158
Tabelle 47: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Art1</i> ^{RNAi} (BDSC #31348).	158
Tabelle 48: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Art4</i> ^{RNAi} (BDSC #31349).	159
Tabelle 49: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>ash1</i> ^{RNAi} (BDSC #31050).	159
Tabelle 50: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>ash2</i> ^{RNAi} (BDSC #35388).	159
Tabelle 51: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Bin1</i> ^{RNAi} (BDSC #31048).	159
Tabelle 52: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Caf1-180</i> ^{RNAi} (BDSC #28918).	160
Tabelle 53: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>CG1894</i> ^{RNAi} (BDSC #34925).	160
Tabelle 54: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Chd1</i> ^{RNAi} (BDSC #34665).	160
Tabelle 55: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>chm</i> ^{RNAi} (BDSC #27027).	160
Tabelle 56: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>chm</i> ^{RNAi} (BDSC #32484).	161
Tabelle 57: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Chrac-16</i> ^{RNAi} (BDSC #51155).	161
Tabelle 58: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>egg</i> ^{RNAi} (BDSC #31352).	161
Tabelle 59: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>enok</i> ^{RNAi} (BDSC #29518).	161
Tabelle 60: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>enok</i> ^{RNAi} (BDSC #40917).	162
Tabelle 61: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>esc</i> ^{RNAi} (BDSC #31618).	162
Tabelle 62: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>E(z)</i> ^{RNAi} (BDSC #31617).	162
Tabelle 63: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>G9a</i> ^{RNAi} (BDSC #31630).	163
Tabelle 64: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>gpp</i> ^{RNAi} (BDSC #31327).	163
Tabelle 65: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>HDAC1</i> ^{RNAi} (BDSC #31616).	163
Tabelle 66: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>HDAC3</i> ^{RNAi} (BDSC #31633).	163
Tabelle 67: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>HDAC4</i> ^{RNAi} (BDSC #28549).	164
Tabelle 68: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>HDAC6</i> ^{RNAi} (BDSC #31053).	164
Tabelle 69: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>HDAC11</i> ^{RNAi} (BDSC #32480).	164
Tabelle 70: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>kis</i> ^{RNAi} (BDSC #34908).	164
Tabelle 71: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>lid</i> ^{RNAi} (BDSC #28944).	164
Tabelle 72: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>LKRSDH</i> ^{RNAi} (BDSC #35470).	165
Tabelle 73: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 23B, R55G08> <i>mle</i> ^{RNAi} (BDSC #34864).	165
Tabelle 74: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>mor</i> ^{RNAi} (BDSC #33698).	165
Tabelle 75: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 23A, R55G08> <i>mor</i> ^{RNAi} (BDSC #36870).	166
Tabelle 76: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>mor</i> ^{RNAi} (BDSC #58281).	166
Tabelle 77: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>mor</i> ^{RNAi} (BDSC #31401).	166
Tabelle 78: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 23C, R55G08> <i>msl-1</i> ^{RNAi} (BDSC #39012).	166

Tabelle 79: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 23D, R55G08> <i>msl-3</i> ^{RNAi} (BDSC #35272).	167
Tabelle 80: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>NSD</i> ^{RNAi} (BDSC #34033).	167
Tabelle 81: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Pc</i> ^{RNAi} (BDSC #31110).	167
Tabelle 82: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Pc</i> ^{RNAi} (BDSC #33964).	168
Tabelle 83: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 22, R55G08> <i>Pc</i> ^{RNAi} (BDSC #31189).	168
Tabelle 84: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Pc</i> ^{RNAi} (BDSC #33945).	168
Tabelle 85: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>pho</i> ^{RNAi} (BDSC #31609).	169
Tabelle 86: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>PR-Set7</i> ^{RNAi} (BDSC #35322).	169
Tabelle 87: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>PR-Set7</i> ^{RNAi} (BDSC #67346).	169
Tabelle 88: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>psc</i> ^{RNAi} (BDSC #31611).	169
Tabelle 89: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>ptip</i> ^{RNAi} (BDSC #35269).	170
Tabelle 90: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>ptip</i> ^{RNAi} (BDSC #31741).	170
Tabelle 91: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Rff1</i> ^{RNAi} (BDSC #31718).	170
Tabelle 92: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>RYBP</i> ^{RNAi} (BDSC #33974).	170
Tabelle 93: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sce</i> ^{RNAi} (BDSC #31612).	171
Tabelle 94: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Scm</i> ^{RNAi} (BDSC #31614).	171
Tabelle 95: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Set1</i> ^{RNAi} (BDSC #33704).	171
Tabelle 96: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Set1</i> ^{RNAi} (VDRC #10833).	172
Tabelle 97: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Set1</i> ^{RNAi} (BDSC #40931).	172
Tabelle 98: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Set2</i> ^{RNAi} (BDSC #31355).	172
Tabelle 99: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sfmbt</i> ^{RNAi} (BDSC #28677).	172
Tabelle 100: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sin3A</i> ^{RNAi} (BDSC #32368).	173
Tabelle 101: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sirt1</i> ^{RNAi} (BDSC #32481).	173
Tabelle 102: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sirt1</i> ^{RNAi} (BDSC #53697).	173
Tabelle 103: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sirt2</i> ^{RNAi} (BDSC #31613).	174
Tabelle 104: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sirt2</i> ^{RNAi} (BDSC #36868).	174
Tabelle 105: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sirt4</i> ^{RNAi} (BDSC #31638).	174
Tabelle 106: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sirt6</i> ^{RNAi} (BDSC #31399).	174
Tabelle 107: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sirt6</i> ^{RNAi} (BDSC #34530).	175
Tabelle 108: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Sirt7</i> ^{RNAi} (BDSC #31093).	175
Tabelle 109: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Su(var)205</i> ^{RNAi} (BDSC #33400).	175
Tabelle 110: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Su(z)12</i> ^{RNAi} (BDSC #31191).	176
Tabelle 111: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Tip60</i> ^{RNAi} (BDSC #35243).	176
Tabelle 112: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Tip60</i> ^{RNAi} (BDSC #28563).	176
Tabelle 113: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Top2</i> ^{RNAi} (BDSC #35416).	176
Tabelle 114: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>Top2</i> ^{RNAi} (BDSC #31342).	177
Tabelle 115: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>tau</i> ^{RNAi} (BDSC #31637).	177
Tabelle 116: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>trr</i> ^{RNAi} (BDSC #29563).	177
Tabelle 117: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08> <i>trx</i> ^{RNAi} (BDSC #31092).	177

Tabelle 118: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08>YL-1 ^{RNAi} (BDSC #31938).	178
Tabelle 119: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, R55G08>YL-1 ^{RNAi} (#4621R-2).	178
Tabelle 120: Statistische Auswertung zu R55G08>mle ^{RNAi} (BDSC #34864), 3,5 mm Lücke.	179
Tabelle 121: Statistische Auswertung zu R55G08>msl-1 ^{RNAi} (BDSC #39012), 3,5 mm Lücke.	180
Tabelle 122: Statistische Auswertung zu R55G08>msl-3 ^{RNAi} (BDSC #35272), 3,5 mm Lücke.	180
Tabelle 123: Statistische Auswertung zu R55G08>mo1 ^{RNAi} (BDSC #36870), 3,5 mm Lücke.	180
Tabelle 124: Statistische Auswertung zu R55G08>mo1 ^{RNAi} (BDSC #33698), 3,5 mm Lücke.	181
Tabelle 125: Statistische Auswertung zu R55G08>mo1 ^{RNAi} (BDSC #58281), 3,5 mm Lücke.	181
Tabelle 126: Statistische Auswertung zu R55G08>Pc ^{RNAi} (BDSC #31110), 3,5 mm Lücke.	182
Tabelle 127: Statistische Auswertung zu R55G08>Pc ^{RNAi} (BDSC #31189), 3,5 mm Lücke.	182
Tabelle 128: Statistische Auswertung zu R55G08>ptip ^{RNAi} (BDSC #31741), 3,5 mm Lücke.	182
Tabelle 129: Statistische Auswertung zu R55G08>Set1 ^{RNAi} (VDRG #10833), 3,5 mm Lücke.	183
Tabelle 130: Statistische Auswertung zu R55G08>Set1 ^{RNAi} (BDSC #33704), 3,5 mm Lücke.	183
Tabelle 131: Statistische Auswertung zu R55G08>Sirt6 ^{RNAi} (BDSC #34530), 3,5 mm Lücke.	184
Tabelle 132: Statistische Auswertung zu R55G08>Tip60 ^{RNAi} (BDSC #28563), 3,5 mm Lücke.	184
Tabelle 133: Statistische Auswertung zu R55G08>Top2 ^{RNAi} (BDSC #31342), 3,5 mm Lücke.	184
Tabelle 134: Statistische Auswertung zu R55G08>mle ^{RNAi} (BDSC #34864), Beinlängen.	186
Tabelle 135: Statistische Auswertung zu R55G08>msl-1 ^{RNAi} (BDSC #39012), Beinlängen.	186
Tabelle 136: Statistische Auswertung zu R55G08>msl-3 ^{RNAi} (BDSC #35272), Beinlängen.	186
Tabelle 137: Statistische Auswertung zu R55G08>mo1 ^{RNAi} (BDSC #36870), Beinlängen.	187
Tabelle 138: Statistische Auswertung zu R55G08>mo1 ^{RNAi} (BDSC #33698), Beinlängen.	187
Tabelle 139: Statistische Auswertung zu R55G08>mo1 ^{RNAi} (BDSC #58281), Beinlängen.	188
Tabelle 140: Statistische Auswertung zu R55G08>Pc ^{RNAi} (BDSC #31110), Beinlängen.	188
Tabelle 141: Statistische Auswertung zu R55G08>Pc ^{RNAi} (BDSC #31189), Beinlängen.	188
Tabelle 142: Statistische Auswertung zu R55G08>ptip ^{RNAi} (BDSC #31741), Beinlängen.	189
Tabelle 143: Statistische Auswertung zu R55G08>Set1 ^{RNAi} (VRDC #10833), Beinlängen.	189
Tabelle 144: Statistische Auswertung zu R55G08>Set1 ^{RNAi} (BDSC #33704), Beinlängen.	190
Tabelle 145: Statistische Auswertung zu R55G08>Sirt6 ^{RNAi} (BDSC #34530), Beinlängen.	190
Tabelle 146: Statistische Auswertung zu R55G08>Tip60 ^{RNAi} (BDSC #28563), Beinlängen.	190
Tabelle 147: Statistische Auswertung zu R55G08>Top2 ^{RNAi} (BDSC #31342), Beinlängen.	191
Tabelle 148: Statistische Auswertung zu Abbildung 23E, R55G08>mo1 ^{RNAi} (BDSC #36870), Weibchen.	193
Tabelle 149: Statistische Auswertung zu Abbildung 23F, R55G08>mle ^{RNAi} (BDSC #34864), Weibchen.	193
Tabelle 150: Statistische Auswertung zu Abbildung 23G, R55G08>msl-1 ^{RNAi} (BDSC #39012), Weibchen.	194
Tabelle 151: Statistische Auswertung zu Abbildung 23H, R55G08>msl-3 ^{RNAi} (BDSC #35272), Weibchen.	194
Tabelle 152: Statistische Auswertung zu mo1 ^{RNAi} /+; R55G08-Tub>GAL80 ^{ts} /+, Protokoll 2.4A.	194
Tabelle 153: Statistische Auswertung zu mo1 ^{RNAi} /+; R55G08-Tub>GAL80 ^{ts} /+, Protokoll 2.4B.	195

8.3 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylzyklase
Ada2b	transcriptional Adaptor 2b
Ada3	transcriptional Adaptor 3
AK	Asymmetrischer Körper
AMPA-R	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor
Art1	Arginine methyltransferase 1
Art4	Arginine methyltransferase 4
Ash1	Absent, small, or homeotic discs 1
Ash2	Absent, small, or homeotic discs 2
Asx	Additional sex combs
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BDSC	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
Bin1	Bicoid interacting protein 1
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BU	Bulbi
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer Bindig Protein</i>
Ca ²⁺	Kalziumionen
Caf1-180	Chromatin assembly factor 1, p180 subunit
Caf1-55	Chromatin assembly factor 1, p55 subunit
CaM	Ca ²⁺ /Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CES	<i>Chromatin Entry Site</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Chd1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1
ChIPseq	<i>Chromatin-Immunoprecipitation DNA sequencing</i>
Chm	Chameau
Chrac-16	Chromatin accessibility complex 16kD protein
CNG	<i>cyclic Nucleotid Gated Channels</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPEB2	<i>Cytoplasmatic Polyadenlation Element Binding Protein 2</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
CRTC	<i>CREB-regulated transcription coactivator</i>
CS	<i>Conditioned Stimulus</i>
CXM	Cycloheximid
DAL-Neurone	<i>Dorsal Anterior Lateral Neurons</i>
DD	Dunkelhaltung der Fliegen

ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
<i>dnc</i>	<i>dunce</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphaten
DPM-Neurone	<i>Dorsal Paired Medial Neurons</i>
DPSS-Laser	<i>Diode Pumped Solid State-Laser</i>
dRAF	dRING-assoziierte Faktoren
dsRNA	doppelsträngige RNA
E(z)	Enhancer of zeste
Egg	Eggless
EK	Ellipsoidkörper
Enok	Enoki mushroom
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
Esc	Extra sexcombs
EtOH	Ethanol
F	Fallen nach Kletterinitiation
F1	Filialgeneration
FK	Fächerförmiger Körper
G0	Parentale Generation
GA	Gall
gDNA	genomische DNS
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gpp	Grappa
GRASP	<i>GFP reconstitution across synaptic partners</i>
gRNA	<i>guide</i> RNA
Gug	Grunge
H3K27me3	Trimethylierung von Histon 3 Lysin 27
H3K9	Histon 3 Lysinrest 9
H4K16	Histon 4 Lysin 16
H4K20	Histon 4 Lysin 20
HAS	<i>High Affinity Site</i>
Hat1	Histon Acetyltransferase 1
HD	Hell/Dunkelhaltung der Fliegen
HDAC	Histon Deacetylase
HDAC1	Histone deacetylase 1
HDAC11	Histone deacetylase 11
HDAC3	Histone deacetylase 3
HDAC4	Histone deacetylase 4
HDAC6	Histone deacetylase 6
HyD	Hybriddetektor
IA-Paradigma	<i>Inhibitory Avoidance-Paradigma</i>
IHC	Immunhistochemie

INTACT	<i>Isolation of Nuclei Tagged in a Specific Cell Type</i>
IQR	Interquartilsabstand
IR	<i>Inverted Repeats</i>
KAc	Kaliumacetat
Kdm2	Lysine (K)-specific demethylase 2
Kis	Kismet
LAL	laterale akzessorische Loben
Lid	Little imaginal discs
LKRSDH	Lysine ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase
LPB	latero-laterale Neurone der Protozerebralbrücke
LTM	<i>Long Term Memory</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBON	<i>Mushroom Body Output Neurons</i>
Mg ²⁺	Magnesiumionen
miRNA	<i>microRNA</i>
Mle	Maleless
Mof	Males absent on the first
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSL Komplex	<i>Male Specific Lethal Komplex</i>
Msl-1	Male-specific lethal 1
Msl-3	Male-specific lethal 3
MTM	<i>Middle Term Memory</i>
Na ⁺	Natriumionen
NIG	<i>National Institute of Genetics</i>
NMDA-R	N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NO	Noduli, Stickstoffmonoxid
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
NSD	Nuclear receptor binding SET domain protein
NSL-Komplex	<i>Nonspecific Lethal-Komplex</i>
oc	<i>ocelliless</i>
p	Wahrscheinlichkeit
PB	Protozerebralbrücke
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pc	Polycomb
PcG	<i>Polycomb Group</i>
Pcl	Polycomblike
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFN-Neurone	Neurone, die die PB, den FK und die NO miteinander verknüpfen
Pho	Pleiohomeotic
PhoRC	<i>Pho repressive Complex</i>
PKA	Proteinkinase A

PKA-R	Regulatorische Untereinheit der PKA
PKG	Proteinkinase G
PKM ζ	Proteinkinase M zeta
PMT	<i>Photomultiplier</i>
PRC	<i>Polycomb Repressor Complex</i>
PR-Dub	Polycomb repressiven Deubiquitinase
PRE	<i>Polycomb Resonse Element</i>
PR-Set7	PR/SET domain containing protein 7
Psc	Posterior sex combs
Ptip	PAX transcription activation domain interacting protein
R	Herunterlaufen nach Anlauf an die Lücke
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RT	Raumtemperatur
<i>rut</i>	<i>rutabaga</i>
RYBP	Ring and YY1 Binding Protein
Sce	Sex combs extra
Scm	Sex comb on midleg
Set1	SET domain containing 1
Set2	SET domain containing 2
Sfmbt	Scm-related gene containing four mbt domains
sGC	lösliche Guanylylzyklase
Sirt1	Sirtuin 1
Sirt2	Sirtuin 2
Sirt4	Sirtuin 4
Sirt6	Sirtuin 6
Sirt7	Sirtuin 7
spGFP	splitGFP
STaR	<i>synaptic tagging with recombination</i>
STM	<i>Short Term Memory</i>
Su(var)205	Suppressor of variegation 205
Su(z)12	Suppressor of zeste 12
TARGET	<i>Temporal and Regional Gene Expression Targeting</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TeTxLC	<i>Tetanus Toxin Light Chain</i>
t-GRASP	<i>targeted GRASP</i>
Tip60	Tat interactive protein 60kDa
Top2	Topoisomerase 2
Tou	Toutatis
TrkB-Rezeptor	<i>Tropomyosin-Related Kinase B-Rezeptor</i>

Trr	Trithorax-related
Trx	Trithorax
U	Umdrehen nach Anlauf an die Lücke
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
UCR	<i>Unconditioned Response</i>
US	<i>Unconditioned Stimulus</i>
VDRC	<i>Vienna Drosophila Resource Center</i>
X	Überklettern der Lücke
ZX	Zentralkomplex
α	Signifikanzniveau

9 Anhang

9.1 $\Delta 7$ -Neurone

Tabelle 9: Statistische Auswertung zu Abbildung 9B. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,75066	0,0001732
20 / 10	<i>rut</i> ¹ ;UAS- <i>rut</i> /+		0,92313	0,1139
20 / 10	<i>rut</i> ¹ ;UAS- <i>rut</i> /+;R55G08-GAL4/+		0,93789	0,2187

Gruppe	R55G08-GAL4/+	<i>rut</i> ¹ ;UAS- <i>rut</i> /+	<i>rut</i> ¹ ;UAS- <i>rut</i> /+;R55G08-GAL4/+
R55G08-GAL4/+			
<i>rut</i> ¹ ;UAS- <i>rut</i> /+	0,000026		
<i>rut</i> ¹ ;UAS- <i>rut</i> /+;R55G08-GAL4/+	0,0019	0,0205	

Tabelle 10: Statistische Auswertung zu Abbildung 9C. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,69849	3,74E-05
20 / 10	<i>dCreb2-b</i> /+		0,78598	0,0005379
20 / 10	R55G08 > <i>dCreb2-b</i>		0,93046	0,1576

Gruppe	R55G08-GAL4/+	<i>dCreb2-b</i> /+	R55G08 > <i>dCreb2-b</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>dCreb2-b</i> /+	0,634		
R55G08 > <i>dCreb2-b</i>	0,018	0,019	

9.2 Identifizierung alternativer PFN-Treiber

Tabelle 11: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **007Y**>*dnc*^{RNAi}. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	007Y-GAL4/+		0,81715	0,001575
20 / 10	UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi} /+		0,88214	0,01934
20 / 10	007Y > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}		0,90055	0,04223

Gruppe	007Y-GAL4/+	UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi} /+	007Y > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}
007Y-GAL4/+			
UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi} /+	0,102		
007Y > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}	2,3E-05	3,8E-03	

Tabelle 12: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **007Y**>*PKA-R1*^{RNAi}. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	007Y-GAL4/+		0,81715	0,001575

20 / 10	UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi/+}		0,81476	0,001446
20 / 10	007Y > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}		0,93125	0,1632

Gruppe	007Y-GAL4/+	UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi/+}	007Y > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}
007Y-GAL4/+			
UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi/+}	0,72		
007Y > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}	1,1E-05	7,9E-05	

Tabelle 13: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **007Y>dCreb2-a**. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	007Y-GAL4/+		0,7192	6,748E-05
20 / 10	UAS- <i>dCreb2-a</i> /+		0,90765	0,05749
20 / 10	007Y > UAS- <i>dCreb2-a</i>		0,95186	0,3962

Gruppe	007Y-GAL4/+	UAS- <i>dCreb2-a</i> /+	007Y > UAS- <i>dCreb2-a</i>
007Y-GAL4/+			
UAS- <i>dCreb2-a</i> /+	0,1089		
007Y > UAS- <i>dCreb2-a</i>	0,0002	0,0048	

Tabelle 14: Statistische Auswertung zu Tabelle 6 & Abbildung 13, **R84A01>dnc**^{RNAi}. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R84A01-GAL4/+		0,86669	0,01028
20 / 10	UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi/+}		0,88214	0,01934
20 / 10	R84A01 > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}		0,93652	0,2059

Gruppe	R84A01-GAL4/+	UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi/+}	R84A01 > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}
R84A01-GAL4/+			
UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi/+}	0,68		
R84A01 > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}	3,9E-07	1,7E-06	

Tabelle 15: Statistische Auswertung zu Tabelle 6 & Abbildung 13, **R84A01>PKA-R1**^{RNAi}. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R84A01-GAL4/+		0,86669	0,01028
20 / 10	UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi/+}		0,81476	0,001446
20 / 10	R84A01 > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}		0,93306	0,1768

Gruppe	R84A01-GAL4/+	UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi/+}	R84A01 > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}
R84A01-GAL4/+			
UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi/+}	0,30909		
R84A01 > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}	0,00165	0,00046	

Tabelle 16: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **R52B10>dnc**^{RNAi}. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung

einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R52B10-GAL4/+		0,83332	0,002836
20 / 10	UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi} /+		0,88214	0,01934
20 / 10	R52B10 > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}		0,94365	0,2808

Gruppe	R52B10-GAL4/+	UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi} /+	R52B10 > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}
R52B10-GAL4/+			
UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi} /+	0,6983		
R52B10 > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}	0,0145	0,0041	

Tabelle 17: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **R52B10>PKA-R1^{RNAi}**. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R52B10-GAL4/+		0,83332	0,002836
20 / 10	UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} /+		0,81476	0,001446
20 / 10	R52B10 > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}		0,83171	0,002673

Gruppe	R52B10-GAL4/+	UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} /+	R52B10 > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}
R52B10-GAL4/+			
UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} /+	0,25		
R52B10 > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}	0,41	0,72	

Tabelle 18: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **R15D05>dnc^{RNAi}**. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R15D05-GAL4/+		0,84739	0,004821
20 / 10	UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi} /+		0,89491	0,03313
20 / 10	R15D05 > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}		0,91351	0,07436

Gruppe	R15D05-GAL4/+	UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi} /+	R15D05 > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}
R15D05-GAL4/+			
UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi} /+	0,025		
R15D05 > UAS- <i>dnc</i> ^{RNAi}	0,012	0,967	

Tabelle 19: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **R15D05>PKA-R1^{RNAi}**. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R15D05-GAL4/+		0,84739	0,004821
20 / 10	UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} /+		0,81476	0,001446
20 / 10	R15D05 > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}		0,92624	0,1307

Gruppe	R15D05-GAL4/+	UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} /+	R15D05 > UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi}
R15D05-GAL4/+			
UAS- <i>PKA-R1</i> ^{RNAi} /+	0,37		

R15D05 > UAS- <i>PKA-R1^{RNAi}</i>	0,33	0,12	
--	------	------	--

Tabelle 20: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **R44B10>*dnc^{RNAi}***. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R44B10-GAL4/+		0,85453	0,006355
20 / 10	UAS- <i>dnc^{RNAi}</i> /+		0,89491	0,03313
20 / 10	R44B10 > UAS- <i>dnc^{RNAi}</i>		0,87005	0,01177

Gruppe	R44B10-GAL4/+	UAS- <i>dnc^{RNAi}</i> /+	R44B10 > UAS- <i>dnc^{RNAi}</i>
R44B10-GAL4/+			
UAS- <i>dnc^{RNAi}</i> /+	0,12		
R44B10 > UAS- <i>dnc^{RNAi}</i>	0,687	0,086	

Tabelle 21: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **R44B10>*PKA-R1^{RNAi}***. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R44B10-GAL4/+		0,85453	0,006355
20 / 10	UAS- <i>PKA-R1^{RNAi}</i> /+		0,81476	0,001446
20 / 10	R44B10 > UAS- <i>PKA-R1^{RNAi}</i>		0,75319	0,0001874

Gruppe	R44B10-GAL4/+	UAS- <i>PKA-R1^{RNAi}</i> /+	R44B10 > UAS- <i>PKA-R1^{RNAi}</i>
R44B10-GAL4/+			
UAS- <i>PKA-R1^{RNAi}</i> /+	0,37		
R44B10 > UAS- <i>PKA-R1^{RNAi}</i>	0,17	0,53	

Tabelle 22: Statistische Auswertung zu Tabelle 6, **R16D01>*dCreb2-a***. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R16D01-GAL4/+		0,82473	0,002069
20 / 10	UAS- <i>dCreb2-a</i> /+		0,89456	0,03265
13 / 10	R16D01 > UAS- <i>dCreb2-a</i>		0,85024	0,02871

Gruppe	R16D01-GAL4/+	UAS- <i>dCreb2-a</i> /+	R16D01 > UAS- <i>dCreb2-a</i>
R16D01-GAL4/+			
UAS- <i>dCreb2-a</i> /+	0,56		
R16D01 > UAS- <i>dCreb2-a</i>	0,95	0,48	

Tabelle 23: Statistische Auswertung zu Abbildung 13, **R84A01>*mC****. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Max Crayen, 13.04.2018.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R84A01-GAL4/+		0,86669	0,01028
20 / 10	UAS- <i>mC*</i> /+		0,93648	0,2056
20 / 10	R84A01 > UAS- <i>mC*</i>		0,93408	0,185

Gruppe	R84A01-GAL4/+	UAS- <i>mC</i> */+	R84A01 > UAS- <i>mC</i> *
R84A01-GAL4/+			
UAS- <i>mC</i> */+	0,0048		
R84A01 > UAS- <i>mC</i> *	0,000047	0,0633	

9.3 Phasen der Gedächtnisbildung

9.3.1 Das Erlernen der Körpergröße bedarf keiner sensiblen Lebensphase

Tabelle 24: Statistische Auswertung zu Abbildung 15. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Paarvergleiche zwischen naiven und trainierten 3 -4 Tage alten Männchen, sowie zwischen naiven und trainierten 8 – 9 Tage alten Männchen unter Verwendung des Welch-Tests. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	CS 3-4 Tage naiv		0,94945	0,662
14 / 10	CS 3-4 Tage trainiert		0,92636	0,2711
12 / 10	CS 8-9 Tage naiv		0,94857	0,6161
10 / 10	CS 8-9 Tage trainiert		0,90475	0,2469

Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test	t	df	p
CS 3-4 Tage naiv vs. trainiert	Welch-Test	45,998	15,074	0,0003429
CS 8-9 Tage naiv vs. trainiert	Welch-Test	29,034	19,688	0,008883

9.3.2 Der Abruf der Körpergröße ist 12 Stunden nach dem Lernen möglich

Tabelle 25: Statistische Auswertung zu Abbildung 16. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Paarvergleiche jeweils zwischen der naiven und trainierten Gruppe (3 min, 6 h, 14 h, 24 h unter Verwendung des Wilcoxon-Rangsummentests, 4 h und 12 h unter Verwendung des Welch-Tests). Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
15 / 10	3 min naiv		0,7665	0,001408
15 / 10	3 min trainiert		0,943	0,4212
14 / 10	4 h naiv		0,8824	0,06286
14 / 10	4 h trainiert		0,929	0,2955
24 / 10	6 h naiv		0,905	0,02747
24 / 10	6 h trainiert		0,9592	0,4234
12 / 10	12 h naiv		0,9249	0,3287
12 / 10	12 h trainiert		0,9034	0,1752
24 / 10	14 h naiv		0,9566	0,3743
22 / 10	14 h trainiert		0,829	0,001476
12 / 10	24 h naiv		0,9	0,1585
12 / 10	24 h trainiert		0,8048	0,01063

Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test	W	p
3 min naiv vs. trainiert	Wilcoxon-Rangsummentest	87,5	0,2875
6 h naiv vs. trainiert	Wilcoxon-Rangsummentest	331,5	0,3709
14 h naiv vs. trainiert	Wilcoxon-Rangsummentest	147	0,00957
24 h naiv vs. trainiert	Wilcoxon-Rangsummentest	118	0,00751

Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test	t	df	p
-------------------	--------------------	---	----	---

4 h naiv vs. trainiert	Welch-Test	-1,021	21,558	0,3186
12 h naiv vs. trainiert	Welch-Test	27,596	21,360	0,01163

9.3.3 Die Konsolidierung und Aufrechterhaltung der Körpergröße ist Proteinsynthese-abhängig

Tabelle 26: Statistische Auswertung zu Abbildung 17A. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich der vier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest, Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

A: Verfütterung von Cycloheximid direkt nach dem Training				
N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
23 / 10	Kontrolle naiv		0,85133	0,002876
20 / 10	Kontrolle trainiert 3 min		0,95808	0,5062
21 / 10	CMX naiv		0,87279	0,01076
18 / 10	CMX trainiert 3 min		0,96721	0,7439

Gruppe	Kontrolle naiv	Kontrolle trainiert 3 min	CMX naiv	CMX trainiert 3 min
Kontrolle naiv				
Kontrolle trainiert 3 min	0,038			
CMX naiv	~ 1,000	0,027		
CMX trainiert 3 min	~ 1,000	0,038	~ 1,000	

Tabelle 27: Statistische Auswertung zu Abbildung 17B. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich der vier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest, Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
26 / 10	Kontrolle naiv		0,85996	0,002233
19 / 10	Kontrolle trainiert 24 h		0,92488	0,1393
25 / 10	CMX naiv		0,82417	0,0005918
21 / 10	CMX trainiert 24 h		0,93243	0,154

Gruppe	Kontrolle naiv	Kontrolle trainiert 24 h	CMX naiv	CMX trainiert 24 h
Kontrolle naiv				
Kontrolle trainiert 24 h	0,033			
CMX naiv	0,884	0,040		
CMX trainiert 24 h	0,131	0,798	0,133	

9.4 Die Gedächtnisaufrechterhaltung der Körpergröße bedarf dCREB2

Tabelle 28: Statistische Auswertung zu Abbildung 18A. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Paarvergleich unter Verwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
21 / 10	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>dCreb2-b</i> 3d		0,75605	1,50E-04
21 / 10	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>dCreb2-b</i> 4d		0,92167	0,0937

Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test	V	p
R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>dCreb2-b</i> 3d vs. 4d	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	105	0,0009262

Tabelle 29: Statistische Auswertung zu Abbildung 18B. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Paarvergleich unter Verwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
24 / 10	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+ 3d		0,81001	4,31E-04
24 / 10	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+ 4d		0,82227	0,000697

Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test	V	p
R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+ 3d vs. 4d	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	87,5	0,946

Tabelle 30: Statistische Auswertung zu Abbildung 18C. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Paarvergleich unter Verwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
21 / 10	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>dCreb2-b</i> 3d		0,80826	8,80E-04
21 / 10	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>dCreb2-b</i> 8d		0,86986	0,009524

Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test	V	p
R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>dCreb2-b</i> 3d vs. 8d	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	10	0,013

Tabelle 31: Statistische Auswertung zu Abbildung 18D. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Paarvergleich unter Verwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

N / n	Gruppe	Shapiro-Wilk-Test	W	p
21 / 10	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+ 3d		0,80826	8,80E-04
21 / 10	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+ 8d		0,72786	6,25E-05

Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test	V	p
R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+ 3d vs. 8d	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	64,5	0,816

9.4.1 Die Validierung des rekombinanten dritten Chromosoms über PCR

Zur Durchführung Adult-spezifischer Experimente wurde die Linie R55G08-*Tub*>GAL80^{ts} erstellt. Dies erfolgte über Rekombination der Konstrukte R55G08-GAL4 (BDSC #50422) und *Tub*>GAL80^{ts} (BDSC #7018) auf dem dritten Chromosom. Beide Transgene beinhalten die *miniwhite*-Sequenz, sodass Fliegen mit einem erfolgreich rekombinierten 3. Chromosom über die Augenfarbe selektioniert werden konnten. Eine stabile Linie wurde etabliert und das Vorhandensein beider Transgene über PCR positiv bestätigt (Abbildung 25). Angaben zur Durchführung sind im Methodenteil 2.6 nachzulesen.

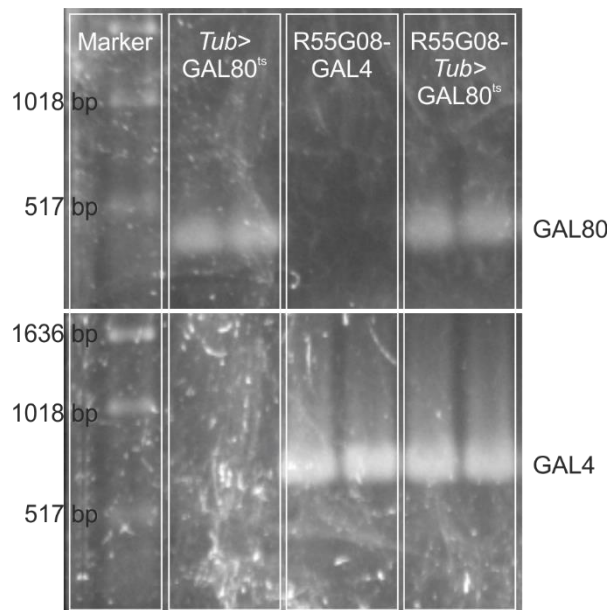


Abbildung 25: **Validierung der Linie R55G08-Tub>GAL80^{ts} über PCR.** Die homologe Rekombination der Konstrukte R55G08-GAL4 und Tub>GAL80^{ts} war erfolgreich, da für beide Konstrukte ein positiver Nachweis erbracht werden konnte.

9.5 Die Analyse der dCREB2 Co-Aktivatoren dCBP und CRTC

Tabelle 32: Statistische Auswertung zu Abbildung 19A. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>dCBP^{RNAi}</i> (BDSC #31728)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>dCBP^{RNAi}</i>		0,91937	0,09638
R55G08-GAL4/+ vs.		Statistischer Test	t	df
R55G08-GAL4> <i>dCBP^{RNAi}</i>		Welch-Test	-0,18233	36,999
				p
				0,8563

Tabelle 33: Statistische Auswertung zu Abbildung 19B. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

<i>dCBP^{RNAi}</i> (VDRC #102885)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,75319	0,0001874
20 / 10	<i>dCBP^{RNAi}</i> /+		0,89332	0,03097
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>dCBP^{RNAi}</i>		0,90059	0,0423

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>dCBP^{RNAi}</i> /+	R55G08-GAL4> <i>dCBP^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>dCBP^{RNAi}</i> /+	0,00081		
R55G08-GAL4> <i>dCBP^{RNAi}</i>	0,000079	0,27667	

Tabelle 34: Statistische Auswertung zu Abbildung 19C. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

<i>dCPB^{RNAi}</i> (BDSC #27724)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,75319	0,0001874
20 / 10	<i>dCPB^{RNAi}/+</i>		0,91552	0,08127
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>dCPB^{RNAi}</i>		0,94393	0,2842

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>dCPB^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>dCPB^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>dCPB^{RNAi}/+</i>	0,0000012		
R55G08-GAL4> <i>dCPB^{RNAi}</i>	0,0000002	0,27	

Tabelle 35: Statistische Auswertung zu Abbildung 19D. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

<i>dCPB^{RNAi}</i> (VDRC #46534)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,86147	0,008348
20 / 10	<i>dCPB^{RNAi}/+</i>		0,91174	0,06878
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>dCPB^{RNAi}</i>		0,94981	0,3643

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>dCPB^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>dCPB^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>dCPB^{RNAi}/+</i>	0,38333		
R55G08-GAL4> <i>dCPB^{RNAi}</i>	0,00017	0,00058	

Tabelle 36: Statistische Auswertung zu Abbildung 19E. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Crtc^{RNAi}</i> (BDSC #42561)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,84855	0,005041
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Crtc^{RNAi}</i>		0,89157	0,02875

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>Crtc^{RNAi}</i>	Wilcoxon-Rangsummentest	224	0,5137

Tabelle 37: Statistische Auswertung zu Abbildung 19F. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich dreier Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu, 02.11.2017.

<i>Crtc^{RNAi}</i> (BDSC #28886)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77369	0,0003591
20 / 10	<i>Crtc^{RNAi}/+</i>		0,85862	0,007461
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Crtc^{RNAi}</i>		0,9341	0,1852

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Crtc^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>Crtc^{RNAi}</i>

R55G08-GAL4/+			
<i>Crtc</i> ^{RNAi/+}	0,013		
R55G08-GAL4> <i>Crtc</i> ^{RNAi}	0,000051	0,013	

Tabelle 38: Statistische Auswertung zu Abbildung 20A. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich der vier Konditionen mit dem T-Test (gepaarte Statistik); Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

<i>dCBP</i> ^{RNAi} (VDRC #46534)				
N / n	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>dCBP</i> ^{RNAi}	Shapiro- Wilk-Test	W	p
19 / 10	Tag 0		0,93014	0,174
19 / 10	Tag 1		0,95832	0,540
19 / 10	Tag 4		0,96038	0,580
19 / 10	Tag 7		0,912	0,081

Gruppe	Tag 0	Tag 1	Tag 4	Tag 7
Tag 0				
Tag 1	0,488			
Tag 4	0,430	0,013		
Tag 7	0,984	0,984	0,17	

Tabelle 39: Statistische Auswertung zu Abbildung 20B. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich der vier Konditionen mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

Kontrolle zu Abbildung 20A, (R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>dCBP</i> ^{RNAi} [VDRC #46534])				
N / n	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} / +	Shapiro- Wilk-Test	W	p
20 / 10	Tag 0		0,954	0,435
20 / 10	Tag 1		0,922	0,108
20 / 10	Tag 4		0,849	0,005
20 / 10	Tag 7		0,893	0,030

Gruppe	Tag 0	Tag 1	Tag 4	Tag 7
Tag 0				
Tag 1	0,785			
Tag 4	0,004	0,061		
Tag 7	0,012	0,023	0,7845	

Tabelle 40: Statistische Auswertung zu Abbildung 20C. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich der drei Konditionen mit dem T-Test (gepaarte Statistik); Bonferroni-Holm korrigiert. Ein Test an Tag 7 wurde abgebrochen, da die Versuchstiere inaktiv waren und sich das Verhalten nicht beobachten ließ. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu, 02.11.2017.

<i>Crtc</i> ^{RNAi} (BDSC #28886)				
N / n	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>Crtc</i> ^{RNAi}	Shapiro-Wilk- Test	W	p
15 / 10	Tag 0		0,912	0,146
15 / 10	Tag 1		0,887	0,061
15 / 10	Tag 4		0,923	0,216

Gruppe	Tag 0	Tag 1	Tag 4
Tag 0			
Tag 1	0,108		
Tag 4	0,094	0,169	

Tabelle 41: Statistische Auswertung zu Abbildung 20D. Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Vergleich der vier Konditionen mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu, 02.11.2017.

Kontrolle zu Abbildung 20C, (R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>Crtc</i> ^{RNAi} [BDSC #28886])				
N / n	R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+	Shapiro-Wilk-Test	W	p
15 / 10	Tag 0		0,862	0,026
15 / 10	Tag 1		0,953	0,579
15 / 10	Tag 4		0,868	0,032
15 / 10	Tag 7		0,763	0,001

Gruppe	Tag 0	Tag 1	Tag 4	Tag 7
Tag 0				
Tag 1	0,519			
Tag 4	0,026	0,023		
Tag 7	0,006	0,008	0,0256	

Tabelle 42: Statistische Auswertung zu Abbildung 21A, R55G08-*Tub*>GAL80^{ts}>*Crtc*^{RNAi} vs. R55G08-*Tub*>GAL80^{ts}/+. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt und sind Tabelle 40 und Tabelle 41 zu entnehmen. Paarvergleiche wurden zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Versuchstagen durchgeführt (Wilcoxon-Rangsummentest und Welch-Test). Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu, 02.11.2017.

R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>Crtc</i> ^{RNAi} vs. R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+				
Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test		W	p
Tag 0	Wilcoxon-Rangsummentest		119	0,7983
Tag 4	Wilcoxon-Rangsummentest		110,5	0,9479
Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test	t	df	p
Tag 1	Welch-Test	-1,914	24,752	0,06728

Tabelle 43: Statistische Auswertung zu Abbildung 21B, R55G08-*Tub*>GAL80^{ts}>*dCBP*^{RNAi} vs. R55G08-*Tub*>GAL80^{ts}/+. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt und sind Tabelle 38 und Tabelle 39 zu entnehmen. Paarvergleiche wurden zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Versuchstagen durchgeführt (Wilcoxon-Rangsummentest und Welch-Test). Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} > <i>dCBP</i> ^{RNAi} vs. R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+				
Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test		W	p
Tag 4	Wilcoxon-Rangsummentest		319	0,0002408
Tag 7	Wilcoxon-Rangsummentest		350,5	5,53E-03
Gruppe vs. Gruppe	Statistischer Test	t	df	p
Tag 0	Welch-Test	3,326	37,000	0,001997
Tag 1	Welch-Test	4,050	36,957	0,000252

9.6 Screen epigenetischer Faktoren

9.6.1 Erfolgreiche Kletterinitiationen an einer 5,0 mm breiten Lücke, Tabelle 7

Tabelle 44: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Ada2b^{RNAi}** (BDSC #31347). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

Ada2b^{RNAi} (BDSC #31347)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4>Ada2b ^{RNAi}		0,89351	0,03122

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4>Ada2b ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	247	0,2006

Tabelle 45: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Ada3^{RNAi}** (BDSC #28905). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Samira Barczewski, 2015.

Ada3^{RNAi} (BDSC #28905)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,56793	1,395E-06
20 / 10	Ada3 ^{RNAi} /+		0,90453	0,05019
20 / 10	R55G08-GAL4>Ada3 ^{RNAi}	0,84103	0,003785	

Genotyp	R55G08-GAL4/+	Ada3 ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4>Ada3 ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
Ada3 ^{RNAi} /+	0,00049		
R55G08-GAL4>Ada3 ^{RNAi}	0,00307	0,55009	

Tabelle 46: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Ada3^{RNAi}** (BDSC #32451). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Samira Barczewski, 2015.

Ada3^{RNAi} (BDSC #32451)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,56793	1,395E-06
20 / 10	Ada3 ^{RNAi} /+		0,83563	0,00309
20 / 10	R55G08-GAL4>Ada3 ^{RNAi}	0,87681	0,01551	

Genotyp	R55G08-GAL4/+	Ada3 ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4>Ada3 ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
Ada3 ^{RNAi} /+	4,9E-06		
R55G08-GAL4>Ada3 ^{RNAi}	0,0032	0,1856	

Tabelle 47: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Art1^{RNAi}** (BDSC #31348). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

Art1^{RNAi} (BDSC #31348)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-	W	p

20 / 10	R55G08-GAL4/+	Test	0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4>Art1 ^{RNAi}		0,94675	0,3205
R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test		t	df
R55G08-GAL4>Art1 ^{RNAi}	Welch-Test		1,5139	35,073
p				

Tabelle 48: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Art1^{RNAi} (BDSC #31349)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle (p=0,039). Dennoch wurde von der Durchführung einer UAS-Kontrolle abgesehen. Es ist wahrscheinlich, dass ein Korrekturverfahren nach Vergleich dreier Gruppe den statistisch relevanten Unterschied zwischen den Gruppen aufhebt. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber, April 2016.

Art1^{RNAi} (BDSC #31349)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38E-05
20 / 10	R55G08-GAL4>Art1 ^{RNAi}		0,8	0,038

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4>Art1 ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	272	0,039

Tabelle 49: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>ash1^{RNAi} (BDSC #31050)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

ash1^{RNAi} (BDSC #31050)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4>ash1 ^{RNAi}		0,9152	0,08013
R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4>ash1 ^{RNAi}	Welch-Test	0,318	37,373	0,7523

Tabelle 50: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>ash2^{RNAi} (BDSC #35388)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummen-Tests. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

ash2^{RNAi} (BDSC #35388)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	R55G08-GAL4>ash2 ^{RNAi}		0,8498	0,005289

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4>ash2 ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	267	0,06104

Tabelle 51: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Bin1^{RNAi} (BDSC #31048)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

Bin1^{RNAi} (BDSC #31048)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4>Bin1 ^{RNAi}		0,91917	0,09552

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4> <i>Bin1</i> ^{RNAi}	Welch-Test	1,4707	34,291	0,1505

Tabelle 52: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Caf1-180*^{RNAi} (BDSC #28918)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber erhoben, April 2016.

<i>Caf1-180</i> ^{RNAi} (BDSC #28918)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38-05
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Caf1-180</i> ^{RNAi}		0,823	0,002

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>Caf1-180</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	134,5	0,06

Tabelle 53: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*CG1894*^{RNAi} (BDSC #34925)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>CG1894</i> ^{RNAi} (BDSC #34925)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>CG1894</i> ^{RNAi}		0,92869	0,1457
R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4> <i>CG1894</i> ^{RNAi}	Welch-Test	1,9174	37,029	0,06292

Tabelle 54: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Chd1*^{RNAi} (BDSC #34665)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber erhoben, April 2016.

<i>Chd1</i> ^{RNAi} (BDSC #34665)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38E-05
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Chd1</i> ^{RNAi}		0,798	0,0008

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>Chd1</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	164	0,29

Tabelle 55: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*chm*^{RNAi} (BDSC #27027)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>chm</i> ^{RNAi} (BDSC #27027)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	<i>chm</i> ^{RNAi} /+		0,76574	0,0002782
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>chm</i> ^{RNAi}		0,9192	0,09562

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>chm</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>chm</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>chm</i> ^{RNAi} /+	0,3175		

R55G08-GAL4> <i>chm</i> ^{RNAi}	0,0048	0,0783	
--	--------	--------	--

Tabelle 56: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*chm*^{RNAi} (BDSC #32484)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>chm</i> ^{RNAi} (BDSC #32484)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	<i>chm</i> ^{RNAi} /+		0,92288	0,1126
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>chm</i> ^{RNAi}		0,94692	0,3227

Bartlett-Test	df	p
1,3314	2	0,5139

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>chm</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>chm</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>chm</i> ^{RNAi} /+	0,1814		
R55G08-GAL4> <i>chm</i> ^{RNAi}	0,0065	0,136	

Tabelle 57: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Chrac-16*^{RNAi} (BDSC #51155)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber erhoben, April 2016..

<i>Chrac-16</i> ^{RNAi} (BDSC #51155)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38E-05
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Chrac-16</i> ^{RNAi}		0,685	2,56E-05

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>Chrac-16</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	193,5	0,855

Tabelle 58: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*egg*^{RNAi} (BDSC #31352)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber erhoben, April 2016.

<i>egg</i> ^{RNAi} (BDSC #31352)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38E-05
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>egg</i> ^{RNAi}		6,866	0,01

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>egg</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	126	0,34

Tabelle 59: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*enok*^{RNAi} (BDSC #29518)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle (p=0,04989). Dennoch wurde von der Durchführung einer UAS-Kontrolle abgesehen. Es ist wahrscheinlich, dass ein Korrekturverfahren nach Vergleich dreier Gruppe den statistisch relevanten Unterschied zwischen den Gruppen aufhebt.

Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>enok</i> ^{RNAi} (BDSC #29518)					
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p	
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674	
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>enok</i> ^{RNAi}		0,91901	0,09482	
R55G08-GAL4/+ vs.		Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4> <i>enok</i> ^{RNAi}		Welch-Test	-2,0307	35,231	0,04989

Tabelle 60: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*enok*^{RNAi} (BDSC #40917)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle, von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>enok</i> ^{RNAi} (BDSC #40917)					
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p	
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674	
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>enok</i> ^{RNAi}		0,91964	0,09751	
R55G08-GAL4/+ vs.		Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4> <i>enok</i> ^{RNAi}		Welch-Test	0	37,233	~1

Tabelle 61: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*esc*^{RNAi} (BDSC #31618)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>esc</i> ^{RNAi} (BDSC #31618)					
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p	
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099	
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>esc</i> ^{RNAi}		0,79656	0,000768	

R55G08-GAL4/+ vs.		Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>esc</i> ^{RNAi}		Wilcoxon-Rangsummentest	207,5	0,8395

Tabelle 62: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*E(z)*^{RNAi} (BDSC #31617)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>E(z)</i> ^{RNAi} (BDSC #31617)					
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p	
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099	
20 / 10	<i>E(z)</i> ^{RNAi} /+		0,93059	0,1585	
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>E(z)</i> ^{RNAi}		0,91889	0,09432	

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>E(z)</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>E(z)</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>E(z)</i> ^{RNAi} /+	0,0028		
R55G08-GAL4> <i>E(z)</i> ^{RNAi}	0,0028	0,8154	

Tabelle 63: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>G9a^{RNAi}** (BDSC #31630). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

G9a^{RNAi} (BDSC #31630)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	G9a ^{RNAi} /+		0,93558	0,1976
20 / 10	R55G08-GAL4>G9a ^{RNAi}		0,85394	0,00621

Genotyp	R55G08-GAL4/+	G9a ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4>G9a ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
G9a ^{RNAi} /+	0,0061		
R55G08-GAL4>G9a ^{RNAi}	0,0199	0,8786	

Tabelle 64: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>gpp^{RNAi}** (BDSC #31327). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber erhoben, April 2016. .

gpp^{RNAi} (BDSC #31327)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38E-05
20 / 10	R55G08-GAL4>gpp ^{RNAi}		0,8	0,001

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4>gpp ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	184	0,18

Tabelle 65: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>HDAC1^{RNAi}** (BDSC #31616). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle, von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

HDAC1^{RNAi} (BDSC #31616)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4>HDAC1 ^{RNAi}		0,92781	0,1401
R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4>HDAC1 ^{RNAi}	Welch-Test	-0,4549	36,96	0,6518

Tabelle 66: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>HDAC3^{RNAi}** (BDSC #31633). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle, von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

HDAC3^{RNAi} (BDSC #31633)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4>HDAC3 ^{RNAi}		0,95143	0,3893
R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4>HDAC3 ^{RNAi}	Welch-Test	-1,955	36,451	0,05828

Tabelle 67: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>HDAC4^{RNAi}** (BDSC #28549). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

HDAC4^{RNAi} (BDSC #28549)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4>HDAC4 ^{RNAi}		0,81336	0,001376

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4>HDAC4 ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	198	0,9668

Tabelle 68: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>HDAC6^{RNAi}** (BDSC #31053). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

HDAC6^{RNAi} (BDSC #31053)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	R55G08-GAL4>HDAC6 ^{RNAi}		0,77617	0,0003893

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4>HDAC6 ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	141	0,09578

Tabelle 69: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>HDAC11^{RNAi}** (BDSC #32480). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

HDAC11^{RNAi} (BDSC #32480)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4>HDAC11 ^{RNAi}		0,89309	0,03066

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4>HDAC11 ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	200	~1

Tabelle 70: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>kis^{RNAi}** (BDSC #34908). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber, April 2016.

kis^{RNAi} (BDSC #34908)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38E-05
20 / 10	R55G08-GAL4>kis ^{RNAi}		0,8	0,002

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4>kis ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	119,5	0,22

Tabelle 71: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>lid^{RNAi}** (BDSC #28944). Die Verteilung der Daten

wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>lid</i> ^{RNAi} (BDSC #28944)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>lid</i> ^{RNAi}		0,8974	0,03688

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>lid</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	144,5	0,1304

Tabelle 72: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>LKRSDH**^{RNAi} (BDSC #35470). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle, von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>LKRSDH</i> ^{RNAi} (BDSC #35470)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>LKRSDH</i> ^{RNAi}		0,91129	0,06745
R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4> <i>LKRSDH</i> ^{RNAi}	Welch-Test	0,46949	37,515	0,6414

Tabelle 73: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 23B, **R55G08>mle**^{RNAi} (BDSC #34864). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>mle</i> ^{RNAi} (BDSC #34864)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,35122	1,846E-08
20 / 10	<i>mle</i> ^{RNAi} /+		0,91861	0,09318
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}		0,95457	0,4418

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>mle</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>mle</i> ^{RNAi} /+	4,7E-06		
R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}	1,1E-07	0,012	

Tabelle 74: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>mor**^{RNAi} (BDSC #33698). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

<i>mor</i> ^{RNAi} (BDSC #33698)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,85532	0,006553
20 / 10	<i>mor</i> ^{RNAi} /+		0,93992	0,2389
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>mor</i> ^{RNAi}		0,94119	0,2525

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>mor</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>mor</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>mor</i> ^{RNAi} /+	0,02		
R55G08-GAL4>	0,0001	0,009	

mo^{fRNAi}			
--------------	--	--	--

Tabelle 75: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 23A, **R55G08> mo^{fRNAi} (BDSC #36870)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

mo^{fRNAi} (BDSC #36870)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,85532	0,006553
20 / 10	$mo^{fRNAi}/+$		0,8965	0,03547
20 / 10	R55G08-GAL4> mo^{fRNAi}		0,95205	0,3993

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$mo^{fRNAi}/+$	R55G08-GAL4> mo^{fRNAi}
R55G08-GAL4/+			
$mo^{fRNAi}/+$	~1		
R55G08-GAL4> mo^{fRNAi}	0,00018	8,3E-05	

Tabelle 76: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08> mo^{fRNAi} (BDSC #58281)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

mo^{fRNAi} (BDSC #58281)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,85532	0,006553
20 / 10	$mo^{fRNAi}/+$		0,90881	0,06049
20 / 10	R55G08-GAL4> mo^{fRNAi}		0,94498	0,2973

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$mo^{fRNAi}/+$	R55G08-GAL4> mo^{fRNAi}
R55G08-GAL4/+			
$mo^{fRNAi}/+$	0,03865		
R55G08-GAL4> mo^{fRNAi}	0,000032	0,00015	

Tabelle 77: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08> mo^{fRNAi} (BDSC #31401)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

mo^{fRNAi} (BDSC #31401)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,85532	0,006553
20 / 10	$mo^{fRNAi}/+$		0,9156	0,08156
20 / 10	R55G08-GAL4> mo^{fRNAi}		0,92969	0,1523

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$mo^{fRNAi}/+$	R55G08-GAL4> mo^{fRNAi}
R55G08-GAL4/+			
$mo^{fRNAi}/+$	0,0077		
R55G08-GAL4> mo^{fRNAi}	0,002	0,1471	

Tabelle 78: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 23C, **R55G08> $msl-1^{fRNAi}$ (BDSC #39012)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>msl-1</i> ^{RNAi} (BDSC #39012)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,35122	1,846E-08
20 / 10	<i>msl-1</i> ^{RNAi} /+		0,70289	0,00004229
27 / 10	R55G08-GAL4> <i>msl-1</i> ^{RNAi}		0,86932	0,002848

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>msl-1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>msl-1</i> ^{RNAi} /+	0,017		
R55G08-GAL4> <i>msl-1</i> ^{RNAi}	0,000011	0,017	

Tabelle 79: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 23D, **R55G08>*msl-3*^{RNAi}** (BDSC #35272). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>msl-3</i> ^{RNAi} (BDSC #35272)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,35122	1,846E-08
20 / 10	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+		0,76635	0,0002836
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}		0,94695	0,3232

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	0,0072		
R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}	6,3E-08	0,000012	

Tabelle 80: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*NSD*^{RNAi}** (BDSC #34033). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber, April 2016.

<i>NSD</i> ^{RNAi} (BDSC #34033)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38E-05
20 / 10	<i>NSD</i> ^{RNAi} /+		0,83	0,003
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>NSD</i> ^{RNAi}		0,92	0,097

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>NSD</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>NSD</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>NSD</i> ^{RNAi} /+	0,00025		
R55G08-GAL4> <i>NSD</i> ^{RNAi}	0,001	~1	

Tabelle 81: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Pc*^{RNAi}** (BDSC #31110). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Pc</i> ^{RNAi} (BDSC #31110)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	<i>Pc</i> ^{RNAi} /+		0,65924	0,00001292
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Pc</i> ^{RNAi}		0,92352	0,1158

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$Pc^{RNAi}/+$	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
$Pc^{RNAi}/+$	0,29323		
R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}	0,00091	0,00015	

Tabelle 82: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08> Pc^{RNAi}** (BDSC #33964). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

Pc^{RNAi} (BDSC #33964)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	$Pc^{RNAi}/+$		0,94166	0,2577
20 / 10	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}		0,91258	0,0714

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$Pc^{RNAi}/+$	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
$Pc^{RNAi}/+$	0,00064		
R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}	0,00014	0,1631	

Tabelle 83: Statistische Auswertung zu Tabelle 7 & Abbildung 22, **R55G08> Pc^{RNAi}** (BDSC #31189). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Tabea Rosenbaum erhoben, 13.04.2017.

Pc^{RNAi} (BDSC #31189)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,84855	0,005041
20 / 10	$Pc^{RNAi}/+$		0,91684	0,08613
20 / 10	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}		0,95017	0,3696

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$Pc^{RNAi}/+$	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
$Pc^{RNAi}/+$	0,41		
R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}	1,6E-06	3,8E-06	

Tabelle 84: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08> Pc^{RNAi}** (BDSC #33945). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen eines F2-Praktikums von Marie Oster erhoben, 03.10.2018.

Pc^{RNAi} (BDSC #33945)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,50787	3,748E-07
20 / 10	$Pc^{RNAi}/+$		0,82889	0,002408
20 / 10	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}		0,89338	0,03104

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$Pc^{RNAi}/+$	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
$Pc^{RNAi}/+$	0,0268		
R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}	0,0011	0,0975	

Tabelle 85: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>pho^{RNAi}** (BDSC #31609). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Verwendung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Tabea Rosenbaum, 13.04.2017.

<i>pho^{RNAi}</i> (BDSC #31609)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,84855	0,005041
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>pho^{RNAi}</i>		0,9249	0,1231

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>pho^{RNAi}</i>	Wilcoxon-Rangsummentest	149,5	0,167

Tabelle 86: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>PR-Set7^{RNAi}** (BDSC #35322). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber, April 2016.

<i>PR-Set7^{RNAi}</i> (BDSC #35322)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38E-05
20 / 10	<i>PR-Set7^{RNAi}/+</i>		0,92	0,029
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>PR-Set7^{RNAi}</i>		0,82	0,08

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>PR-Set7^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>PR-Set7^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>PR-Set7^{RNAi}/+</i>	0,011		
R55G08-GAL4> <i>PR-Set7^{RNAi}</i>	2,4E-05	0,455	

Tabelle 87: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>PR-Set7^{RNAi}** (BDSC #67346). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Marie Oster, 03.10.2018.

<i>PR-Set7^{RNAi}</i> (BDSC #67346)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,50787	3,748E-07
20 / 10	<i>PR-Set7^{RNAi}/+</i>		0,80569	0,001052
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>PR-Set7^{RNAi}</i>		0,9075	0,05714

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>PR-Set7^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>PR-Set7^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>PR-Set7^{RNAi}/+</i>	0,0591		
R55G08-GAL4> <i>PR-Set7^{RNAi}</i>	0,0017	0,0591	

Tabelle 88: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>psc^{RNAi}** (BDSC #31611). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Tabea Rosenbaum, 13.04.2017, erhoben.

<i>psc^{RNAi}</i> (BDSC #31611)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099

20 / 10	R55G08-GAL4> <i>psc</i> ^{RNAi}		0,87604	0,01503
R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test		W	p
R55G08-GAL4> <i>psc</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest		261,5	0,08494

Tabelle 89: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*ptip*^{RNAi} (BDSC #35269)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>ptip</i> ^{RNAi} (BDSC #35269)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	<i>ptip</i> ^{RNAi} /+		0,96427	0,6321
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}		0,95772	0,4993

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>ptip</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>ptip</i> ^{RNAi} /+	0,000019		
R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}	0,00017	0,38654	

Tabelle 90: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*ptip*^{RNAi} (BDSC #31741)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>ptip</i> ^{RNAi} (BDSC #31741)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	<i>ptip</i> ^{RNAi} /+		0,81533	0,001476
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}		0,93257	0,1731

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>ptip</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>ptip</i> ^{RNAi} /+	0,511		
R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}	0,024	0,035	

Tabelle 91: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Rtf1*^{RNAi} (BDSC #31718)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Rtf1</i> ^{RNAi} (BDSC #31718)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Rtf1</i> ^{RNAi}		0,74265	0,0001355

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test		W	p
R55G08-GAL4> <i>Rtf1</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest		212,5	0,7245

Tabelle 92: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*RYBP*^{RNAi} (BDSC #33974)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Tabea Rosenbaum, 13.04.2017, erhoben.

<i>RYBP</i> ^{RNAi} (BDSC #33974)				
---	--	--	--	--

N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,84855	0,005041
20 / 10	<i>RYBP</i> ^{RNAi} /+		0,82337	0,001969
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>RYBP</i> ^{RNAi}		0,94694	0,323

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>RYBP</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>RYBP</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>RYBP</i> ^{RNAi} /+	0,386		
R55G08-GAL4> <i>RYBP</i> ^{RNAi}	0,024	0,386	

Tabelle 93: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Sce**^{RNAi} (BDSC #31612). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Sce</i> ^{RNAi} (BDSC #31612)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	<i>Sce</i> ^{RNAi} /+		0,76186	0,0002459
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sce</i> ^{RNAi}		0,84494	0,00439

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Sce</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Sce</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Sce</i> ^{RNAi} /+	0,644		
R55G08-GAL4> <i>Sce</i> ^{RNAi}	0,084	0,644	

Tabelle 94: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Scm**^{RNAi} (BDSC #31614). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Scm</i> ^{RNAi} (BDSC #31614)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	<i>Scm</i> ^{RNAi} /+		0,89647	0,03543
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Scm</i> ^{RNAi}		0,87837	0,01654

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Scm</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Scm</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Scm</i> ^{RNAi} /+	0,033		
R55G08-GAL4> <i>Scm</i> ^{RNAi}	0,073	0,793	

Tabelle 95: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Set1**^{RNAi} (BDSC #33704). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten sind in Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu erhoben worden, 02.11.2017.

<i>Set1</i> ^{RNAi} (BDSC #33704)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77369	0,0003591
20 / 10	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+		0,83316	0,00282
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}		0,96249	0,5948

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			

<i>Set1</i> ^{RNAi/+}	0,00018		
R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}	0,000014	0,00224	

Tabelle 96: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Set1*^{RNAi} (VDR #10833)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten sind in Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu erhoben worden, 02.11.2017.

<i>Set1</i> ^{RNAi} (VDR #10833)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,87699	0,01563
20 / 10	<i>Set1</i> ^{RNAi/+}		0,90702	0,05593
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}		0,82984	0,002495

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Set1</i> ^{RNAi/+}	0,0761		
R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}	3,6E-07	0,0018	

Tabelle 97: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Set1*^{RNAi} (BDSC #40931)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten sind in Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu erhoben worden, 02.11.2017.

<i>Set1</i> ^{RNAi} (BDSC #40931)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77369	0,0003591
20 / 10	<i>Set1</i> ^{RNAi/+}		0,93054	0,1582
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}		0,95071	0,378

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Set1</i> ^{RNAi/+}	0,00002		
R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}	3,1E-07	0,78	

Tabelle 98: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Set2*^{RNAi} (BDSC #31355)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Set2</i> ^{RNAi} (BDSC #31355)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Set2</i> ^{RNAi}		0,78489	0,0005188

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>Set2</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	259,5	0,1016

Tabelle 99: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sfmbt*^{RNAi} (BDSC #28677)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten sind in Rahmen der Bachelorarbeit von Tabea Rosenbaum erhoben worden, 13.04.2017.

<i>Sfmbt</i> ^{RNAi} (BDSC #28677)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-	W	p

20 / 10	R55G08-GAL4/+	Test	0,84855	0,005041
20 / 10	<i>Sfmbt</i> ^{RNAi/+}		0,87706	0,01567
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sfmbt</i> ^{RNAi}		0,89422	0,03218

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Sfmbt</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Sfmbt</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Sfmbt</i> ^{RNAi/+}	0,0192		
R55G08-GAL4> <i>Sfmbt</i> ^{RNAi}	0,0036	0,407	

Tabelle 100: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sin3A*^{RNAi} (BDSC #32368)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle ($p=0,04$). Dennoch wurde von der Durchführung einer UAS-Kontrolle abgesehen. Es ist wahrscheinlich, dass ein Korrekturverfahren nach Vergleich dreier Gruppen den statistisch relevanten Unterschied zwischen den Gruppen aufhebt. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden in Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber erhoben, April 2016.

<i>Sin3A</i> ^{RNAi} (BDSC #32368)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	6,38E-05
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sin3A</i> ^{RNAi}		0,89	0,02

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>Sin3A</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	128	0,04

Tabelle 101: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sirt1*^{RNAi} (BDSC #32481)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Sirt1</i> ^{RNAi} (BDSC #32481)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	<i>Sirt1</i> ^{RNAi/+}		0,9663	0,6774
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sirt1</i> ^{RNAi}		0,96175	0,5793

Bartlett-Test	df	p
26,044	2	0,2719

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Sirt1</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Sirt1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Sirt1</i> ^{RNAi/+}	0,00024		
R55G08-GAL4> <i>Sirt1</i> ^{RNAi}	0,00061	0,69029	

Tabelle 102: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sirt1*^{RNAi} (BDSC #53697)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle, von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Sirt1</i> ^{RNAi} (BDSC #53697)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sirt1</i> ^{RNAi}		0,94979	0,3639

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4> <i>Sirt1</i> ^{RNAi}	Welch-Test	1,5941	35,008	0,1199

Tabelle 103: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sirt2*^{RNAi} (BDSC #31613)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Sirt2</i> ^{RNAi} (BDSC #31613)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	<i>Sirt2</i> ^{RNAi} /+		0,60765	3,538E-06
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sirt2</i> ^{RNAi}		0,75442	0,0001947

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Sirt2</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Sirt2</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Sirt2</i> ^{RNAi} /+	0,00012		
R55G08-GAL4> <i>Sirt2</i> ^{RNAi}	0,00539	0,25192	

Tabelle 104: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sirt2*^{RNAi} (BDSC #36868)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Sirt2</i> ^{RNAi} (BDSC #36868)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	<i>Sirt2</i> ^{RNAi} /+		0,92432	0,12
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sirt2</i> ^{RNAi}		0,9435	0,279

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Sirt2</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Sirt2</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Sirt2</i> ^{RNAi} /+	0,0126		
R55G08-GAL4> <i>Sirt2</i> ^{RNAi}	0,0001	0,3724	

Tabelle 105: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sirt4*^{RNAi} (BDSC #31638)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle, von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Sirt4</i> ^{RNAi} (BDSC #31638)														
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p										
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674										
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sirt4</i> ^{RNAi}		0,94228	0,2647										
<table border="1"> <tr> <td>R55G08-GAL4/+ vs.</td> <td>Statistischer Test</td> <td>t</td> <td>df</td> <td>p</td> </tr> <tr> <td>R55G08-GAL4><i>Sirt4</i>^{RNAi}</td> <td>Welch-Test</td> <td>-1,1453</td> <td>37,731</td> <td>0,2593</td> </tr> </table>					R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p	R55G08-GAL4> <i>Sirt4</i> ^{RNAi}	Welch-Test	-1,1453	37,731	0,2593
R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p										
R55G08-GAL4> <i>Sirt4</i> ^{RNAi}	Welch-Test	-1,1453	37,731	0,2593										

Tabelle 106: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sirt6*^{RNAi} (BDSC #31399)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen unter Verwendung des Wilcoxon-Rangsummentests; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase erhoben, 22.11.2018.

<i>Sirt6</i> ^{RNAi} (BDSC #31399)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-	W	p

20 / 10	R55G08-GAL4/+	Test	0,8607	0,008097
20 / 10	<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}		0,92248	0,1106
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}		0,95155	0,3913

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}	0,05157		
R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}	0,00056	0,22783	

Tabelle 107: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sirt6*^{RNAi} (BDSC #34530)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen unter Verwendung des Wilcoxon-Rangsummentests; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase erhoben, 22.11.2018.

<i>Sirt6</i> ^{RNAi} (BDSC #34530)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,8607	0,008097
20 / 10	<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}		0,93513	0,1937
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}		0,88843	0,02516

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}	0,0034		
R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}	7,4E-06	0,0232	

Tabelle 108: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Sirt7*^{RNAi} (BDSC #31093)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Welch-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle, von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Sirt7</i> ^{RNAi} (BDSC #31093)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sirt7</i> ^{RNAi}		0,93934	0,233
R55G08-GAL4/+ vs.		Statistischer Test	t	df
R55G08-GAL4> <i>Sirt7</i> ^{RNAi}		Welch-Test	-1,9008	36,854
p				
0,06517				

Tabelle 109: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Su(var)205*^{RNAi} (BDSC #33400)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Su(var)205</i> ^{RNAi} (BDSC #33400)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	<i>Su(var)205</i> ^{RNAi/+}		0,91167	0,06858
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Su(var)205</i> ^{RNAi}		0,87743	0,01591

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Su(var)205</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Su(var)205</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Su(var)205</i> ^{RNAi/+}	0,0026		
R55G08-GAL4>	0,0188	0,8468	

$Su(var)205^{RNAi}$			
---------------------	--	--	--

Tabelle 110: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Su(z)12^{RNAi} (BDSC #31191)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

$Su(z)12^{RNAi}$ (BDSC #31191)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	$Su(z)12^{RNAi}/+$		0,8367	0,003217
20 / 10	R55G08-GAL4> $Su(z)12^{RNAi}$		0,94376	0,2821

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$Su(z)12^{RNAi}/+$	R55G08-GAL4> $Su(z)12^{RNAi}$
R55G08-GAL4/+			
$Su(z)12^{RNAi}/+$	0,3747		
R55G08-GAL4> $Su(z)12^{RNAi}$	0,0044	0,0609	

Tabelle 111: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Tip60^{RNAi} (BDSC #35243)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase erhoben, 22.11.2018.

$Tip60^{RNAi}$ (BDSC #35243)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,85567	0,006643
20 / 10	$Tip60^{RNAi}/+$		0,92004	0,09927
20 / 10	R55G08-GAL4> $Tip60^{RNAi}$		0,954	0,4318

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$Tip60^{RNAi}/+$	R55G08-GAL4> $Tip60^{RNAi}$
R55G08-GAL4/+			
$Tip60^{RNAi}/+$	6,3E-06		
R55G08-GAL4> $Tip60^{RNAi}$	1,2E-05	0,15	

Tabelle 112: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Tip60^{RNAi} (BDSC #28563)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase erhoben, 22.11.2018.

$Tip60^{RNAi}$ (BDSC #28563)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,85567	0,006643
20 / 10	$Tip60^{RNAi}/+$		0,77955	0,0004349
20 / 10	R55G08-GAL4> $Tip60^{RNAi}$		0,95512	0,4515

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$Tip60^{RNAi}/+$	R55G08-GAL4> $Tip60^{RNAi}$
R55G08-GAL4/+			
$Tip60^{RNAi}/+$	0,0021		
R55G08-GAL4> $Tip60^{RNAi}$	7,6E-07	9,5E-05	

Tabelle 113: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>Top2^{RNAi} (BDSC #35416)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen eines F2-Praktikums von Marie Oster erhoben, 03.10.2018.

$Top2^{RNAi}$ (BDSC #35416)				
-----------------------------	--	--	--	--

N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,50787	3,748-07
20 / 10	<i>Top2</i> ^{RNAi} /+		0,8683	0,01097
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}		0,90752	0,05717

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Top2</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Top2</i> ^{RNAi} /+	0,0042		
R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}	0,0016	0,5631	

Tabelle 114: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*Top2*^{RNAi} (BDSC #31342)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>Top2</i> ^{RNAi} (BDSC #31342)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,93182	0,1674
20 / 10	<i>Top2</i> ^{RNAi} /+		0,90797	0,05831
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}		0,88058	0,01812

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Top2</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Top2</i> ^{RNAi} /+	0,4411		
R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}	0,0043	0,0424	

Tabelle 115: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*tou*^{RNAi} (BDSC #31637)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Vera Weber erhoben, April 2016.

<i>tou</i> ^{RNAi} (BDSC #31637)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,717	0,0000638
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>tou</i> ^{RNAi}		0,816	0,0015

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>tou</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	239,5	0,249

Tabelle 116: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*trr*^{RNAi} (BDSC #29563)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Paarvergleich unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Knock-Down*-Fliegen und der GAL4-Kontrolle; von der Durchführung einer UAS-Kontrolle wurde daraufhin abgesehen. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>trr</i> ^{RNAi} (BDSC #29563)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>trr</i> ^{RNAi}		0,86715	0,01047

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>trr</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	153	0,1861

Tabelle 117: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>*trx*^{RNAi} (BDSC #31092)**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest;

Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>trx</i> ^{RNAi} (BDSC #31092)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,77774	0,0004099
20 / 10	<i>trx</i> ^{RNAi} /+		0,92338	0,1151
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>trx</i> ^{RNAi}		0,94282	0,271

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>trx</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>trx</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>trx</i> ^{RNAi} /+	0,00095		
R55G08-GAL4> <i>trx</i> ^{RNAi}	0,00095	0,59259	

Tabelle 118: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>YL-1^{RNAi}** (BDSC #31938). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Samira Barczewski erhoben, 2015.

<i>YL-1</i> ^{RNAi} (BDSC #31938)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,56793	1,395E-06
20 / 10	<i>YL-1</i> ^{RNAi} /+		0,78634	0,0005443
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>YL-1</i> ^{RNAi}		0,80662	0,001086

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>YL-1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>YL-1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>YL-1</i> ^{RNAi} /+	0,013		
R55G08-GAL4> <i>YL-1</i> ^{RNAi}	0,582	0,065	

Tabelle 119: Statistische Auswertung zu Tabelle 7, **R55G08>YL-1^{RNAi}** (#4621R-2). Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Samira Barczewski erhoben, 2015.

<i>YL-1</i> ^{RNAi} (#4621R-2)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,56793	0,000001395
20 / 10	<i>YL-1</i> ^{RNAi} /+		0,87054	0,01201
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>YL-1</i> ^{RNAi}		0,88674	0,02344

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>YL-1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>YL-1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>YL-1</i> ^{RNAi} /+	0,00047		
R55G08-GAL4> <i>YL-1</i> ^{RNAi}	0,00711	0,26182	

9.6.2 Erfolgreiche Überkletterungen an einer 3,5 mm breiten Lücke

Bewirkte die Herunterregulierung eines epigenetischen Faktors einen $\Delta 7$ -spezifischen Kletterphänotyp (übermäßige Kletterinitiationen) an der unüberwindbaren 5,0 mm Lücke, mussten die visuellen und motorischen Fähigkeiten der *Knock-Down*-Fliegen überprüft werden. Dazu wurde eine überwindbare 3,5 mm

Lücke herangezogen. Wildtypische Fliegen zeigen an dieser Lückengröße im Median 80 % erfolgreiche Überkletterungen (große Fliegen), bzw. 0 % erfolgreiche Überkletterungen (kleine Fliegen) (Krause et al., 2019). Anders als der getestete Wildtypen-Stamm CS gehen die nachfolgend analysierten Genotypen aus einer Kreuzung hervor. Die Körpergröße der Tiere ist somit verhältnismäßig groß. Dies ist zum einen dadurch bedingt, dass für die Verhaltensanalyse häufig die ersten Fliegen eines Schlupfes ausgewählt werden. Diese Fliegen hatten das beste Nahrungsangebot und konnten sich somit gut entwickeln. Zum anderen kann der Heterosiseffekt bei Kreuzung zweier Linien zu fitteren, bzw. größeren Nachkommen führen.

Die folgenden Tabellen enthalten die statistischen Auswertungen der erfolgreichen Überkletterungen der *Knock-Down*-Fliegen mit $\Delta 7$ -spezifischen Phänotyp (siehe Tabelle 7), sowie der GAL4-Kontrollen und der UAS-Kontrollen an einer überwindbaren 3,5 mm Lücke. Statistisch signifikante Unterschiede sind generell feststellbar. Prinzipiell liegt das gezeigte Verhalten bei allen Genotypen aber bei mind. 35 % erfolgreichen Überkletterungen, meistens sogar deutlich höher (siehe nachfolgende Tabellen). Es wird folglich davon ausgegangen, dass alle Gruppen dazu befähigt sind die Lückengröße visuell korrekt einzuschätzen und diese im Anschluss motorisch problemlos zu überklettern.

Tabelle 120: Statistische Auswertung zu **R55G08>*mle*^{RNAi} (BDSC #34864)**, 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>mle</i> ^{RNAi} (BDSC #34864)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,88789	0,1605
10 / 10	<i>mle</i> ^{RNAi} /+		0,99108	0,9979
10 / 10	R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}		0,90797	0,2673

Bartlett-Test	df	p
1,8427	2	0,398

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>mle</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>mle</i> ^{RNAi} /+	0,75		
R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}	0,75	0,41	

	R55G08-GAL4/+	<i>mle</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}
Median erfolgreiche	70	55	75

Überkletterungen [%]			
----------------------	--	--	--

Tabelle 121: Statistische Auswertung zu **R55G08>msl-1^{RNAi}** (BDSC #39012), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>msl-1^{RNAi}</i> (BDSC #39012)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,888	0,161
10 / 10	<i>msl-1^{RNAi}/+</i>		0,855	0,066
15 / 10	R55G08-GAL4> <i>msl-1^{RNAi}</i>		0,916	0,168

Bartlett-Test	df	p
3,2426	2	0,1976

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-1^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>msl-1^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>msl-1^{RNAi}/+</i>	0,620		
R55G08-GAL4> <i>msl-1^{RNAi}</i>	0,200	0,38	

	R55G08-GAL4/+	<i>msl-1^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>msl-1^{RNAi}</i>
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	70	60	40

Tabelle 122: Statistische Auswertung zu **R55G08>msl-3^{RNAi}** (BDSC #35272), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>msl-3^{RNAi}</i> (BDSC #35272)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,888	0,161
10 / 10	<i>msl-3^{RNAi}/+</i>		0,889	0,167
10 / 10	R55G08-GAL4> <i>msl-3^{RNAi}</i>		0,937	0,525

Bartlett-Test	df	p
1,9485	2	0,3775

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-3^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>msl-3^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>msl-3^{RNAi}/+</i>	0,380		
R55G08-GAL4> <i>msl-3^{RNAi}</i>	0,890	0,38	

	R55G08-GAL4/+	<i>msl-3^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>msl-3^{RNAi}</i>
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	70	35	60

Tabelle 123: Statistische Auswertung zu **R55G08>mo^fRNAi** (BDSC #36870), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der

Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

<i>mo^{fRNAi}</i> (BDSC #36870)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,917	0,330
10 / 10	<i>mo^{fRNAi}</i> /+		0,868	0,095
10 / 10	R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>		0,927	0,420

Bartlett-Test	df	p
1,4057	2	0,4952

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>mo^{fRNAi}</i> /+	R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>mo^{fRNAi}</i> /+	0,34		
R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>	0,34	0,061	

	R55G08-GAL4/+	<i>mo^{fRNAi}</i> /+	R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	50	35	60

Tabelle 124: Statistische Auswertung zu **R55G08>*mo^{fRNAi}*** (BDSC #33698), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

<i>mo^{fRNAi}</i> (BDSC #33698)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,917	0,330
10 / 10	<i>mo^{fRNAi}</i> /+		0,775	0,007
10 / 10	R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>		0,781	0,008

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>mo^{fRNAi}</i> /+	R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>mo^{fRNAi}</i> /+	0,00227		
R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>	0,00044	0,00483	

	R55G08-GAL4/+	<i>mo^{fRNAi}</i> /+	R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	50	80	95

Tabelle 125: Statistische Auswertung zu **R55G08>*mo^{fRNAi}*** (BDSC #58281), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

<i>mo^{fRNAi}</i> (BDSC #58281)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,917	0,330
10 / 10	<i>mo^{fRNAi}</i> /+		0,873	0,108
10 / 10	R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>		0,835	0,038

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>mo^{fRNAi}</i> /+	R55G08-GAL4> <i>mo^{fRNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			

$mo^{RNAi/+}$	0,001		
R55G08-GAL4> mo^{RNAi}	0,003	0,191	

	R55G08-GAL4/+	$mo^{RNAi/+}$	R55G08-GAL4> mo^{RNAi}
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	50	90	80

Tabelle 126: Statistische Auswertung zu **R55G08> Pc^{RNAi}** (BDSC #31110), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

Pc^{RNAi} (BDSC #31110)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,876	0,015
10 / 10	$Pc^{RNAi/+}$		0,886	0,152
20 / 10	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}		0,862	0,009

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$Pc^{RNAi/+}$	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
$Pc^{RNAi/+}$	0,30917		
R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}	6,4E-04	0,30917	

	R55G08-GAL4/+	$Pc^{RNAi/+}$	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	65	75	90

Tabelle 127: Statistische Auswertung zu **R55G08> Pc^{RNAi}** (BDSC #31189), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Tabea Rosenbaum, 13.04.2017.

Pc^{RNAi} (BDSC #31189)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,888	0,160
10 / 10	$Pc^{RNAi/+}$		0,862	0,080
10 / 10	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}		0,929	0,437

Bartlett-Test	df	p
0,29207	2	0,8641

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$Pc^{RNAi/+}$	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
$Pc^{RNAi/+}$	0,066		
R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}	0,522	0,172	

	R55G08-GAL4/+	$Pc^{RNAi/+}$	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	65	90	70

Tabelle 128: Statistische Auswertung zu **R55G08> $ptip^{RNAi}$** (BDSC #31741), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Eine UAS-Kontrolle wurde nicht erfasst; dies sollte

nachgeholt werden. Ein Paarvergleich wurde unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests durchgeführt. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

<i>ptip</i> ^{RNAi} (BDSC #31741)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,879	0,017
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}		0,888	0,025

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	310,5	0,002594

	R55G08-GAL4/+	<i>ptip</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	80	nicht gemessen	45

Tabelle 129: Statistische Auswertung zu **R55G08>Set1^{RNAi}** (VDRC #10833), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu, 02.11.2017.

<i>Set1</i> ^{RNAi} (VDRC #10833)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,794	0,012
10 / 10	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+		0,774	0,007
10 / 10	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}		0,671	3,96E-04

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Set1</i> ^{RNAi} /+	~ 1		
R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}	0,015	0,258	

	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	90	95	80

Tabelle 130: Statistische Auswertung zu **R55G08>Set1^{RNAi}** (BDSC #33704), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu, 02.11.2017.

<i>Set1</i> ^{RNAi} (BDSC #33704)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,686	0,001
10 / 10	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+		0,904	0,245
10 / 10	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}		0,813	0,021

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Set1</i> ^{RNAi} /+	0,127		
R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}	0,012	0,107	

	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	100	85	80

Überkletterungen [%]			
----------------------	--	--	--

Tabelle 131: Statistische Auswertung zu **R55G08>Sirt6^{RNAi}** (BDSC #34530), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

Sirt6^{RNAi} (BDSC #34530)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,896	0,198
10 / 10	<i>Sirt6^{RNAi}/+</i>		0,802	0,015
10 / 10	R55G08-GAL4> <i>Sirt6^{RNAi}</i>		0,939	0,539

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Sirt6^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>Sirt6^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>Sirt6^{RNAi}/+</i>	0,081		
R55G08-GAL4> <i>Sirt6^{RNAi}</i>	0,846	0,102	

	R55G08-GAL4/+	<i>Sirt6^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>Sirt6^{RNAi}</i>
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	70	90	70

Tabelle 132: Statistische Auswertung zu **R55G08>Tip60^{RNAi}** (BDSC #28563), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

Tip60^{RNAi} (BDSC #28563)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
10 / 10	R55G08-GAL4/+		0,832	0,036
10 / 10	<i>Tip60^{RNAi}/+</i>		0,841	0,045
10 / 10	R55G08-GAL4> <i>Tip60^{RNAi}</i>		0,892	0,177

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Tip60^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>Tip60^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>Tip60^{RNAi}/+</i>	0,041		
R55G08-GAL4> <i>Tip60^{RNAi}</i>	0,054	0,607	

	R55G08-GAL4/+	<i>Tip60^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>Tip60^{RNAi}</i>
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	70	90	90

Tabelle 133: Statistische Auswertung zu **R55G08>Top2^{RNAi}** (BDSC #31342), 3,5 mm Lücke. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Eine UAS-Kontrolle wurde nicht erfasst; dies sollte nachgeholt werden. Ein Paarvergleich wurde unter Nutzung des Wilcoxon-Rangsummentests durchgeführt. Angabe des Medians [%] an erfolgreichen Überkletterungen. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege.

Top2^{RNAi} (BDSC #31342)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,879	0,017
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>Top2^{RNAi}</i>		0,901	0,044

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	W	p
-------------------	--------------------	---	---

R55G08-GAL4>Top2 ^{RNAi}	Wilcoxon-Rangsummentest	189	0,772
	R55G08-GAL4/+	Top2 ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4>Top2 ^{RNAi}
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	80	nicht gemessen	80

9.6.3 Beinlängen

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, konnte über Verhaltensversuche im Lückenüberwindungsparadigma gezeigt werden, dass Fliegen abhängig von ihrer Körpergröße ihre Kletterinitiationen der präsentierten Lückengröße anpassen (Krause, 2015). Bei der Analyse fiel auf, dass die erfolglosen Kletterinitiationen kleiner Fliegen in etwa den Kletterinitiationen entsprechen, die die großen Fliegen an einer 0,5 mm-größeren Lücke zeigen. Folglich sollten die Kletterinitiationen abhängig von der Körpergröße des Genotyps interpretiert werden. *Beispiel: Gruppe A und Gruppe B zeigen eine ähnliche Kletterleistung an der 4,0 mm Lücke. Dabei ist Gruppe A deutlich kleiner als Gruppe B. Würde man das Verhalten nachfolgend abhängig von der Körpergröße der Tiere betrachten, wäre es denkbar, dass Gruppe A bei normierter Körpergröße deutlich mehr Kletterinitiationen wagt als Gruppe B und sich statistisch von dieser abhebt.* Von Krause wurde dokumentiert, dass sich ein Größenunterschied von 15,8 % auf das Kletterverhalten an der Lücke auswirkt (Krause, 2015). Um Variationen in der Größe zwischen verschiedenen Genotypen zu unterbinden, wird daher sehr genau darauf geachtet, dass die gesündesten Nachkommen einer Kreuzung getestet werden (1-3 ersten Schlupfe). Generell sollte aber die genutzte Lückengröße von 5,0 mm keinen Unterschied im Verhalten provozieren; kleine und große wildtypische Fliegen unterscheiden sich in ihren erfolglosen Kletterinitiationen (0, bzw. 10 %) an dieser Lückengröße laut Krause nicht (Krause, 2015).

In den nachfolgenden Tabellen werden die Beinlängen (Tibia plus Tarsus eines Vorderbeins) von der GAL4-Kontrolle, der UAS-Kontrolle und den *Knock-Down*-Fliegen mit $\Delta 7$ -spezifischen Phänotyp (siehe Tabelle 7) aufgeführt und verglichen. Dabei fällt auf, dass sich die Beinlängen zum Teil signifikant voneinander unterscheiden. Ein Größenunterschied von über 15,8 % ist jedoch bei keiner der zu vergleichenden Gruppen zu verzeichnen. Eine Ausnahme bildet die statistische Auswertung zu R55G08>Sirt6^{RNAi} (BDSC #34530; Tabelle 145). Die GAL4-Kontrolle ist in diesem Fall 16 % größer als der *Knock-Down*. Würden die Körpergrößen der

Tiere normiert wären, fielen die entsprechende Kletterleistung der *Knock-Down*-Fliegen wahrscheinlich noch ausgeprägter aus und würde das Ergebnis eines $\Delta 7$ -spezifischen Phänotyps sogar weiter untermauern.

Tabelle 134: Statistische Auswertung zu **R55G08>mle^{RNAi} (BDSC #34864)**, Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>mle^{RNAi}</i> (BDSC #34864)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,962	0,594
20	<i>mle^{RNAi}/+</i>		0,936	0,202
20	R55G08-GAL4> <i>mle^{RNAi}</i>		0,948	0,332

Bartlett-Test	df	p
1,6615	2	0,4357

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>mle^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>mle^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>mle^{RNAi}/+</i>	3,2E-06		
R55G08-GAL4> <i>mle^{RNAi}</i>	0,410	2,2E-07	

	R55G08-GAL4/+	<i>mle^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>mle^{RNAi}</i>
Median Beinlängen [mm]	0,99	0,92	1,00

Tabelle 135: Statistische Auswertung zu **R55G08>msl-1^{RNAi} (BDSC #39012)**, Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>msl-1^{RNAi}</i> (BDSC #39012)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,962	0,594
20	<i>msl-1^{RNAi}/+</i>		0,973	0,826
27	R55G08-GAL4> <i>msl-1^{RNAi}</i>		0,902	0,015

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-1^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>msl-1^{RNAi}</i>
R55G08-GAL4/+			
<i>msl-1^{RNAi}/+</i>	0,040		
R55G08-GAL4> <i>msl-1^{RNAi}</i>	0,920	0,23	

	R55G08-GAL4/+	<i>msl-1^{RNAi}/+</i>	R55G08-GAL4> <i>msl-1^{RNAi}</i>
Median Beinlängen [mm]	0,99	0,97	1,01

Tabelle 136: Statistische Auswertung zu **R55G08>msl-3^{RNAi} (BDSC #35272)**, Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Daten wurden erhoben im Rahmen eines F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>msl-3^{RNAi}</i> (BDSC #35272)				
---	--	--	--	--

N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,962	0,594
20	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+		0,938	0,218
20	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}		0,896	0,035

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	0,040		
R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}	0,310	0,080	

	R55G08-GAL4/+	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	0,99	0,94	0,98

Tabelle 137: Statistische Auswertung zu **R55G08>*msl-3*^{RNAi} (BDSC #36870)**, Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

<i>msl-3</i> ^{RNAi} (BDSC #36870)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,964	0,621
20	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+		0,955	0,448
20	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}		0,923	0,114

Bartlett-Test	df	p
4,8241	2	0,08963

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	0,052		
R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}	2,5E-05	2,3E-08	

	R55G08-GAL4/+	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	1,04	1,06	0,99

Tabelle 138: Statistische Auswertung zu **R55G08>*msl-3*^{RNAi} (BDSC #33698)**, Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

<i>msl-3</i> ^{RNAi} (BDSC #33698)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,964	0,621
20	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+		0,954	0,427
20	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}		0,971	0,770

Bartlett-Test	df	p
1,3696	2	0,5042

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			

$mo^{RNAi/+}$	0,083		
R55G08-GAL4> mo^{RNAi}	0,476	0,476	

	R55G08-GAL4/+	$mo^{RNAi/+}$	R55G08-GAL4> mo^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	1,04	1,02	1,02

Tabelle 139: Statistische Auswertung zu **R55G08> mo^{RNAi}** (BDSC #58281), Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

mo^{RNAi} (BDSC #58281)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,964	0,621
20	$mo^{RNAi/+}$		0,959	0,531
20	R55G08-GAL4> mo^{RNAi}		0,965	0,656

Bartlett-Test	df	p
1,4288	2	0,4895

Genotyp	R55G08-GAL4/+	$mo^{RNAi/+}$	R55G08-GAL4> mo^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
$mo^{RNAi/+}$	0,084		
R55G08-GAL4> mo^{RNAi}	0,164	0,003	

	R55G08-GAL4/+	$mo^{RNAi/+}$	R55G08-GAL4> mo^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	1,04	1,06	1,03

Tabelle 140: Statistische Auswertung zu **R55G08> Pc^{RNAi}** (BDSC #31110), Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Eine GAL4-Kontrolle wurde nicht erfasst; es empfiehlt sich diese nachzuholen. Ein Paarvergleich wurde unter Nutzung des T-Tests durchgeführt. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen.

Pc^{RNAi} (BDSC #31110)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
19	$Pc^{RNAi/+}$		0,889	0,031
20	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}		0,849	0,005

R55G08-GAL4/+ vs. R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}	Statistischer Test	W	p
	Wilcoxon-Rangummentest	84	0,002355

	R55G08-GAL4/+	$Pc^{RNAi/+}$	R55G08-GAL4> Pc^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	nicht gemessen	1,03	1,06

Tabelle 141: Statistische Auswertung zu **R55G08> Pc^{RNAi}** (BDSC #31189), Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Tabea Rosenbaum, 13.04.2017.

Pc^{RNAi} (BDSC #31189)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-	W	p

20	R55G08-GAL4/+	Test	0,960	0,538
20	<i>Pc</i> ^{RNAi} /+		0,942	0,312
20	R55G08-GAL4> <i>Pc</i> ^{RNAi}		0,979	0,920

Bartlett-Test	df	p
3,6624	2	0,1602

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Pc</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Pc</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Pc</i> ^{RNAi} /+	0,890		
R55G08-GAL4> <i>Pc</i> ^{RNAi}	0,870	0,870	

	R55G08-GAL4/+	<i>Pc</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Pc</i> ^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	1,01	1,01	0,99

Tabelle 142: Statistische Auswertung zu **R55G08>ptip^{RNAi}** (BDSC #31741), Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Eine UAS-Kontrolle wurde nicht erfasst; es empfiehlt sich diese nachzuholen. Ein Paarvergleich wurde unter Nutzung des T-Tests. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen.

<i>ptip</i> ^{RNAi} (BDSC #31741)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,913	0,074
20	R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}		0,913	0,073

R55G08-GAL4/+ vs.	Statistischer Test	t	df	p
R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}	T-Test	2,18	37,97	0,03554

	R55G08-GAL4/+	<i>ptip</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>ptip</i> ^{RNAi}
Median erfolgreiche Überkletterungen [%]	1,04	nicht gemessen	1,02

Tabelle 143: Statistische Auswertung zu **R55G08>Set1^{RNAi}** (VRDC #10833), Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (nicht-gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu, 02.11.2017.

<i>Set1</i> ^{RNAi} (VRDC #10833)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,930	0,152
20	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+		0,920	0,101
20	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}		0,936	0,198

Bartlett-Test	df	p
18,824	2	8,172E-05

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Set1</i> ^{RNAi} /+	2,8E-06	-	
R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}	0,043	5,7E-10	

	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	0,89	0,98	1,01

Tabelle 144: Statistische Auswertung zu **R55G08>*Set1*^{RNAi} (BDSC #33704)**, Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (nicht-gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Sri Sitepu, 02.11.2017.

<i>Set1</i> ^{RNAi} (BDSC #33704)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,907	0,056
20	<i>Set1</i> ^{RNAi/+}		0,954	0,438
20	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}		0,906	0,053

Bartlett-Test	df	p
7,4	2	0,02473

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Set1</i> ^{RNAi/+}	0,221	-	
R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}	0,014	0,030	

	R55G08-GAL4/+	<i>Set1</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Set1</i> ^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	1,03	1,01	0,98

Tabelle 145: Statistische Auswertung zu **R55G08>*Sirt6*^{RNAi} (BDSC #34530)**, Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

<i>Sirt6</i> ^{RNAi} (BDSC #34530)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,980	0,940
20	<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}		0,980	0,931
19	R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}		0,917	0,098

Bartlett-Test	df	p
1,7066	2	0,426

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}	0,00066		
R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}	9,7E-07	0,00157	

	R55G08-GAL4/+	<i>Sirt6</i> ^{RNAi/+}	R55G08-GAL4> <i>Sirt6</i> ^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	1,18	1,09	1,02

Tabelle 146: Statistische Auswertung zu **R55G08>*Tip60*^{RNAi} (BDSC #28563)**, Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen. Die Daten

wurden erhoben im Rahmen der Bachelorarbeit von Michelle Haase, 22.11.2018.

<i>Tip60</i> ^{RNAi} (BDSC #28563)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,890	0,027
20	<i>Tip60</i> ^{RNAi} /+		0,898	0,038
20	R55G08-GAL4> <i>Tip60</i> ^{RNAi}		0,936	0,205

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Tip60</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Tip60</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Tip60</i> ^{RNAi} /+	0,3153		
R55G08-GAL4> <i>Tip60</i> ^{RNAi}	0,0003	0,0012	

	R55G08-GAL4/+	<i>Tip60</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Tip60</i> ^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	1,08	1,08	1,18

Tabelle 147: Statistische Auswertung zu **R55G08>Top2**^{RNAi} (BDSC #31342), Beinlängen. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Angabe des Medians der Beinlängen (Tibia + Tarsus eines Vorderbeins) der Fliegen, welche den Test an der 5,0 mm Lücke absolvierten. N: Anzahl der Fliegen.

<i>Top2</i> ^{RNAi} (BDSC #31342)				
N	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20	R55G08-GAL4/+		0,913	0,074
20	<i>Top2</i> ^{RNAi} /+		0,969	0,734
20	R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}		0,860	0,008

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>Top2</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>Top2</i> ^{RNAi} /+	0,990		
R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}	0,990	0,900	

	R55G08-GAL4/+	<i>Top2</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>Top2</i> ^{RNAi}
Median Beinlängen [mm]	1,04	1,04	1,03

9.6.4 Analyse von Entwicklungsdefekten nach RNA-Interferenz

Zur Erfassung von morphologischen Defekten, bedingt durch RNAi des betreffenden epigenetischen Faktors über die Entwicklung hinweg, wurde das Zellmuster der $\Delta 7$ -Neurone immunhistochemisch visualisiert (Synaptotagmin::eGFP; DenMark, magenta). Zellkörper wurden gezählt und deren Anzahl mit dem Kontroll-Genotyp R55G08>*DenSyt* verglichen. Ist deren Anzahl im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringert, liegt ein morphologischer Defekt vor.

Die Kontrolle in Abbildung 26A enthält 21 Zellkörper pro Hemisphäre. Nach Analyse weiterer Kontroll-Präparate können prinzipiell zwischen 18 und 23 Zellkörper pro Hemisphäre gezählt werden. Demnach ist die Morphologie der PB der Präparate aus Abbildung 26B-I mit 18 (E) bis 22 Zellkörpern (G) wildtypisch und damit intakt.

Nur die epigenetischen Faktoren, deren *Knock-Down* in den $\Delta 7$ -Neuronen einen Verhaltensphänotyp hervorriefen, wurden immunhistochemisch in Abbildung 26 dargestellt. Es sei angemerkt, dass für den Faktor Mof die BDSC-Linie #31401 ausgewählt wurde. BDSC #31401 zeigt als einzige der *mof*^{RNAi}-Linien einen unspezifischen Phänotyp. Die Aufnahme in Abbildung 26 liegt darin begründet, dass diese Linie zeitlich vor den anderen *mof*^{RNAi}-Konstrukten getestet wurde, sich vielversprechend erwies und vorsorglich gefärbt wurde. Färbungen der Linien BDSC #36870, #33698 und #58281 wurden daraufhin unterlassen. Es wäre anzuraten dies zu vervollständigen.

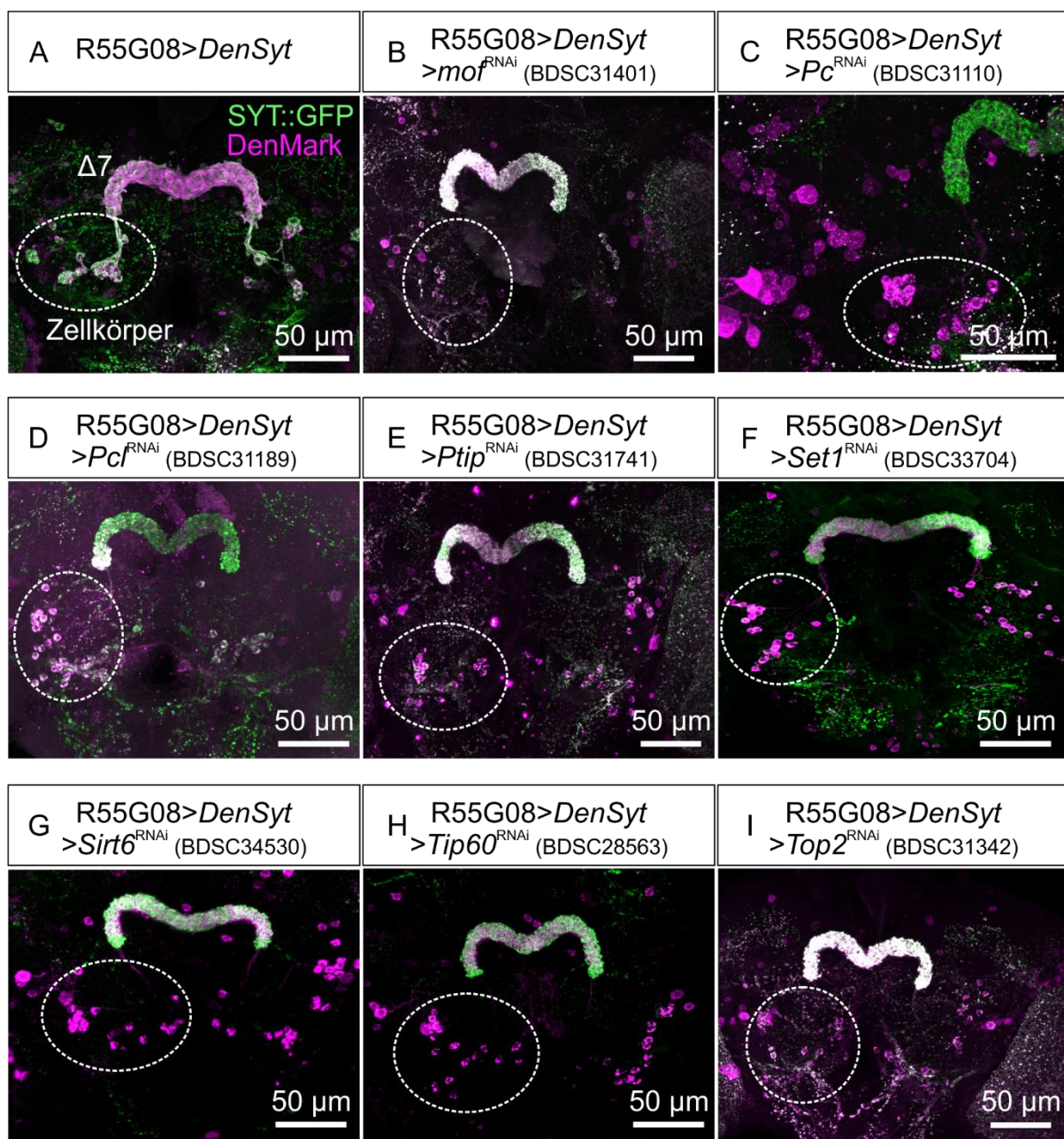


Abbildung 26: Immunhistochemische Analyse von Entwicklungsdefekten nach RNA-Interferenz. Das

Zellmuster der $\Delta 7$ -Neurone (R55G08>*DenSyt*) wird visualisiert über Expression von Synaptotagmin-GFP (SYT::eGFP) präsynaptisch und DenMark-mCherry postsynaptisch. Bei den jeweiligen Genotypen erfolgt zudem die Induktion der RNAi des jeweiligen epigenetischen Faktors mit Beginn der Entwicklung. Anhand einer Zählung der Zellkörper soll überprüft werden, ob morphologische Entwicklungsdefekte der PB durch die RNA-Interferenz verursacht wurden. Die Färbungen wurden mitunter im Rahmen der Bachelorarbeiten von Can Usta (April 2015; [B, E, I]), Tabea Rosenbaum (13.04.2017, [A, D]), Sri Sitepu (02.11.2017, [F]), und Michelle Haase (22.11.2018, [G, H]) durchgeführt.

- (A) R55G08>*DenSyt*, 21 Zellkörper per Hemisphäre, optische Schichtdicke: 51,75 μm , Protokoll siehe 2.7.3; α -GFP (Aves Labs), α -mCherry (SICGEN), siehe Tabelle 4.
- (B) R55G08>*DenSyt*>*moF*^{RNAi} (BDSC31401), 21 Zellkörper per Hemisphäre, optische Schichtdicke: 62,25 μm , Protokoll siehe 2.7.3; α -GFP (Aves Labs), α -mCherry (SICGEN), siehe Tabelle 4.
- (C) R55G08> *DenSyt*>*Pc*^{RNAi} (BDSC31110), 20 Zellkörper per Hemisphäre, optische Schichtdicke: 54 μm , Protokoll siehe 2.7.3; α -GFP (Aves Labs), α -mCherry (SICGEN), siehe Tabelle 4.
- (D) R55G08> *DenSyt* >*Pc*^{RNAi} (BDSC31189), 22 Zellkörper per Hemisphäre, optische Schichtdicke: 64,5 μm , Protokoll siehe 2.7.3; α -GFP (Aves Labs), α -mCherry (SICGEN), siehe Tabelle 4.
- (E) R55G08> *DenSyt* >*Ptip*^{RNAi} (BDSC31741), 18 Zellkörper per Hemisphäre, optische Schichtdicke: 82,5 μm , Protokoll siehe 2.7.3; α -GFP (Aves Labs), α -mCherry (SICGEN), siehe Tabelle 4.
- (F) R55G08> *DenSyt* >*Set1*^{RNAi} (BDSC33704), 21 Zellkörper per Hemisphäre, optische Schichtdicke: 23,25 μm , Protokoll siehe 2.7.4; α -GFP (Aves Labs), α -RFP (Rockland), siehe Tabelle 4.
- (G) R55G08> *DenSyt* >*Sirt6*^{RNAi} (BDSC34530), 22 Zellkörper per Hemisphäre, optische Schichtdicke: 36 μm , Protokoll siehe 2.7.4; α -GFP (Aves Labs), α -RFP (Rockland), siehe Tabelle 4.
- (H) R55G08> *DenSyt* >*Tip60*^{RNAi} (BDSC28563), 21 Zellkörper per Hemisphäre, optische Schichtdicke: 28,5 μm , Protokoll siehe 2.7.4; α -GFP (Aves Labs), α -RFP (Rockland), siehe Tabelle 4.
- (I) R55G08> *DenSyt* >*Top2*^{RNAi} (BDSC31342), 19 Zellkörper per Hemisphäre, optische Schichtdicke: 61,5 μm , Protokoll siehe 2.7.3; α -GFP (Aves Labs), α -mCherry (SICGEN), siehe Tabelle 4.

9.6.5 MSL-Komplex

Die statistische Auswertung der männlichen Fliegen der Genotypen R55G08>*moF*^{RNAi} (BDSC #36870), R55G08>*mle*^{RNAi} (BDSC #34864), R55G08>*msl-1*^{RNAi} (BDSC #39012), und R55G08>*msl-3*^{RNAi} (BDSC #35272) sind unter 9.6 in Tabelle 73, Tabelle 75, Tabelle 78, und Tabelle 79 zu finden.

Tabelle 148: Statistische Auswertung zu Abbildung 23E, **R55G08>*moF*^{RNAi} (BDSC #36870), Weibchen**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Mit dem Bartlett-Test wird die Gleichheit mehrerer Varianzen getestet; nachfolgend wird für den Vergleich der drei Gruppen der T-Test (gepoolte Standardabweichungen) verwendet; Bonferroni-Holm korrigiert. Verwendung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

<i>moF</i> ^{RNAi} (BDSC #36870)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,90554	0,05244
20 / 10	<i>moF</i> ^{RNAi} /+		0,9169	0,08638
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>moF</i> ^{RNAi}		0,93123	0,1631

Bartlett-Test	df	p
0,84173	2	0,6565

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>moF</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>moF</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>moF</i> ^{RNAi} /+	0,135		
R55G08-GAL4> <i>moF</i> ^{RNAi}	0,083	0,002	

Tabelle 149: Statistische Auswertung zu Abbildung 23F, **R55G08>*mle*^{RNAi} (BDSC #34864), Weibchen**. Die

Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen des F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>mle</i> ^{RNAi} (BDSC #34864)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,71075	5,287E-05
20 / 10	<i>mle</i> ^{RNAi} /+		0,90866	0,06009
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}		0,88574	0,02247

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>mle</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>mle</i> ^{RNAi} /+	0,00013		
R55G08-GAL4> <i>mle</i> ^{RNAi}	0,0049	0,22653	

Tabelle 150: Statistische Auswertung zu Abbildung 23G, **R55G08>*msl-1*^{RNAi} (BDSC #39012), Weibchen**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen des F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>msl-1</i> ^{RNAi} (BDSC #39012)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,71075	5,287E-05
20 / 10	<i>msl-1</i> ^{RNAi} /+		0,86241	0,008666
30 / 10	R55G08-GAL4> <i>msl-1</i> ^{RNAi}		0,89982	0,008316

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-1</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>msl-1</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>msl-1</i> ^{RNAi} /+	0,0258		
R55G08-GAL4> <i>msl-1</i> ^{RNAi}	0,0026	0,4792	

Tabelle 151: Statistische Auswertung zu Abbildung 23H, **R55G08>*msl-3*^{RNAi} (BDSC #35272), Weibchen**. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Rangsummentest; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,0 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen des F2-Praktikums von Roena Sali, 20.10.2017.

<i>msl-3</i> ^{RNAi} (BDSC #35272)				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
20 / 10	R55G08-GAL4/+		0,71075	5,287E-05
20 / 10	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+		0,81004	0,001224
20 / 10	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}		0,89436	0,03236

Genotyp	R55G08-GAL4/+	<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}
R55G08-GAL4/+			
<i>msl-3</i> ^{RNAi} /+	0,0673		
R55G08-GAL4> <i>msl-3</i> ^{RNAi}	4,2E-07	0,0028	

Tabelle 152: Statistische Auswertung zu *mor*^{RNAi}/+; R55G08-*Tub*>GAL80^{ts}/+, Protokoll 2.4A. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

<i>mor</i> ^{RNAi} /+; R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+ (BDSC #36870), Protokoll siehe 2.4A				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-	W	p

15 / 10	naiv, 17°C	Test	0,839	0,012
15 / 10	trainiert, Tag 1, 17°C		0,910	0,137
15 / 10	trainiert, Tag 7, 17°C		0,882	0,052

Genotyp	naiv, 17°C	trainiert, Tag 1, 17°C	trainiert, Tag 7, 17°C
naiv, 17°C			
trainiert, Tag 1, 17°C	0,013		
trainiert, Tag 7, 17°C	0,002	0,013	

Tabelle 153: Statistische Auswertung zu $mo^{RNAi/+}$; R55G08-*Tub*>GAL80^{ts}/+, Protokoll 2.4B. Die Verteilung der Daten wurde über den Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Vergleich der drei Gruppen über den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; Bonferroni-Holm korrigiert. Nutzung einer 5,5 mm Lücke. N: Anzahl der Fliegen, n: Anzahl der Anläufe pro Fliege. Die Daten wurden erhoben im Rahmen der Masterarbeit von Elisa Orben, 06.07.2017.

$mo^{RNAi/+}$; R55G08- <i>Tub</i> >GAL80 ^{ts} /+ (BDSC #36870), Protokoll siehe 2.4B				
N / n	Genotyp	Shapiro-Wilk-Test	W	p
15 / 10	naiv, nach 3d 30°C		0,875	0,040
15 / 10	trainiert, Tag 1, 17°C		0,972	0,888
15 / 10	trainiert, Tag 4, 17°C		0,892	0,072
15 / 10	trainiert, Tag 7, 17°C		0,904	0,110

Genotyp	naiv, nach 3d 30°C	trainiert, Tag 1, 17°C	trainiert, Tag 4, 17°C	trainiert, Tag 7, 17°C
naiv, nach 3d 30°C				
trainiert, Tag 1, 17°C	0,948			
trainiert, Tag 4, 17°C	0,948	0,948		
trainiert, Tag 7, 17°C	0,008	0,006	0,063	

10 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Originalarbeiten

Krause T., **Spindler L.**, Poeck B., Strauss R., *Drosophila* Acquires a Long-Lasting Body-Size Memory from Visual Feedback, *Current Biology* 29, 1833-1841 (2019)

Diese Doktorarbeit enthält Abbildungen, die zuvor in der Originalarbeit publiziert wurden. In den Abbildungsunterschriften der jeweiligen Graphiken wurde auf die Originalarbeit verwiesen, entsprechend den Bestimmungen des Elsevier-Verlags (siehe nächste Seite).

Vorträge

Spindler L., Gene Regulation and Epigenetics of a Lifetime Body-Size Memory in *Drosophila*, 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Deutschland (22 – 25 März 2017)

Abstracts

Spindler L., Krause T., Poeck B., Strauss R., How Tall Am I? - Characterization of a Lifetime Body-Size Memory in *Drosophila*, 17th European Neurobiology of *Drosophila* Conference, Krakau, Polen (03 – 09 September 2018)

Spindler L., Krause T., Poeck B., Strauss R., Analysis of Epigenetic Regulators in a Lifetime Body-Size Memory in *Drosophila*, 16th European Neurobiology of *Drosophila* Conference, Platanias, Chania, Kreta, Griechenland (02 – 06 September 2016)

Spindler L., Krause T., Poeck B., Strauss R., Analysis of Epigenetic Regulators in a Lifetime Body-Size Memory in *Drosophila*, 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Deutschland (18 – 21 März 2015)

Weitere Publikationen

Lence T., Akhtar J., Bayer M., Schmid K., **Spindler L.**, Ho CH., Kreim N., Andrade-Navarro MA., Poeck B., Helm M., Roignant JY., m6A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*., *Nature* 540, 242-247 (2016)



RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Drosophila Acquires a Long-Lasting Body-Size Memory from Visual Feedback

Author: Tammo Krause, Laura Spindler, Burkhard Poeck, Roland Strauss

Publication: Current Biology

Publisher: Elsevier

Date: 3 June 2019

© 2019 Elsevier Ltd.

LOGIN

If you're a **copyright.com** user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials.

Already a **RightsLink** user or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

11 Danksagung

12 Lebenslauf